

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

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTICÂNCER DOS DERIVADOS TIAZACRIDÍNICOS
LPSF/AC-34 E LPSF/AC-129

THIAGO UBIRATAN LINS E LINS

Recife, Janeiro de 2014

Thiago Ubiratan Lins e Lins

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTICÂNCER DOS DERIVADOS TIAZACRIDÍNICOS
LPSF/AC-34 E LPSF/AC-129**

**Tese submetida ao Programa de Pós
Graduação em Ciências Biológicas do Centro
de Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Pernambuco como requisito para obtenção
do título de Doutor em Ciências Biológicas,
Área de Concentração Biologia Química para a
Saúde.**

Orientador: Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta

Co-orientadores: Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto Melo Rêgo

Recife, Janeiro de 2014

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

Lins, Thiago Ubiratan Lins e
Avaliação do efeito anticâncer dos derivados tiazacridínicos LPSF/AC-34 e LPSF/AC-129 / Thiago Ubiratan Lins e Lins. – Recife: O Autor, 2015.

109 f.: il.

Orientadores: Ivan da Rocha Pitta, Maria Galdino da Rocha Pitta, Moacyr Jesus Barreto Melo Rêgo

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2015.

Inclui referências e anexos

1. Farmacologia 2. Câncer I. Pitta, Ivan da Rocha (orient.) II. Pitta, Maira Galdino da Rocha. (coorient.) III. Rêgo, Moacyr Jesus Barreto Melo (coorient.) IV. Título.

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-213

ATA DA DEFESA DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

Aos vinte e três dias do mês de janeiro de dois mil e catorze, às nove horas, no Auditório da DINE, realizou-se a Defesa de Tese apresentada e defendida pelo Doutorando **Thiago Ubiratan Lins e Lins**, intitulada: "**Avaliação do efeito anticâncer dos derivados tiazacridínicos LPSF/AC-34 e LPSF/AC-129**". A Banca Examinadora foi homologada em sete de janeiro de dois mil e catorze, pela PROPESQ, tendo como membros titulares os Professores: **Ivan da Rocha Pitta** (Orientador), Doutor em Ciências Farmacêuticas, pela Universidade Joseph-Fourier, **Marina Galdino da Rocha Pitta**, Doutora em Inovação Terapêutica, pela Universidade Federal de Pernambuco, **Michelly Cristiny Pereira**, Doutora em Ciências, pela Universidade de São Paulo, **Giovani Rota Bertani**, Doutor em Melhoramento Animal e Genética, pela Universidade de Nebraska, **Paloma Lys de Medeiros**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco; **Maria Tereza dos Santos Correia**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de São Paulo, **Cesar Augusto Souza de Andrade**, Doutor em Ciências de Materiais, pela Universidade Federal de Pernambuco, suplentes. O Prof. Ivan Pitta deu início à Sessão, agradecendo pela presença de todos e passou a palavra ao doutorando para fazer exposição de sua tese, efetuada em quarenta minutos. Continuando, o presidente solicitou à Comissão Examinadora que ocupasse seus lugares à mesa para proceder à arguição, na seguinte ordem: Dr.^a Paloma Medeiros (1º examinador), Dr. Giovani Bertani (2º examinador), Dr.^a Michelly Pereira (3º examinador), Dr.^a Marina Pitta (4º examinador), Dr. Ivan Pitta (5º examinador). Dando continuidade, o presidente abordou a importância do trabalho desenvolvido pelo doutorando e, em seguida, expressou seus agradecimentos, solicitando aos convidados a gentileza de se retirarem do recinto por alguns minutos, a fim de proceder a avaliação da tese. A Comissão Examinadora atribuiu a **Thiago Ubiratan Lins e Lins** a menção: "**Aprovado**", por unanimidade. Face ao resultado o mesmo está apto a receber o grau de Doutor em Ciências Biológicas, Área **Biologia Química para a Saúde**, pela Universidade Federal de Pernambuco. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e para constar, eu Adenilda Eugênia de Lima, Secretária, lavrei, datei e assinei a presente ata que também assinam os demais presentes. Recife, ~~23~~ de janeiro de 2014

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTICÂNCER DOS DERIVADOS TIAZACRIDÍNICOS
LPSF/AC-34 E LPSF/AC-129**

Thiago Ubiratan Lins e Lins

BANCA EXAMINADORA

Titulares

Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta (Departamento de Antibióticos – UFPE)

Dr^a. Marina Galdino da Rocha Pitta (NUPIT SG – UFPE)

Prof^a. Dr^a. Michelly Cristinny Pereira (NUPIT SG – UFPE)

Prof. Dr. Giovani Rota Bertani (Departamento de Bioquímica – UFPE)

Prof^a. Dr^a. Paloma Lys Medeiros (Departamento de Histologia – UFPE)

Suplentes

Prof.^a. Dr.^a. Maria Tereza dos Santos Correia (Departamento de Bioquímica – UFPE)

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade (Departamento de Bioquímica – UFPE)

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

Dedico este trabalho à minha família que tem me apoiado em todas circunstâncias não importa o que aconteça. Em especial, dedico à eterna Prof.^a Suely Lins Galdino, que para mim sempre será um exemplo de dedicação, determinação e altruísmo.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** nosso Pai, causa primária de todas as coisas que nos guia para todas as nossas conquistas e realizações.

À **minha família** pelo apoio e dedicação empenhados. Obrigado por estar sempre presente. Amo todos vocês.

À **Luana Cavalcanti**, pelo seu amor, carinho e atenção. Meu amor, obrigado por ter me apoiado com paciência e compreensão nesses últimos meses que precederam essa etapa final de defesa de tese.

Ao **Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta** pela orientação neste trabalho e pela oportunidade de ter sempre permitido fazer parte deste grupo de pesquisa.

À **Prof.^a Dr.^a Maira Galdino da Rocha Pitta**, pela dedicada co-orientadora que tem sido, sempre zelosa buscando soluções e planejando metas a serem atingidas para que o trabalho de todos dê certo.

Ao **Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo** por formar parceria forte na co-orientação junto da Prof.^a Maira. Sua garra e força de vontade me move pra frente e faz querer construir mais.

À **Dr.^a Michelly Cristiny Pereira** por também fazer parte da parceria junto da Prof.^a Maira e Moacyr. Obrigado por contribuir de forma consistente e ao mesmo tempo com muita doçura na forma de conduzir.

À **Prof.^a Dr.^a Suely Lins Galdino** por ter estado presente em vários momentos da minha vida acadêmica sempre prestativa, atendendo minhas solicitações sem me deixar desamparado. Obrigado por ter plantado em nosso pensamento a semente de que podemos contribuir com a ciência sem, no entanto, deixarmos de ser pessoas melhores a cada dia, buscando desafios que possam nortear novas descobertas.

À **Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Alves de Lima (Nena)** pela contribuição neste trabalho sempre auxiliando com seu conhecimento específico e consistente na área da Química.

Aos **colegas de trabalho do LPSF** pela contribuição na parte química deste trabalho.

Aos **colegas de trabalho do LINAT** pelo companheirismo em nosso dia-a-dia repleto de afazeres. Em especial agradeço aos colegas **Mardonny** (parceiro forte) e **Kamila** pela contribuição neste trabalho

Ao **Prof. Dr. Ranílson de Souza Bezerra** e à **Prof.^a. Dr.^a Maria Teresa dos Santos Correa**, coordenador e vice-coordenadora, respectivamente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela atenção prestada a seus alunos de pós-graduação

À **Adenilda Eugênia de Lima**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas por ser prestativa, atenciosa e eficaz sempre que solicitada.

À **Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)** pela concessão da bolsa de estudos e auxílio financeiro.

LINS, THIAGO UBIRATAN LINS E; **Avaliação do efeito anticâncer dos derivados tiazacridínicos LPSF/AC-34 e LPSF/AC-129**. 2014. Orientador: Ivan da Rocha Pitta. Co-orientadores: Maira Galdino da Rocha Pitta; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo.

RESUMO

Os derivados tiazacridínicos (*Z/E*)-5-(acridin-9-il) metileno-3-(3-cloro-benzil)-tiazolidin-2,4-diona (LPSF/AC-34) e (*Z*)-5-(acridin-9-il) metileno-3-(3-cloro-benzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona (LPSF/AC-129) foram sintetizados. O produto da reação continha 72% do derivado (*Z*) LPSF/AC-129 e 22% do derivado (*Z/E*) LPSF/AC-34, com rendimento de 94%. As estruturas químicas dos derivados foram determinadas por espectroscopia no infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e espectrometria de massas e a pureza por HPLC-MS. A citotoxicidade da mistura LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 foi avaliada frente a linhagens de células tumorais aderentes e não-aderentes pelo método de MTT. Os valores obtidos para o IC₅₀ foi de 3,98 µM (linfoma de Burkitt - RAJI); 35,6 µM (leucemia de células T - Jurkat); 8,05 µM (leucemia promielocítica aguda - HL-60); 14,27 µM (leucemia linfoblástica aguda - CCRF-CEM); 55,77 µM (glioblastoma - NG97); >100 µM (mama - T47D). A seletividade dos compostos foi avaliada em células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) de voluntários sadios e apresentou uma IC₅₀>100µM. Em seguida, avaliou-se por citometria de fluxo o efeito dos derivados no ciclo celular e indução de morte. Observou-se que a mistura LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 na dose de 3,98 µM não causou alterações significativas no ciclo celular e induziu a morte por apoptose na linhagem de linfoma RAJI. Em paralelo, avaliou-se por RT-PCR o efeito dos derivados na expressão dos genes GADD153, PPAR γ , Bcl-2, SOD1, Beclin, Bid, p21 e RIP3 nas linhagens HL-60 e CCRF-CEM em comparação às células não tratadas. Após 10 horas de exposição da linhagem HL-60 aos derivados, na dose de 8,05 µM (n=3), observou-se a modulação dos genes GADD153 (12,47 vezes, p=0,0808) e PPAR γ (4,82 vezes, p=0,2277). Na linhagem CCRF-CEM (dose de 14,27 µM; n=3) observou-se a modulação dos genes Bcl-2 (0,97 vezes, p=0,4409), Bid (1,62 vezes, p=0,3911), RIP3 (0,97 vezes, p=0,3722) e SOD1 (1,29 vezes, p=0,0172) indicando interferência no estresse oxidativo. Avaliou-se também o efeito dos derivados na expressão protéica de NF κ B, Bax, pPTEN e GADD153 por Western Blotting. Observou-se na linhagem HL-60 a modulação de NF κ B (p=0,3012; n=3) e de Bax (p=0,9221; n=3). Na linhagem CCRF-CEM observou-se o aumento de NF κ B (p=0,0053; n=3) e Bax (p=0,6956; n=3). Os resultados mostraram que os derivados LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 apresentam atividade frente às linhagens de tumores hematopoiéticos e sólidos, modulando expressão gênica e proteica. **Palavras-chave:** tiazacridinas, apoptose, citotoxicidade, seletividade, sinergia.

LINS, THIAGO UBIRATAN LINS E; **Anticancer effect evaluation of LPSF/AC-34 and LPSF/AC-129 thiazacridinic derivatives**. 2014. Orientador: Ivan da Rocha Pitta. Co-orientadores: Maira Galdino da Rocha Pitta; Moacyr Jesus Barreto Melo Rêgo

ABSTRACT

The (Z / E) -5- (acridin-9-yl) methylene-3- (3-chloro-benzyl) thiazolidin-2,4-dione (LPSF / AC-34) and (Z) -5 - (acridin-9-yl) methylene-3- (3-chloro-benzyl) -4-thioxo-thiazolidin-2-one (LPSF / AC-129) thiazacridinic derivatives were synthesized. The reaction product contained (Z) LPSF / AC-129 (72%) and (Z / E) LPSF / AC-34 (22%), with 94% of yield. The derivatives chemical structures were determined by infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry hydrogen and the purity was determined by HPLC-MS. The mixture LPSF / AC-34 + LPSF / AC-129 cytotoxicity was evaluated against adherent and non-adherent tumor cell lines through MTT method. The IC₅₀ values obtained was 3,98 μ M (Burkitt lymphoma - RAJI); 35,6 μ M (T-cell leukemia - Jurkat); 8,05 μ M (acute promyelocytic leukemia - HL-60); 14,27 μ M (acute lymphoblastic leukemia - CCRF-CEM); 55,77 μ M (glioblastoma - NG97); > 100 μ M (breast - T47D). The compounds selectivity was assessed in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy volunteers and showed an IC₅₀> 100 μ M. Then, the derivative effect on cell cycle and induction of death was assayed by flow cytometry. It was observed that the 3,98 μ M dose of mixture LPSF / AC-34 + LPSF / AC-129 caused no significant changes in cell cycle and induce death by apoptosis in lymphoma cell line RAJI. In parallel through RT-PCR, it was evaluated the derivatives effect on GADD153, PPAR gamma, Bcl-2, SOD1, Beclin, Bid, RIP3, p21 genes expression in HL-60 and CCRF-CEM tumor cell lines compared to untreated cells . After submitting HL-60 line to 10 hours exposure of 8.05 μ M derivatives dose (n = 3), we observed the modulation of GADD153 (12,47 fold, p=0.0808) and PPAR gamma (4,82 fold, p=0.2277) genes. On CCRF-CEM cell line (14,27 μ M dose; n=3) it was observed modulation of Bcl-2 (0,97 fold, p = 0,4409), Bid (1,62 fold, p = 0,3911), RIP3 (0,97 fold, p=0,3722) and SOD1 (1,29 fold, p=0,0172) genes indicating interference on oxidative stress. It is also evaluated the derivatives effect on protein expression of NFkB, Bax, GADD153 and pPTEN by Western blotting. It was observed, in HL-60 cell line, the NFkB (p=0,3012; n=3) and Bax (p=0,9221; n=3) modulation. In CCRF-CEM cell line was observed NFkB (p=0,0053; n=3) and Bax (p=0.6956; n=3) increase. The results showed that the derivatives LPSF / AC-34 + LPSF / AC-129 had activity against hematopoietic and solid tumor cell lines by modulating gene and protein expression.

Key words: thiazacridines, apoptosis, cytotoxicity, selectivity, synergy.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1	Estimativa de novos casos de câncer no mundo	28
Figura 2	Tipos de câncer mais frequentemente diagnosticados no mundo por país e sexo em 2008	29
Figura 3	Índice de morte por 100.000 habitantes por país e sexo em 2008	30
Figura 4	Vias intrínseca e extrínseca da apoptose	35
Figura 5	Acridina	42
Figura 6	Amsacrina	43
Figura 7	Tiazolidina-2,4-diona	43
Figura 8	Ativação do PPAR γ	44
Figura 9	Tiazacridina	45

Artigo 1

Figura 1	m-AMSA (A), LPSF/AC-129 (B) and LPSF/AC-34	57
Figura 2	Synthetic route of obtention of LPSF/AC-34 and LPSF/AC-129	59
Figura 3	Michael addition reaction for obtaining the thiazacridinic derivative LPSF/AC-34	60
Figura 4	Michael addition reaction for obtaining the thiazacridinic derivative LPSF/AC-129	61
Figura 5	Effect of LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture on cell viability	64
Figura 6	Effect of LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture in cell cycle	66
Figura 7	Evaluation of cell death induced by LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture	67

Artigo 2

Figura 1	Cell viability evaluation of LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture on HL-60 and CCRF-CEM lineages (A). Amsacrine was assayed as positive control on CCRF-CEM (B) and HL-60 (C) lineages	78
----------	--	----

Figura 2	Analysis of genic expression related with apoptosis process in HL-60 cell lineage for a period of 10h.	79
Figura 3	Analysis of genic expression related with apoptosis process in CCRF-CEM cell lineage for a period of 10h.	80
Figura 4	Protein densitometry determined by Western Blotting analysis.	82

Anexos

Figura 1	Diagrama de síntese dos derivados tiazacridínicos LPSF/AC-34 e LPSF/AC-129	95
Figura 2	Reação de adição de Michael para obtenção do derivado tiazacridínico LPSF/AC-34	96
Figura 3	Reação de adição de Michael para obtenção do derivado tiazacridínico LPSF/AC-129	97
Figura 4	Espectro de infravermelho em cm^{-1} do 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(3-cloro-benzil)-tiazolidin-2,4-diona (LPSF/AC-34) adaptada	100
Figura 5	Espectro de infravermelho em cm^{-1} do 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(3-cloro-benzil)-4-tioxo-2-ona (LPSF/AC-129)	101
Figura 6	Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(3-cloro-benzil)-tiazolidin-2,4-diona (LPSF/AC-34) adaptada	103
Figura 7	Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(3-cloro-benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona (LPSF/AC-129) adaptada	104
Figura 8	Espectro de massas por IES dos derivados tiazacridínicos 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(3-cloro-benzil)-tiazolidin-2,4-diona (LPSF/AC-34) (MM=430) (A) e 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(3-cloro-benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona (LPSF/AC-129) (MM=446) (B)	106
Figura 9	Espectro de massas por IES (modo positivo) dos derivados tiazacridínicos 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(3-cloro-benzil)-tiazolidin-2,4-diona (LPSF/AC-34) (MM=430) e 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(3-cloro-benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona (LPSF/AC-129) (MM=446)	107
Figura 10	Espectro de LC/MS dos derivados tiazacridínicos LPSF/AC-34 (MM = 430) e LPSF/AC-129 (MM = 446)	108

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1	IC50 values from MTT and selectivity assays	65
Tabela 2	Percentage of cells on different cell cycle phases	66

Artigo 2

Tabela 1	IC50 values from MTT and selectivity assays	77
Tabela 2	Ratio average of protein expression	81

Anexos

Tabela 1	Características físico-químicas dos derivados tiazacridínicos LPSF/AC-34 e LPSF/AC-129	98
Tabela 2	Frequências de absorção no infravermelho, em cm^{-1} , dos derivados tiazacridínicos LPSF/AC-34 e LPSF/AC-129	99
Tabela 3	Deslocamentos químicos (δ) em ppm dos derivados tiazacridínicos LPSF/AC-34 e LPSF/AC-129	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

¹ HNMR	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (<i>Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance</i>)
A1	Proteína Anti-apoptótica A1 (<i>Anti-apoptotic Protein A1</i>)
Akt	Homólogo ao oncogene viral v-akt de tumor murino
ALL	Leucemia linfoblástica aguda (<i>Acute Lymphoblastic Leukemia</i>)
AML	Leucemia mielóide aguda (<i>Acute Myeloid Leukemia</i>)
AMSA	Amsacrina (<i>Amsacrine</i>)
APAF-1	Fator 1 de ativação de protease apoptótica (<i>Apoptotic Protease Activating Factor 1</i>)
Apo-1	Antígeno de apoptose 1 (<i>Apoptosis antigen 1</i>)
BAD	Agonista de morte celular associado a Bcl-2 (<i>Bcl-2 Antagonist of cell Death</i>)
Bak	Antagonista homólogo à Bcl-2 (<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>)
BAX	Proteína associada ao domínio X de Bcl-2 (<i>BCL2-associated X protein</i>)
Bcl-2	Célula B CLL/linfoma 2 (<i>B-cell lymphoma protein-2 family</i>)
BCL-w	Membro da família de proteínas Bcl-2 (<i>BCL2L2</i>)
BCL-xL	Célula B CLL/linfoma extra grande (<i>B-cell lymphoma-extra large</i>)
BID	Agonista de morte associado ao domínio BH3 (<i>BH3-interacting domain death agonist</i>)
Bim	Membro da família de proteínas Bcl-2 (<i>Bcl-2-like protein 11</i>)
CCRF-CEM	Linhagem de tumoral de leucemia linfoblástica humana
CD95	Grupamento de diferenciação 95 (<i>Cluster of differentiation 95</i>)
CDK-ciclina D	Ciclina D
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar (<i>complementar deoxyribonucleic acid</i>)
CO ₂	Gás carbônico
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DISC	Complexo de sinalizador de indução de morte (<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DR	Receptor para HLA-DR (<i>HLA-DR4 e HLA-DR5</i>)
DR4 e DR5	Receptor de morte 4 e 5 (<i>Death Receptor 4 and 5</i>)
EBV	Vírus Epstein-Barr (<i>Epstein-Barr Virus</i>)

ECM	Matriz extracelular (<i>Extracellular matrix</i>)
EGF/bFGF	Fator de crescimento epidermal (<i>Epidermal Growth Factor</i>) e Fator básico de crescimento de fibroblastos (<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>)
ERK1/2	Quinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular (<i>Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2</i>)
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FADD	Domínio de morte associado à via Fas (<i>Fas-Associated via Death Domain</i>)
Fas	Membro 6 da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral
FasL	Ligante de Fas
FLICE	Caspase 8
FLIP	Proteína reguladora de apoptose (<i>FLICE-like inhibitory protein</i>)
FM-USP	Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de São Paulo
FOXO	Fator de transcrição da apoptose (<i>Forkhead box</i>)
GADD153	Fator de transcrição heterodímero de C/EBP (transcription factor CHOP)
GADPH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HL-60	Linhagem tumoral de leucemia promielocítica aguda humana
HTLV1	Vírus linfotrófico humano de células T tipo 1 (<i>Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1</i>)
IC50	Concentração inibitória de 50% (<i>Inhibitory Concentration 50%</i>)
IgG-HRP	Imunoglobulina G associada à enzima peroxidase de rábano (<i>Immunoglobulin G associated to Horseradish Peroxidase</i>)
IL	Interleucina (<i>Interleukin</i>)
INCA	Instituto Nacional do Câncer (<i>National Institute Of Cancer</i>)
IR	Infravermelho (<i>Infra Red</i>)
Jurkat	Linhagem tumoral de leucemia de células T
KBr	Brometo de potássio (<i>Potassium Bromide</i>)
LINAT	Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
LNH	Linfoma não-Hodgkin

LPSF	Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos
MAPK p38	Proteína quinase ativadora de mitógeno (<i>P38 mitogen-activated protein kinases</i>)
Mcl-1	Proteína de indução à diferenciação mielóide (<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i>)
MMP	Potencial de membrana mitocondrial (<i>Mitochondrial Membrane Potential</i>)
Mp	Ponto de fusão (<i>Melting Point</i>)
MPTP	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial (<i>Mitochondrial Permeability Transition Pore</i>)
MTT	Sal de tetrazólio (<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>)
NFκB	Fator de transcrição nuclear kappa de células B (<i>Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>)
NG97	Linhagem tumoral de glioblastoma
NK cell	Células naturalmente citotóxicas (<i>Natural Killer cell</i>)
NO	Óxido nítrico (<i>Nitric Oxid</i>)
NOXA	Proteína 1 induzida por forbol-12-miristato-13-acetato (<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>)
p	Significância estatística
p53	Proteína supressora de tumor de 54KDalton (<i>tumor protein 53</i>)
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PBS	Tampão salino fosfato (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Ph	Cromossomo Philadelphia (<i>Philadelphia Chromosome</i>)
PI	Iodeto de propídio (<i>Propidium Iodate</i>)
PI3K/Akt	Fosfatidilinositol 3 quinase dependente de Akt (<i>Phosphatidylinositol 3 – kinase Akt dependent</i>)
PMSF	Fluoreto de fenil-metano-sulfonil (<i>phenylmethanesulfonylfluoride</i>)
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos (<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor</i>)
pPTEN	Homólogo de tensina e fosfatase fosforilado (<i>Phosphorylated phosphatase and tensin homolog</i>)
pRB	Proteína supressora tumoral (<i>Retinoblastoma protein</i>)
PUMA	Proteína pró-apoptótica membro da família Bcl-2 (<i>p53 Upregulated Modulator of Apoptosis</i>)
PVDF	Polímero fluorado usado como termoplástico (<i>polyvinylidene difluoride</i>)
r18s	Unidade ribossomal 18
RAJI	Linhagem tumoral de Linfoma de Burkitt
R _f	Razão de Frente

RIP	Proteína associada ao receptor (<i>Receptor-Interacting Protein</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RPMI-1640	Meio de cultura para células e tecidos (Roswell Park Memorial Institute médium)
RTK	Receptor de tirosina quinase (<i>Receptor Tyrosine Kinase</i>)
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio – Eletroforese em gel de poliacrilamida (<i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SOD1	Superóxido dismutase 1 (<i>Superoxide Dismutase 1</i>)
Src	Proto-oncogene relacionado à progressão tumoral (<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase</i>)
STAT-3	Fator de transcrição e transdução de sinal (<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>)
T47D	Linhagem tumoral de mama
TAMs	Macrófagos associados a tumores (<i>Tumor-Associated Macrophages</i>)
TLC	Cromatografia em camada delgada (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumoral Necrosis Factor</i>)
TNFR1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral (<i>Tumoral Necrosis Factor Receptor 1</i>)
TRADD	Domínio protéico de morte associado ao receptor do fator de necrose tumoral (<i>TNFR-Associated Death Domain Protein</i>)
TRAF-1	Fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral (<i>TNFR-associated factor</i>)
TRAF-2	
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>)
Tyk2	Tirosina Quinase 2 (<i>Tyrosine Kinase 2</i>)
TZDs	Tiazolidinas
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular (<i>Vascular Endothelium Growth Factor</i>)

SUMARIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIII
SUMARIO	XVII
1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	23
2.1. GERAL	23
2.2. ESPECÍFICOS	23
3. JUSTIFICATIVAS	25
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
4.1. CÂNCER: CONSIDERAÇÕES GERAIS	27
4.2. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER	28
4.3. INFLAMAÇÃO E CÂNCER	31
4.4. NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS	33
4.4.1. LEUCEMIAS	33
4.4.2. LINFOMAS	33
4.5. VIAS DE INDUÇÃO DE MORTE CELULAR	34
4.5.1. APOPTOSE	34
4.5.2. AUTOFAGIA	37
4.5.3. NECROSE	38
4.5.4. ESTRESSE OXIDATIVO	39
4.6. TRATAMENTO DO CÂNCER	40
4.7. ACRIDINAS	42
4.8. TIAZOLIDINAS	43
4.9. TIAZACRIDINAS	44

4.9.1. LPSF/AC-34: ESTADO DA ARTE DA MOLÉCULA EM ESTUDO	47
4.9.2. LPSF/AC-129: ESTADO DA ARTE DA MOLÉCULA EM ESTUDO	48
5. REFERÊNCIAS	49
6. ARTIGO 1	55
7. ARTIGO 2	73
8. CONCLUSÕES	89
9. PERSPECTIVAS	91
10. ANEXOS	93
10.1. PARTE QUÍMICA	93
10.1.1. DESCRIÇÃO DA METODOLOGIA DE SÍNTESE	93
10.1.2. SÍNTESE DA 9-METIL-ACRIDINA (AC-1)	93
10.1.3. SÍNTESE DA ACRIDINA-9-CARBOXALDEÍDO (AC-2)	93
10.1.4. SÍNTESE DO 2-CIANO-ACRIDIN-9-IL-ACRILATO DE ETILA (IP-29)	94
10.1.5. SÍNTESE DO 3-(3-CLORO-BENZIL)-4-TIOXO-TIAZOLIDIN-2-ONA (TAS-1)	94
10.1.6. SÍNTESE DO 5-(ACRIDIN-9-IL-METILENO)-3-(3-CLORO-BENZIL)-TIAZOLIDIN-2,4-DIONA (LPSF/AC-34)	96
10.1.7. SÍNTESE DO 5-(ACRIDIN-9-IL-METILENO)-3-(3-CLORO-BENZIL)-4-TIOXO-TIAZOLIDIN-2-ONA (LPSF/AC-129)	96
10.1.8. CARACTERÍSTICAS FÍSICO -QUÍMICAS	97
10.1.8.1.PONTO DE FUSÃO	97
10.1.8.2.CROMATOGRAFIA	97
10.1.9. ESPECTROSCOPIA	99
10.1.9.1.ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO DE INFRAVERMELHO (IV)	99
10.1.9.2.ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN¹H)	
102	
10.1.9.3.ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS) E AVALIAÇÃO DO GRAU DE PUREZA POR HPLC	105
10.1.10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA PARTE QUÍMICA	109

Introdução

1. Introdução

Atualmente a maioria das formas de quimioterapia contra o câncer buscam atacar os mecanismos básicos da divisão celular (síntese e replicação do DNA, ciclo celular e alterações do citoesqueleto). Alguns medicamentos, como a doxorrubicina, vincristina, ciclofosfamida, paclitaxel, e topotecan possuem limitada seletividade frente à células normais. Este fato provoca alta citotoxicidade contra o tecido normal (SANCHEZ-GARCIA; VICENTE-DUENAS; COBALEDA, 2007). Na tentativa de minimizar este problema, se faz necessário procurar novos agentes terapêuticos que conseqüentemente fazem emergir novas classes de compostos.

Uma das classes bastante estudadas é a dos derivados de acridina, já bem conhecidos pela sua estabilidade química e biológica e a sua capacidade de formar ligações com a molécula de DNA ou RNA, o que resulta na interferência das funções biológicas celulares (BELMONT; DORANGE, 2008; CHOLEWIŃSKI; DZIERZBICKA; KOŁODZIEJCZYK, 2011). Um dos representantes desta classe é a N-(4-(acridin-9-il-amino)-3-metoxifenil)-metanossulfonamida também chamada Amsacrina ou m-AMSA (DEMEUNYNCK; CHARMANTRAY; MARTELLI, 2001) que tem sido utilizada no tratamento de leucemias agudas e linfomas. Porém a amsacrina não tem sido significativamente eficaz no tratamento de tumores sólidos (BARROS et al., 2012). Nesse contexto, muitos estudos têm demonstrado a importância de se buscar novos derivados de acridina com potencial anticancerígeno para o desenvolvimento desta classe de compostos utilizando alguns dos substituintes já conhecidos da química orgânica como nitro, metoxi, metil, aminoácidos, aminoalquilamino ou hidroxialquilamino (CHOLEWIŃSKI; DZIERZBICKA; KOŁODZIEJCZYK, 2011; DENNY, 2002; GALDINO-PITTA et al., 2013; GURRALA; BABU; RAJU, 2011).

Por outro lado, há outra classe de compostos também conhecidos na terapêutica: os derivados de tiazolidina. Como primeiro representante desta classe tivemos a ciglitazona seguido posteriormente da englitazona, troglitazona e pioglitazona. Atualmente, a glitazona ainda em uso é a pioglitazona, que vem sendo utilizada no controle terapêutico do diabetes (JAIN; VORA; RAMAA, 2013). Estudos com derivados tiazolidinínicos têm demonstrado a sua capacidade em diminuir o nível de hiperglicemia, hiperlipidemia e resistência à insulina (DA COSTA LEITE et al., 2007). Além disso, estudos de síntese química, de *docking* e de efeitos biológicos demonstram as propriedades anti-inflamatórias de tiazolidinadionas (BARROS et al., 2010; SANTIN et al., 2013). Estes agentes atuam estimulando um membro da família de receptores nucleares de hormônios, o receptor ativado por proliferador de peroxissomos γ (PPAR γ) e sua ligação ao receptor conduz a modulação da expressão de genes específicos (ZHANG et al., 2010).

O PPAR γ desempenha um importante papel na proliferação celular, diferenciação e apoptose. O efeito antiproliferativo do PPAR γ tem sido relatado em muitas linhagens celulares como mama, cólon, próstata, e pulmão (SERTZNIG et al., 2007; WOO et al., 2011; YIN et al., 2001). Agonistas de PPAR γ como a ciglitazona podem inibir o crescimento de glioblastoma de maneira dose-dependente além de induzir alterações no ciclo celular e apoptose além de inibir a via de sinalização de EGF/bFGF através da via Tyk2-Stat3 e expressão de PPAR γ (CHEARWAE; BRIGHT, 2008),

Um estudo clínico de fase II mostrou que 14 pacientes portadores de glioblastoma quando tratados com inibidores de ciclo-oxigenase 2 (COX-2) como pioglitazona e rofecoxibe combinados à quimioterapia convencional de baixa dose utilizando capecitabina ou temozolomida responderam melhor ao tratamento. Quatro desses pacientes tiveram a proliferação tumoral do glioblastoma estabilizada durante os 3 meses de tratamento (HAU et al., 2008).

Assim, o conhecimento adquirido com o processo de síntese destas duas classes de compostos, tem levado muitos grupos de pesquisa a sintetizar novas moléculas antitumorais. Nas últimas décadas, Pitta e colaboradores têm se dedicado extensivamente à pesquisa para a obtenção de moléculas com melhor eficácia para o tratamento de câncer. Para tal, tem se utilizado a estratégia de acoplar os núcleos acridina e tiazolidina a fim de se obter uma nova classe de compostos, os derivados tiazacridínicos (BARROS et al., 2012; GALDINO-PITTA et al., 2013).

Desse modo, este trabalho busca avaliar a atividade biológica de dois representantes desta classe de compostos em relação à citotoxicidade celular no intuito de encontrar um candidato à quimioterápico mais seletivo frente ao câncer. Além disso, o trabalho visa estabelecer quais vias de sinalização celular relacionadas com o metabolismo e mecanismos de morte celulares podem ser modulados pela mistura de compostos tiazacridínicos.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Geral

Avaliação do efeito anti-tumoral da mistura dos derivados tiazacridínicos LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129.

2.2. Específicos

- Sintetizar a mistura dos derivados tiazacridínicos LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129;
- Obter as características físico-químicas e caracterizar as estruturas químicas dos derivados LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 por espectroscopia no infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e espectrometria de massas;
- Avaliar a pureza dos derivados tiazacridínicos LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 por HPLC;
- Testar a seletividade da mistura dos derivados tiazacridínicos LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 frente a células mononucleadas do sangue periférico de voluntários sadios;
- Avaliar a citotoxicidade e citostaticidade *in vitro* em diferentes linhagens de células tumorais da mistura dos derivados tiazacridínicos LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 através de citometria de fluxo;
- Estabelecer quais mecanismos moleculares estão relacionados à atividade anticâncer da mistura dos derivados tiazacridínicos LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 através da avaliação da expressão gênica por RT-PCR.

Justificativas

3. Justificativas

Câncer é um termo genérico utilizado para designar um vasto grupo de doenças que afetam o organismo humano e seu desenvolvimento está relacionado com fatores genéticos e fatores externos como agentes físicos, químicos ou biológicos. Está também relacionado diretamente ao envelhecimento pois com a idade avançada os mecanismos de reparo celular são menos efetivos. Desse modo, o câncer tem sido uma das causas principais de morte sendo responsável por 7,6 milhões de morte no mundo em 2008 e de acordo com projeções realizadas são esperadas aproximadamente 13,1 milhões de mortes no mundo em 2030 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). O tratamento atual mais frequentemente utilizado para o câncer consiste de quimioterapia onde são utilizados alguns dos agentes quimioterápicos existentes como agentes alquilantes, antimetabólitos, antibióticos e inibidores mitóticos que podem ser combinados com a remoção cirúrgica dos tumores e radioterapia (GALDINO-PITTA et al., 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Dentre os agentes quimioterápicos existentes temos a molécula de acridina que teve sua atividade anticâncer primeiramente relatada na década de 20 (DEMEUNYNCK; CHARMANTRAY; MARTELLI, 2001; GALDINO-PITTA et al., 2013). Desde então o seu mecanismo de ação tem sido estudado (DENNY, 2002). Os dados existentes relatam que a planaridade da sua estrutura aromática tem a capacidade de se intercalar com a fita dupla de DNA, interferindo assim em funções celulares principalmente àquelas relacionadas aos mecanismos de síntese e replicação do DNA. Adicionalmente, sua atividade biológica está relacionada à interação com o DNA nuclear de maneira sequência específica e à alvos biológicos como as topoisomerasas I e II, telomerase e proteínas quinase (BARROS et al., 2012). O uso clínico de derivados acridínicos ainda é limitado pois existem problemas como alta citotoxicidade, baixa seletividade, efeitos adversos, resistência e baixa biodisponibilidade que encoraja o estudo mais aprofundado dessas moléculas a fim de promover modificações estruturais como mudanças de substituintes a partir da estrutura padrão da acridina (SÁNCHEZ et al., 2006).

A atividade antineoplásica dos compostos tiazolidínicos também vem sendo exploradas devido à relação existente entre inflamação e câncer. Esta conexão têm sido explorada, de modo à inclusão da inflamação como um “Hallmarker” do câncer, no qual o ambiente inflamatório tumoral atua em prol da invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011). É por esse motivo que agonistas de PPAR γ tem sido relacionados à capacidade de modular a proliferação e a apoptose de muitos tipos celulares de cânceres humanos como, por exemplo, pulmão, mama, cólon, próstata e bexiga (BARROS et al., 2012). Neste contexto hibridizar anéis acridínicos e tiazolidínicos funcionam como possível estratégia terapêutica.

Revisão Bibliográfica

4. Revisão Bibliográfica

4.1. Câncer: considerações gerais

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis sendo considerada uma das doenças de tratamento mais difícil pois envolve o completo entendimento de seus mecanismos de desenvolvimento (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

O surgimento do câncer está geralmente associado à causas que podem ser externas e internas. As causas externas, como substâncias químicas, irradiação, vírus e fatores comportamentais, constituem os fatores de risco ambientais. De todos os casos de câncer, 80 a 90% estão associados a fatores ambientais (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011).

As causas internas, como os hormônios, condições imunológicas e mutações genéticas são, na maioria das vezes, geneticamente predeterminadas e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Apesar do fator genético exercer um importante papel na formação dos tumores (oncogênese), são raros os casos de câncer que se devem exclusivamente a fatores hereditários, familiares e étnicos. Alguns tipos de câncer, como, por exemplo, os cânceres de mama, estômago e intestino, parecem ter um forte componente familiar, embora não se possa afastar a hipótese de exposição dos membros da família a uma causa comum. Existem ainda alguns fatores genéticos que tornam determinadas pessoas mais susceptíveis à ação dos agentes cancerígenos ambientais. Isso parece explicar por que algumas delas desenvolvem câncer e outras não, quando expostas a um mesmo carcinógeno (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011).

As causas externas e internas podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais. O surgimento do câncer depende da intensidade e da duração da exposição das células aos agentes causadores de câncer (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011).

4.2. Epidemiologia do câncer

O número de casos de câncer tem aumentado de maneira considerável em todo o mundo configurando-se, na atualidade, como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial estando em segundo lugar das causas de morte ficando atrás apenas de doença cardiovascular. Estima-se para o ano de 2030, 10,7 milhões de novos casos de câncer nos países em desenvolvimento (Figura 1) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013a; GUERRA; GALLO, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

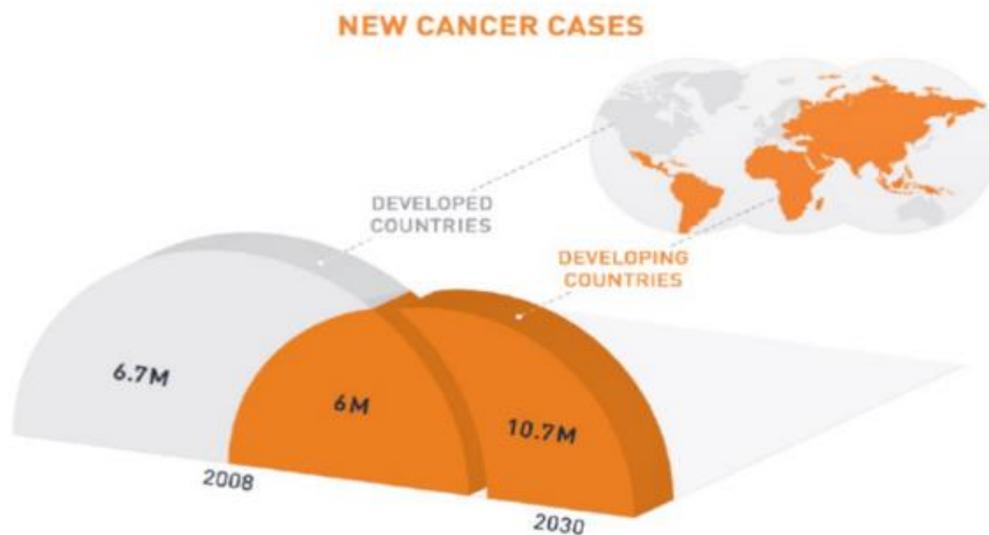


Figura 1: Estimativa de novos casos de câncer no mundo (adaptada) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013b)

Adicionalmente, além da distribuição por países, amplas variações na frequência do câncer são observadas em relação às formas de câncer e ao sexo (Figura 2). Para o sexo masculino, o principal tipo de câncer é o de próstata. Para o sexo feminino, o principal é o câncer de mama. Quanto ao número de mortes, dados de 2008, mostram que o câncer foi a principal causa de morte no mundo totalizando 7,6 milhões de mortes (13% de todas as mortes) (Figura 3) (WORLD HEALTH ORGANIZATION CATALOGUING-IN-PUBLICATION DATA, 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013)

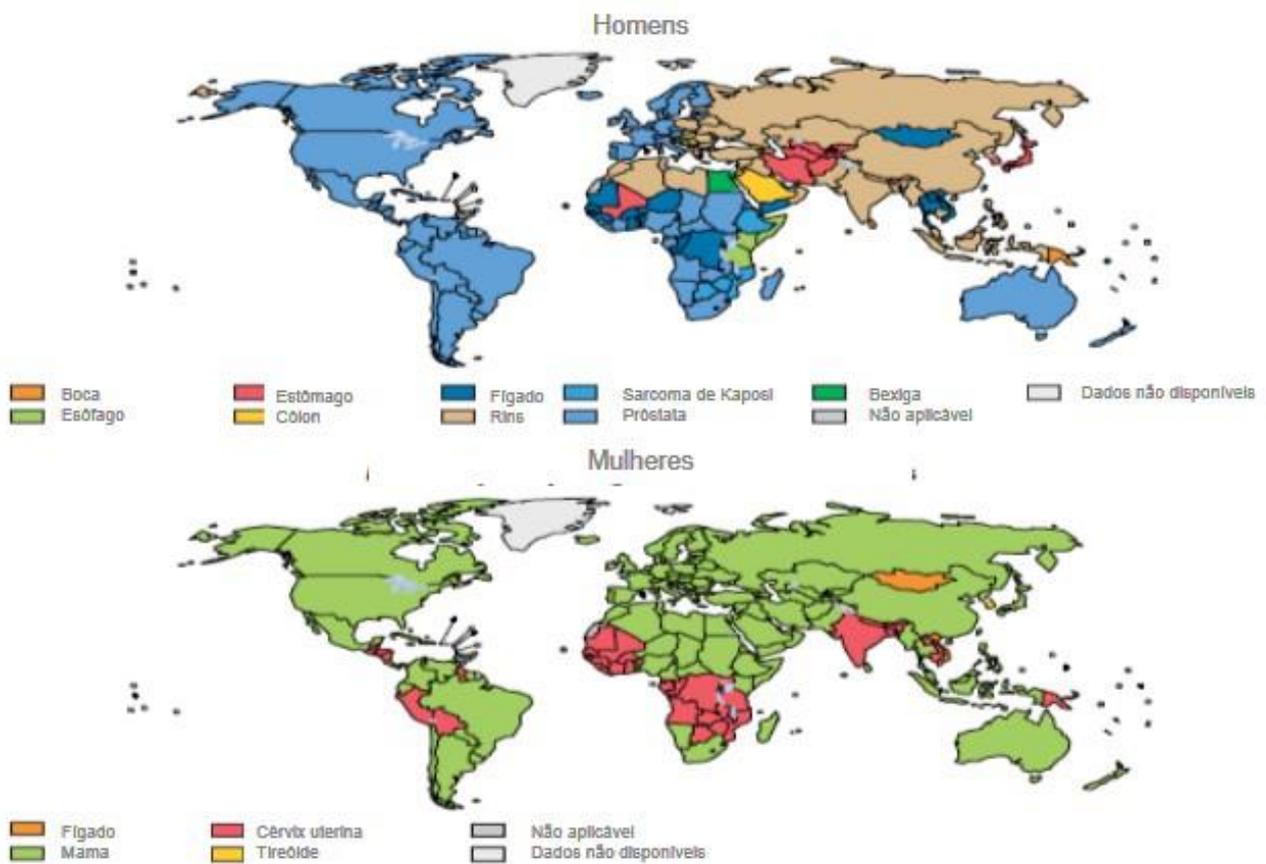


Figura 2: Tipos de câncer mais frequentemente diagnosticados no mundo por país e sexo em 2008 (WORLD HEALTH ORGANIZATION CATALOGUING-IN-PUBLICATION DATA, 2011)

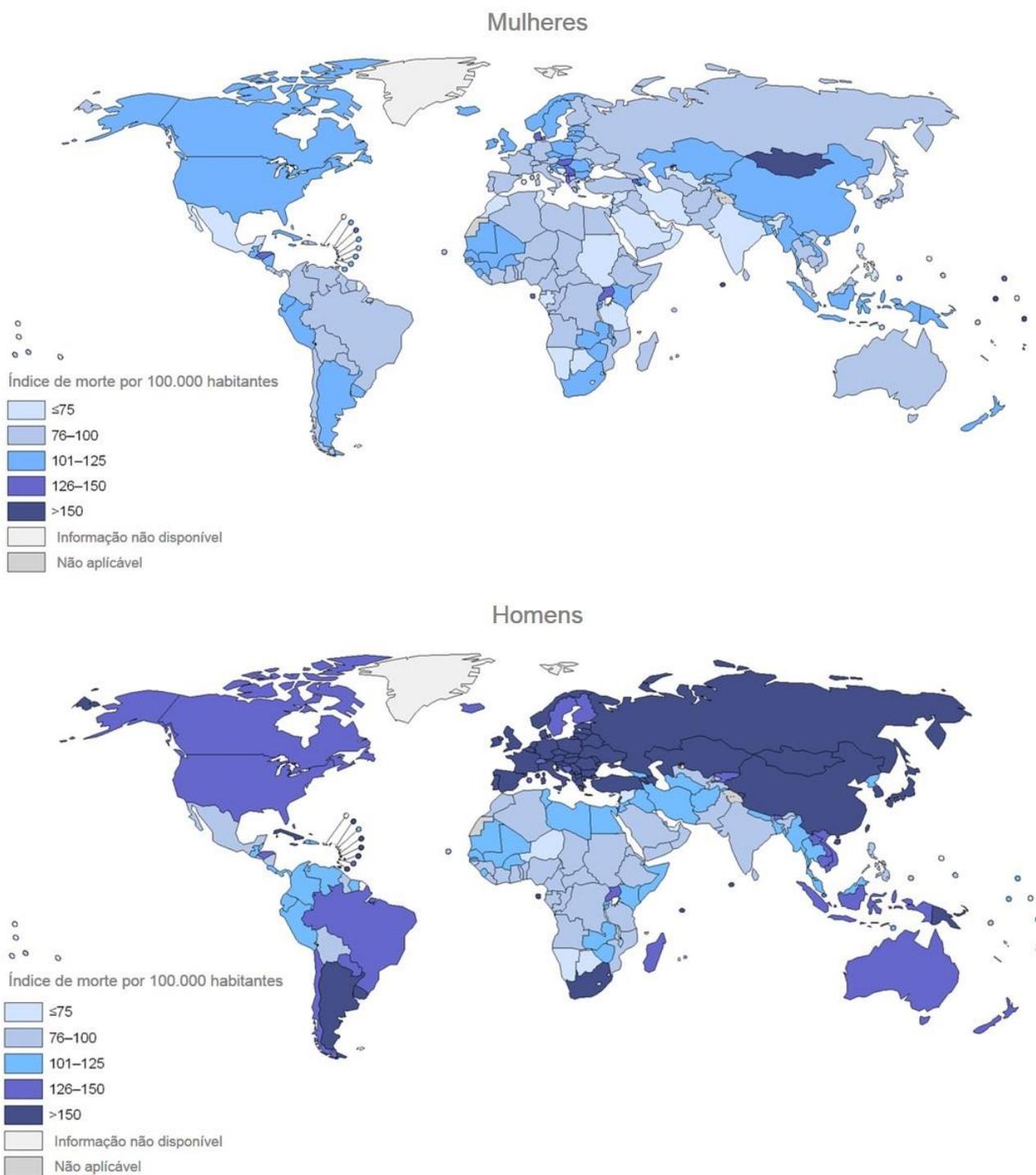


Figura 3: Índice de morte por 100.000 habitantes por país e sexo em 2008 (adaptada de Global Health Observatory Map Gallery)

O câncer, no Brasil, constitui a segunda causa de morte por doença. Foi responsável, em 1994, por 10,86% dos 887.594 óbitos registrados. Dos óbitos por neoplasias, 53,81% ocorreram entre os homens e 46,05%, entre as mulheres. Somente na Região Nordeste, as neoplasias representam a terceira causa de morte por doença, respondendo por 6,34% dos óbitos atestados, mesmo assim ficando apenas 0,02 ponto percentual aquém das doenças infecciosas e parasitárias (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011).

Por causa das diferenças no acesso ao tratamento das leucemias, observa-se uma considerável variação entre populações com relação à sobrevida. Entre a população masculina dos Estados Unidos e da Europa Ocidental, a sobrevida em 5 anos é de 43%; no Japão, observa-se uma sobrevida de 25%; na América do Sul, 24%; Índia, 19%; Tailândia, 15%, e África subsaariana, 14%. Em crianças, em áreas com acesso a esses tratamentos, a sobrevida relativa em 5 anos alcança 80% (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011).

Foram estimados cerca de 356 mil casos novos e 191 mil óbitos por Linfoma Não-Hodgkin no mundo para o ano de 2008. América do Norte, Austrália, Nova Zelândia e algumas partes da Europa possuem as mais altas taxas de incidência desse tipo de câncer. Em geral, essas taxas são baixas na África, com exceção do linfoma de Burkitt (um subtipo de LNH), que é causado pela infecção do vírus Epstein-Barr (EBV) entre crianças. Além do EBV, outras infecções, como a ocasionada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), estão associadas a um maior risco no desenvolvimento dos LNH (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011).

4.3. Inflamação e Câncer

A inflamação tem sido observada como causa predisponente de câncer na evolução de hepatite, esofagite, colite e pancreatite para carcinomas. Adicionalmente, tumores onde a inflamação não tem relação causal no seu surgimento, como por exemplo, o câncer de mama, a inflamação pode estar presente mesmo que latente no sítio do tumor. Esse fato leva a crer que as células inflamatórias e mediadores estão presentes no microambiente da maioria ou provavelmente todos os tumores, independentemente da causa. Tal observação tem levado à procura por conexões entre eventos genéticos que causam transformações neoplásicas e inflamação (GERMANO; ALLAVENA; MANTOVANI, 2008). Inflamação e câncer estão ligados por duas vias: a via extrínseca dirigida por condições que causam respostas inflamatórias não-resolvidas e a via intrínseca dirigida por oncogenes e genes supressores tumorais que ativam a expressão de programas relacionados à inflamação (BALKWILL; MANTOVANI, 2012).

O infiltrado inflamatório de um tumor pode incluir populações de diferentes leucócitos como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, mastócitos e linfócitos, todos sendo capazes de produzir diversos tipos de mediadores. As células presentes em maior número são macrófagos, denominados de macrófagos associados ao tumor (TAMs, tumor-associated macrophages), podendo representar mais da metade da massa tumoral (GARCIA, 2006). A inflamação tem papel paradoxal durante o desenvolvimento tumoral. O resultado da associação do tumor à inflamação depende da dominância tanto das ações promotoras quanto supressoras de tumor. Recentemente, estudos comprovam que a radioterapia e outros quimioterápicos resultam em substancial morte celular dos tumores e em torno deles desencadeia uma resposta inflamatória local e/ou sistêmica capaz de aumentar a apresentação de antígenos cruzados que estão associados ou não ao tumor (MATTAROLLO et al., 2011).

A inflamação associada ao câncer é um alvo atrativo no futuro das terapias antitumorais. Estudos populacionais demonstram que o uso prolongado da aspirina ou outros antiinflamatórios não esteroidais retarda o desenvolvimento de adenomas pré-malignos e pode também reduzir a incidências de diferentes formas de neoplasia. Citocinas pró-inflamatórias inicialmente expressadas pelos leucócitos infiltrados e por células tumorais são o alvo central dessa potencial terapia anticâncer (GERMANO; ALLAVENA; MANTOVANI, 2008). Nesse contexto, há evidências recentes que mostram a propriedade sub-regulatória das citocinas pró-inflamatórias sobre o PPAR γ . Além disso, tais estudos apontam que essa sub-regulação pode ser revertida pelo tratamento com agonistas de PPAR como por exemplo TZDs (MURPHY; HOLDER, 2000). Além de efeitos antiinflamatórios, os agonistas de PPAR γ tem demonstrado efeitos antineoplásicos em muitos tipos de tumores inibindo o crescimento celular, apoptose e interferindo na diferenciação de células neoplásicas (YOUSSEF; BADR, 2011). Muitos dos mecanismos contribuem para a atividade antitumoral desses compostos como a modulação negativa de STAT-3 através de mecanismos diretos e indiretos (VITALE et al., 2012).

Esses efeitos de anti-proliferação e pro-diferenciação dos ativadores de PPAR γ sugerem que estes compostos possam ser utilizados no retardo da proliferação da des-diferenciação de células tumorais sendo este um alvo promissor para as novas estratégias de identificação e desenvolvimento de moduladores seletivos de PPAR γ (MURPHY; HOLDER, 2000; YOUSSEF; BADR, 2011).

4.4. Neoplasias hematológicas

4.4.1. Leucemias

Leucemias são um grupo de doenças neoplásicas caracterizadas pelo acúmulo de leucócitos malignos na medula óssea e no sangue. Clínica e patologicamente, subdivide-se em 4 grandes grupos: leucemias agudas e crônicas podendo se subdividir em linfóides e mielóides (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2008). Nas leucemias agudas as transformações malignas ocorrem em células-tronco hematopoéticas ou em progenitores primitivos interferindo na velocidade de produção, na diminuição da apoptose e no bloqueio da diferenciação celular sendo característico da doença um aumento rápido nos números de células imaturas do sangue, os blastos. Para o diagnóstico, considera-se leucemia aguda a presença de 20% de blastos no sangue periférico ou na medula óssea. Dependendo do tipo de blasto em proliferação pode ser subdividida em leucemia mielóide aguda (LMA) quando mieloblastos ou em leucemia linfoblástica aguda (LLA) quando linfoblastos. Em ambos os casos o número de blastos é consideravelmente aumentado (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2008; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011).

Nas formas crônicas da leucemia, é evidente a presença de células-tronco multipotentes que causam aumento excessivo no número de células maduras anormais e é responsável pela maioria das características crônicas. Sendo uma anomalia adquirida de células tronco hematopoéticas, o cromossomo Ph está presente tanto em células da linhagem mielóide (granulocítica, eritróide e megacariocítica) quanto da linhagem linfóide (células B e T). Ao contrário das leucemias agudas, a forma crônica tem progressão lenta podendo levar meses ou até anos para evoluir (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2008).

4.4.2. Linfomas

Os linfomas são neoplasias malignas originadas nos linfonodos (gânglios) que são encontrados principalmente no pescoço, virilha, axilas, pelve, abdome e tórax. Os linfonodos produzem e armazenam leucócitos três tipos de linfócitos: os linfócitos B, os linfócitos T e as células "natural killer" (células NK) (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011).

Pessoas com deficiência de imunidade, em consequência de doenças genéticas hereditárias, uso de drogas imunossupressoras e infecção pelo HIV, têm maior risco de desenvolver linfomas.

Pacientes portadores do vírus Epstein-Barr, HTLV1, e da bactéria *Helicobacter pylori*, têm risco aumentado para alguns tipos de linfoma. Muitos dos agentes químicos e físicos estão relacionados com o aumento de risco: inseticidas (organofosforados e fenoxiherbicida), anticonvulsivantes (difenilhidantoina) e outros agentes químicos como benzenos, tricloroetileno, tiner de tinta, graxas e óleos. Além disso, a exposição a altas doses de radiação também está relacionada ao alto grau de risco de desenvolvimento da doença. (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA, 2013)

Os linfomas são divididos em duas categorias principais: os linfomas de Hodgkin e todos os outros linfomas, denominados linfomas não-Hodgkin (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011).

No linfoma de Hodgkin, um linfócito (geralmente um linfócito B) se transforma de uma célula normal em uma célula maligna, capaz de crescer descontroladamente e disseminar-se. Nos linfonodos a célula maligna começa a produzir clones que podem se disseminar para tecidos adjacentes, e, se não tratadas, podem atingir outras partes do corpo através dos vasos linfáticos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011).

O linfoma não-Hodgkin (LNH) é derivado de subpopulações de células brancas do sangue (células B e T), originadas na medula óssea. Avanços na imunologia e na biologia molecular têm auxiliado muito na detecção desses tumores, além de abrir caminhos para novas estratégias de tratamento. Os linfomas não-Hodgkin compreendem um grande grupo heterogêneo de cânceres do sistema linfóide, com diferentes locais de origem, diferentes comportamentos clínicos, e principalmente pelo tipo de tratamento e resposta (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA, 2013).

4.5. Vias de indução de morte celular

4.5.1. Apoptose

A morte e a subsequente remoção das células do corpo humano é um processo que ocorre ao longo de toda a vida. A homeostase dos tecidos está baseada na renovação celular. Em todas as fases da vida os processos de apoptose e de crescimento celular estão rigorosamente coordenados e balanceados, assegurando o correto funcionamento do sistema imune. Eventos como danos ao DNA ou anormalidades cromossômicas desencadeiam a apoptose em células que estão danificadas. Em células cancerosas, ocorrem mutações genéticas que conferem a capacidade de resistir aos sinais apoptóticos (NOTEBORN, 2009).

A regulação genética da apoptose está dividida em duas vias: a intrínseca ou via mitocondrial e a extrínseca ou via dos receptores de morte (Figura 4).

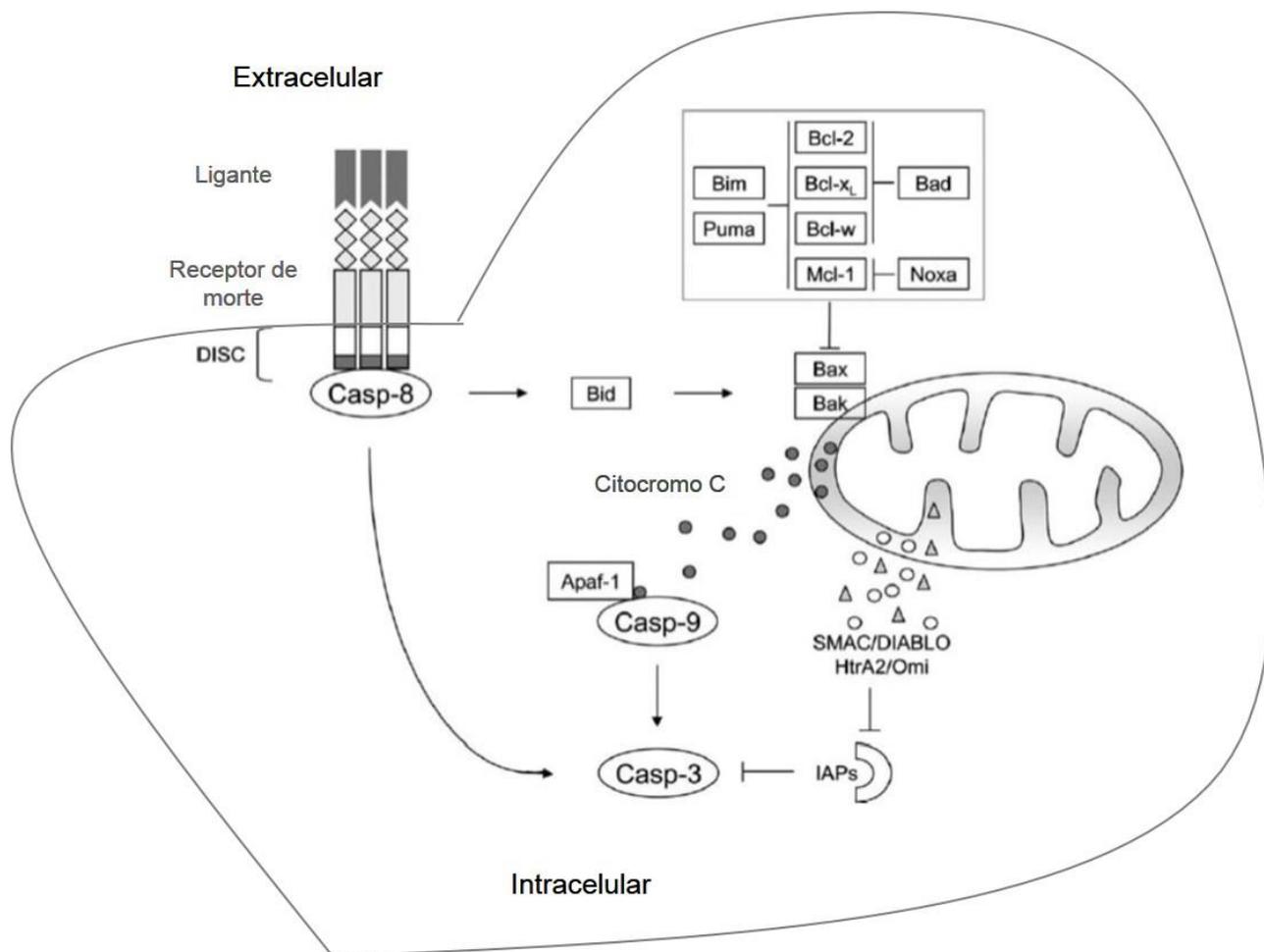


Figura 4: Ativação das vias intrínseca e extrínseca da apoptose a partir de ligantes (fatores de estresse ambientais e estímulos citotóxicos) (adaptado) (DE BRUIN; MEDEMA, 2008).

A indução da apoptose pela via extrínseca é desencadeada pela ativação de receptores por ligantes de Fas ou FasL (Fas (CD95/Apo-1); por ligante de TNF (tumoral necrosis fator) ou TRAIL (DR4, DR5); e por receptor de fator de necrose tumoral (TNFR1). A ativação de CD95, DR4 e DR5 leva primeiramente à formação de DISC (death-inducing signaling complex) formado pelo recrutamento do domínio de morte associado ao Fas (FADD - Fas-associated death domain), caspase 8 (e em alguns casos a caspase 10) e a proteína inibitória do FLICE (FLIP – FLICE inhibitory protein). A caspase 8 iniciadora é processada e ativada amplificando a cascata apoptótica pela ativação de caspases efetoras. Se após a ativação de receptores de morte, as células tiverem baixos níveis de formação de DISC e caspase 8 ativadas, a progressão da apoptose dependerá de um loop de amplificação induzido pela clivagem da proteína Bid pela caspase 8 e a subsequente liberação de

citocromo c da mitocôndria. Em contrapartida, a sinalização por TNFR1 resulta na formação de dois complexos de sinal. A formação do complexo 1 induzida por TNF acarreta no recrutamento de RIP (receptor-interacting protein), TRADD (TNFR-associated death domain protein) e TRAF-1 e -2 (TNFR-associated factor). Como este complexo carece de FADD e pró-caspase 8 ocorre a translocação para o citosol onde FADD, caspase 8 e 10 e FLIP são finalmente recrutados para a formação do tradossomo ou complexo II onde age a caspase 8 ativada (FRANCO et al., 2009).

O gatilho para que ocorra apoptose é controlado pelo equilíbrio entre membros pró e antiapoptóticos da família de proteínas Bcl-2. As proteínas Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 e A1 são inibidoras de apoptose agindo pela ligação seguida de supressão das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak. Quando estão livres da ação inibitória das proteínas anti-apoptóticas, Bax e Bak perturbam a integridade da membrana externa mitocondrial causando a liberação de proteínas de sinalização pro-apoptóticas sendo a mais importante, o citocromo c.

A partir de então, ocorre a ativação de uma cascata de caspases que agem através de vias proteolíticas induzindo múltiplas modificações celulares associadas à programação apoptótica. As caspases iniciadoras 8 e 9 que normalmente permanecem latentes, iniciam uma cascata de proteólises que envolve efetores de caspases responsáveis pela fase de execução da apoptose (caspases 3, 6 e 7) na qual a célula é progressivamente desmontada e então consumida por células vizinhas e fagócitos (HANAHAN; WEINBERG, 2011; NOTEBORN, 2009). Na falta de TNF α , as subunidades de TNFR1 espontaneamente trimerizam para a membrana plasmática. Uma vez que ocorra a ligação com o receptor, estes assumem uma mudança conformacional que permite que suas caudas citoplasmáticas recrutem múltiplas proteínas como o domínio de morte associado ao TNF (TRADD - TNFR-associated death domain), RIP1, inibidor celular de apoptose 1 e 2 (cIAP – cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2), fatores 2 e 5 associados ao TNF (TRAF - TNFR-associated factor 2 and 5). Como resultado, próximo à membrana plasmática é gerada uma grande estrutura chamada complexo I que ativa a via de sinalização do NF κ B pró-sobrevivência. A ligação do TNF α ao TNFR1 leva a sua internalização e a formação da morte citosólica induzida pelo complexo de sinalização DISC também conhecido como complexo II. A poliubiquitilação de RIP1 não só afeta a ativação de NF κ B mas também influencia a transição para o complexo I e para o complexo II. A desubiquitilação de RIP1 assim como de RIP3 são inativadas por clivagem proteolítica pela caspase 8 assim como inicia a cascata de caspases pro-apoptóticas (NIKOLETOPOULOU et al., 2013).

A via intrínseca da apoptose também descrita como a via mitocondrial (Figura 2) é regulada pela família de proteínas Bcl-2 (B-cells lymphoma protein-2 family) que contém membros pró e antiapoptóticos (NOTEBORN, 2009). Sua ativação se dá por uma variedade de estímulos citotóxicos ou fatores de estresse ambientais. Embora os mecanismos que levam ao desencadeamento da

apoptose sejam diferentes, ambas as vias convergem na liberação de proteínas pró-apoptóticas da mitocôndria como o citocromo c. Essa liberação está associada com a abertura de poros de transição de permeabilidade de mitocôndria (MPTP - mitochondrial permeability transition pore) e a perda de potencial de membrana mitocondrial (MMP – mitochondrial membrane potential). A via intrínseca é também regulada por proteínas da família Bcl-2 (Bad, Bid, Bim, NOXA e PUMA) que regulam as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL que por sua vez inibem Bax e Bak. Quando as proteínas Bad, Bid, Bim, NOXA e PUMA são induzidas ou ativadas, ocorre a desrepressão de Bax e Bak por ligação direta e inibição de Bcl-2 e de outros membros da família anti-apoptótica. Tal fato é crucial para induzir a permeabilização da membrana externa mitocondrial e liberar o citocromo c que consequentemente levará ao recrutamento de APAF-1 dentro do apoptossomo e a ativação da caspase 9 para a subsequente ativação das caspases efetoras (FRANCO et al., 2009).

Os tumores adquirem resistência à apoptose através de muitas estratégias como por exemplo a mutação que induz perda da função da proteína supressora de tumor p53. Uma vez que p53 pode promover a apoptose pela ativação da transcrição de proteínas Bcl-2 pró-apoptóticas quando ocorre danos ao DNA, uma p53 não-funcional pode diretamente estar ligada a falha na indução da apoptose após estresse celular. Uma outra modificação anti-apoptótica observada em tumores humanos envolve a família de proteínas Bcl-2, como a perda de função pró-apoptótica de Bax e Bak ou a superexpressão de proteínas anti-apoptóticas. Em um subtipo de linfoma de células B, Bcl-2 é altamente expressa como consequência da translocação do gene de Bcl-2 próximo de um gene de imunoglobulina. Esta translocação está de acordo com a hipótese de que a resistência à apoptose favorece a formação de tumores (DE BRUIN; MEDEMA, 2008)

4.5.2. Autofagia

Autofagia é um processo que ocorre em células eucarióticas em baixos níveis nas células normais com a finalidade de manter a homeostase pela eliminação de proteínas e organelas desnecessárias, injuriadas ou senescentes. Estruturas citosólicas são sequestradas em uma vesícula membrana dupla, o autofagossomo, que as digerem por hidrólise e as reciclam. Este processo de engolfamento de material citoplasmático é seguido pela fusão do autofagossomo com lisossomos formando o autolisossomo onde o material será degradado por hidrolases ácidas específicas. Além do papel fisiológico, este processo tem sido observado em níveis elevados em muitas condições patológicas como miopatias, degeneração neuronal, doença infecciosa e câncer (COATES; GALANTE; BOLD, 2010); (NIKOLETOPOULOU et al., 2013).

Fome, fatores ambientais e hormonais tais como privação de nutrientes, depleção de fatores de crescimento e hipóxia são conhecidos por ativar a autofagia. Como consequência, a degradação dos componentes citoplasmáticos é aumentada em resposta a condições de estresse (NIKOLETOPOULOU et al., 2013).

Além disso a autofagia é induzida como resposta adaptativa ao estresse do retículo endoplasmático. Quando ocorre desequilíbrio da homeostase do cálcio e da função do retículo aumentam os níveis de autofagia e de apoptose (NIKOLETOPOULOU et al., 2013).

Na membrana dupla da mitocôndria se ligam vesículas tipicamente observadas em autofagia e estão presentes em muitos dos tumores humanos indicando que a autofagia ocorre *in vivo*. A autofagia desempenha um papel supressivo de tumor em estágios iniciais de tumorigênese. Pode prevenir que uma célula normal venha a se tornar uma célula maligna pela degradação de organelas danificadas reduzindo, desse modo o estresse celular, ou ainda pela degradação de proteínas específicas que aumentam a formação de tumores (DE BRUIN; MEDEMA, 2008).

4.5.3. Necrose

Ao contrário da apoptose onde células moribundas são consumidas quase que invisivelmente por suas vizinhas, na necrose as células podem tornar-se inchadas e explodir liberando seu conteúdo para o microambiente tecidual. Embora a necrose tenha sido historicamente vista como morte do organismo associada à exaustão e degradação, o conceito atual tem mudado: a morte celular por necrose é explicada pelo controle genético em algumas circunstâncias, em vez de ser um processo aleatório. Células necróticas são importantes pois liberam sinais pró-inflamatórios dentro da célula e ao redor do microambiente tecidual. Como consequência, podem recrutar células inflamatórias do sistema imune que desempenham a função de amplificar a extensão do tecido danificado e remover debris associado à necrose (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Além disso, células necróticas podem liberar fatores regulatórios bioativos como a IL-1a a qual estimula diretamente as células viáveis da vizinhança a proliferar facilitando assim a progressão neoplásica. Consequentemente, a morte celular por necrose, embora aparentemente benéfica para contrabalançar a hiperproliferação associada ao câncer, pode vir trazer mais danos do que bem. Desse modo, neoplasias incipientes, potencialmente invasivas e tumores metastáticos podem ganhar uma vantagem por tolerar alguma etapa de morte celular por necrose fazendo com que células inflamatórias sejam recrutadas trazendo fatores estimulantes de crescimento para as células sobreviventes (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

4.5.4. Estresse oxidativo

Estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e metabólitos reativos denominados oxidantes ou espécies reativas de oxigênio (EROs) e sua eliminação por mecanismos protetores relatados como antioxidantes. Este desequilíbrio leva à danos de biomoléculas importantes e células causando impacto em todo organismo. EROs são produtos de um metabolismo celular normal e desempenham papéis vitais na estimulação de vias sinalizadoras em células de plantas e animais em resposta a modificações das condições ambientais intra e extracelulares. Muitas das EROs são geradas em células pela cadeia respiratória mitocondrial. Durante reações do metabolismo endógeno, células aeróbicas produzem EROs como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e peróxidos orgânicos como produtos normais da redução biológica do oxigênio molecular. A transferência de elétrons para o oxigênio molecular ocorre à nível de cadeia respiratória e a cadeia transportadora de elétrons é localizada na membrana mitocondrial. Sob condições de hipóxia, a cadeia respiratória mitocondrial também produz óxido nítrico (NO) que pode gerar espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Proteínas e lipídeos também são comumente alvos do ataque oxidativo e a modificação destas moléculas podem aumentar o risco de mutagênese (REUTER et al., 2010).

EROs podem promover muitos aspectos do desenvolvimento e progressão tumoral: (1) proliferação celular através da ativação de ERK1/2 e ligação independente da ativação de RTK); (2) evasão da apoptose por ativação de Src, NFκB ou fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K/Akt); (3) invasão tecidual e metástase por secreção na matriz extracelular (ECM) de metaloproteinasas (MMP) e (4) angiogênese pela liberação de fator de crescimento endotelial (VEGF) e angiopoetina (SOSA et al., 2013).

Altos níveis de estresse oxidativo induzem a ativação de p21 e a acumulação de p16 e p27 ao longo da ativação dos fatores de transcrição MAPK p38 e FOXO (*forkhead box O*) respectivamente. Essas proteínas levam ao sequestro da CDK-ciclina D e o ciclo celular para e em seguida a célula entra em senescência. Contudo, tratamento de células proliferativas com antioxidantes reduz os níveis de EROs ao mínimo o que leva à diminuição dos níveis de ciclina D1, à acumulação de p27 e à hipofosforilação de pRB que também termina na parada do ciclo celular na fase G1. Sendo assim fica claro que EROs agem sobre p16, p21, p27 e p53 regulando a transcrição e a atividade de ciclinas D que são essenciais para a progressão da fase G1 (DIAZ-MORALLI et al., 2013).

4.6. Tratamento do câncer

Para o tratamento do câncer, podem ser citados, além dos procedimentos cirúrgicos, outros que visam exterminar os tumores ou prevenir seu crescimento como a hormonoterapia, imunoterapia, autofagia, terapia fotodinâmica, radioterapia e quimioterapia. Dentre esses, as opções padrão são a cirurgia, a radiação e a quimioterapia (GALDINO-PITTA et al., 2013). Esta última por muito tempo foi utilizada de modo não específico e sistêmico utilizando altas doses de quimioterápicos. Atualmente a tendência é encontrar drogas que possuam mínimos efeitos colaterais e ao mesmo tempo de atividade antitumoral máxima. As etapas iniciais de desenvolvimento de alguns dos tratamentos de câncer levou à criação de muitos dos novos agentes anticâncer. A tecnologia avançada e o entendimento de modificações genéticas na transformação de uma célula normal em uma célula descontrolada tem facilitado a criação de uma nova geração de tratamentos (ABOU-JAWDE et al., 2003). A química orgânica e medicinal tem papel fundamental na criação de novos fármacos tendo como objetivo principal, desenhar, sintetizar e produzir novas moléculas com propriedades terapêuticas. Compostos que possuem anéis heterocíclicos são de grande importância recebendo uma atenção especial na área de química medicinal (JAIN; VORA; RAMAA, 2013).

Segundo Brody et al., 1997, os diversos agentes quimioterápicos podem ser classificados em:

1. Agentes alquilantes

O mecanismo de ação desses agentes consiste da formação de um íon carbônio positivo que reage com uma região rica em elétrons, principalmente o RNA ou o DNA, formando ácidos nucleicos modificados. Como exemplo de agentes alquilantes temos as mostardas nitrogenadas (mecloretamina, ciclofosfamida e clorambucil), as nitrosuréis (carmustina, lomustina) e os triazenos (dicarbazina) (BRODY, 1997).

2. Antimetabólitos

São agentes antineoplásicos que possuem a capacidade de mimetizar alguns dos componentes necessários para a síntese de RNA ou DNA. Bases púricas ou pirimídicas podem ser substituídas por esses agentes no momento da síntese de ácidos nucleicos interferindo diretamente na formação da molécula e conseqüentemente interferindo nas enzimas responsáveis pela função de síntese de ácidos nucleicos. A interferência maior no ciclo celular promovida pelo agentes antimetabólitos se dá na fase S. Os principais são o metotrexato (MTX), o 5-fluoracil (5-FU), a citarabina, a 6-mercaptopurina (6-MP) e a 6-tioguanina (6-TG) (BRODY, 1997).

3. Alcalóides

Compostos pertencentes a essa classe possuem a capacidade de bloquear a polimerização dos microtúbulos pois ligam-se à tubulina interferindo na formação do fuso mitótico durante a mitose

causando incorreta divisão dos cromossomos na metáfase e conseqüentemente morte celular. Nessa classe temos a vincristina e a vimblastina como exemplos (BRODY, 1997).

4. Antibióticos

Diversos mecanismos de ação estão relacionados com a ação de antibióticos sobre células tumorais. Os antibióticos mais utilizados são as antraciclina como a doxorrubicina e a daunomicina que atuam intercalando-se na dupla hélice de DNA e inibindo a ação da topoisomerase II (BRODY, 1997).

5. Agentes hormonais

Para o tratamento do câncer de mama, o tamoxifeno é utilizado. Sua ação anticâncer deve-se a sua capacidade em inibir receptores de estrogênio e ao mesmo tempo em inibir a produção do estrogênio principalmente na fase G1 do ciclo celular sendo por isso considerada uma droga antiestrogênica (BRODY, 1997)

6. Anticorpos monoclonais

Por algum tempo, o Interferon α foi considerado o tratamento padrão para a LMC utilizado sozinho ou em combinação com a citarabina. Transplante de células tronco podem até erradicar a leucemia contudo há ainda uma significativa taxa de morbidade e mortalidade. Então sabendo que a tirosina quinase desregulada era a responsável pelo desenvolvimento de LMC, várias pesquisas tiveram como alvo essa proteína que levou à descoberta do imatinib (ABOU-JAWDE et al., 2003).

O primeiro anticorpo monoclonal surgiu em 1975 produzido a partir da fusão de células esplênicas murinas com uma linhagem de mieloma humano. Com o passar dos anos, sua produção foi sendo desenvolvida até se tornar efetivo contra linhagens de câncer humanas. Estes anticorpos quiméricos consistem de anticorpos provenientes de duas espécies distintas. Há uma parte de anticorpo humano que é complementada por uma região proveniente de uma fonte não-humana. Podem se subdividir em 2 tipos: conjugados e não-conjugados. Os anticorpos conjugados estão ligados a toxinas bacterianas ou de plantas ou ainda a um isótopo radioativo. Um antígeno específico é ligado à superfície celular e posteriormente internalizado dentro da célula. Já os anticorpos não-conjugados se diferenciam pelo fato de permanecerem na superfície celular apoiando o sistema imune a alcançar o efeito de combate. Nesse contexto temos vários anticorpos monoclonais. gentuzumab, ozogamicin, rituximab, alemtuzumab, trastuzumab, cetuximab e gefitinib são alguns dos anticorpos utilizados na terapêutica do câncer sendo efetivos pois apresentam especificidade para marcadores de superfície das linhagens de células tumorais (ABOU-JAWDE et al., 2003).

4.7. Acridinas

Os derivados acridínicos foram primeiramente desenvolvidos como pigmentos no final do século XIX. Durante a Primeira Guerra Mundial suas propriedades farmacológicas foram avaliadas inicialmente testando frente à infecções bacterianas, malária e protozoários. Sua atividade anticâncer foi descoberta na década de 20 e a partir de então um vasto número de derivados acridínicos, alcalóides naturais ou moléculas sintéticas tem sido testadas como agentes antitumorais (DEMEUNYNCK; CHARMANTRAY; MARTELLI, 2001).

Em 1961, foi proposto que a acridina (Figura 5) e seus derivados interagem com o DNA por intercalação na dupla hélice. A fim de testar essa hipótese, um outro estudo foi realizado em 1963 para estabelecer em qual orientação do plano a acridina se encontrava e qual o seu efeito sobre as purinas e pirimidinas. Os resultados mostraram que a ligação da acridina com o DNA ocorre de forma perpendicular ao eixo da helice de DNA e de forma paralela às bases nitrogenadas. A estabilidade da ligação se dá por interações hidrofóbicas, ligações de Van der Waals e de ligações de hidrogênio que causam mudanças na estrutura e nas propriedades físico químicas do DNA interferindo diretamente no metabolismo celular pelo bloqueio do processo de replicação e transcrição (LERMAN, 1963; SILVA, 2003).

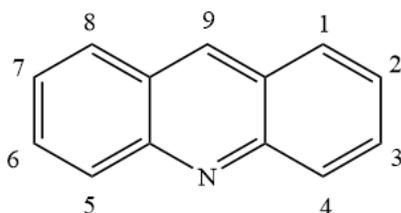


Figura 5: Acridina

A amsacrina (Figura 6), principal representante da classe de compostos, geralmente é caracterizada por uma região planar de intercalação com o DNA no qual grupos polares são eventualmente ligados. Supõe-se que a região planar seja capaz de deslizar por entre as bases de DNA e gerar interações eficientes. Além de estabilizar o contato com o ácido nucléico, a cadeia lateral é apta a interagir com a enzima topoisomerase agindo então como elemento de reconhecimento. Sendo assim a posição do farmacóforo desempenha um papel principal na modulação da ligação de ácidos nucléicos e efeitos nocivos na enzima (PALUMBO et al., 2002).

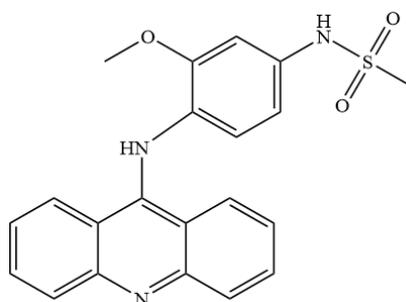


Figura 6: Amsacrina

4.8. Tiazolidinas

Tiazolidina-2,4-diona (TZD) caracteriza-se por apresentar um anel heterocíclico que possui átomos de enxofre e nitrogênio nas posições 1 e 3, respectivamente e grupos carbonilas na posição 2 e 4 (Figura 7). Com múltiplas aplicações biológicas dentre elas atividade antiinflamatória, antimicrobiana e anticâncer, teve sua pesquisa focada na atividade hipoglicemiante, de onde surgiram alguns dos fármacos utilizados na terapêutica do diabetes como ciglitazona e a pioglitazona (JAIN; VORA; RAMAA, 2013).

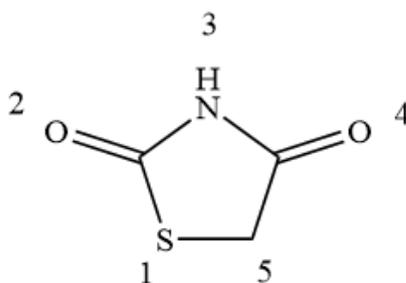


Figura 7: Tiazolidina-2,4-diona

Esses fármacos são considerados agonistas do receptor γ ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR γ). Ao se ligarem ao PPAR γ , as TZDs induzem a formação de heterodímeros com o receptor de ácido retinóide X seguido da formação do elemento responsivo do proliferador de peroxissomos (PPRE). Nos genes alvo, ocorre a estimulação da transcrição de fatores envolvidos na homeostase do organismo (Figura 8) (JAIN; VORA; RAMAA, 2013).

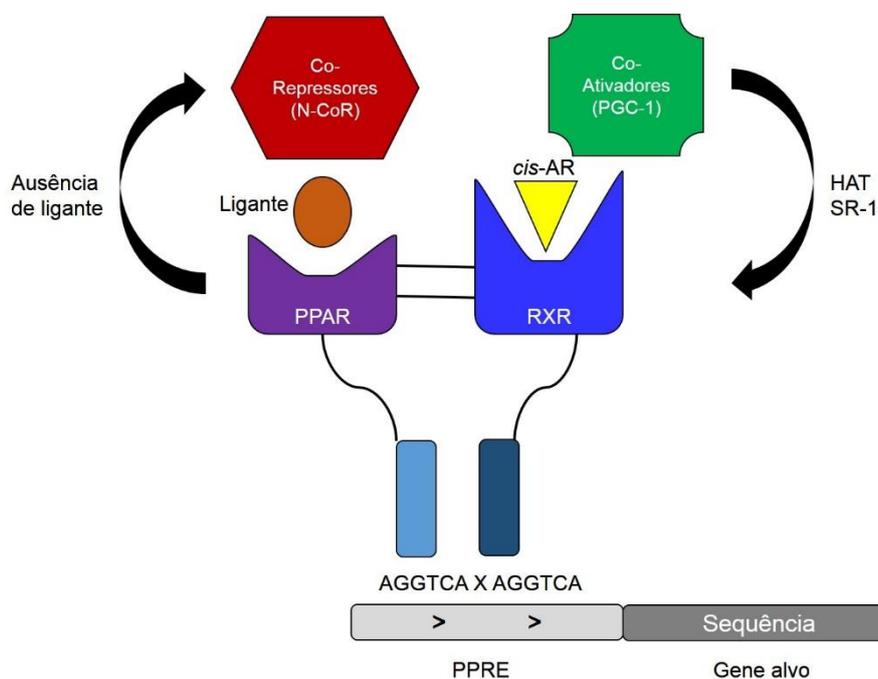


Figura 8: Ativação do PPAR γ (adaptada) (JAIN; VORA; RAMAA, 2013)

Nesse contexto, o mecanismo de ação das TZDs para atividade anticâncer é semelhante. TZDs induzem a heterodimerização do PPAR γ com o receptor retinóide X que causa o recrutamento de co-ativadores e a dissociação de co-repressores indutores de apoptose. Conseqüentemente ocorre a diminuição de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 a survivina e o aumento de proteínas pró-apoptóticas como p53, Bad e PTEN. Adicionalmente, a ativação de PPAR γ reduz o desenvolvimento tumoral através da interferência no ciclo celular (JAIN; VORA; RAMAA, 2013).

4.9. Tiazacridinas

Desde 2001, o Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos vem estudando a associação entre os anéis acridínicos e tiazolidínicos na tentativa de criar um candidato à fármaco que seja eficaz no combate ao câncer. Nesse contexto, foi criado uma nova série de moléculas, as tiazacridinas a partir da junção dos anéis acridínico e tiazolidínico (Figura 9).

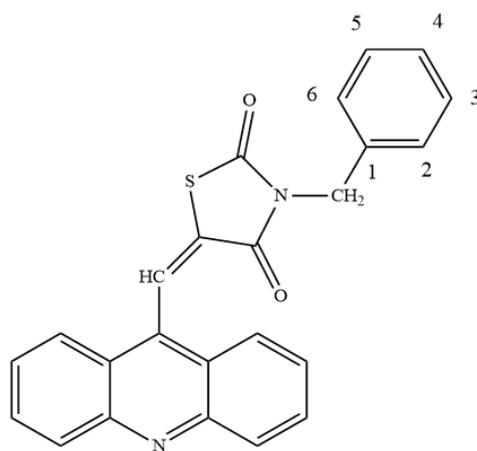


Figura 9: Tiazacridina

Alguns derivados tiazolidínicos acridinilidenos foram sintetizados por reação de adição nucleofílica ou por condensação com aril-aldeídos (SILVA et al., 2011)

As técnicas de obtenção dos derivados tiazacridínicos foram então patenteadas a fim de assegurar a exclusividade da invenção, passando as séries de compostos a serem denominadas respectivamente de derivados tiazacridínicos e imidazacridínicos (PITTA et al., 2004)

Em 2007, uma patente foi depositada contendo a síntese e avaliação da atividade anticâncer *in vitro* e *in vivo* de 13 compostos tiazacridínicos contendo os substituintes H, F, Cl, Br, I, C1-C5 alquil, aril e nitro. Todas as moléculas sintetizadas foram testadas *in vitro* contra as linhagens tumorais SF295 (SNC), HCT-8 (côlon) e MDA-MB-435 (mama). Nos ensaios *in vivo*, os compostos foram testados em camundongos albinos swiss (*Mus musculus*) de 60 dias de vida que tiveram células tumorais de sarcoma 180 implantadas na região axilar dos animais. Os resultados dos ensaios foram satisfatórios para a maioria das moléculas com um percentual de inibição do crescimento tumoral *in vitro* de 80% e redução significativa da massa tumoral do sarcoma 180 nos grupos animais testados *in vivo* (PITTA; GALDINO; LIMA, 2007).

Em 2010, foi realizada a avaliação da citotoxicidade de 8 compostos tiazacridínicos através do ensaio de MTT nas linhagens SF-295 (SNC), HCT-8 (carcinoma de côlon) e MDA-MB435 (melanoma). Os resultados obtidos foram satisfatórios pois os compostos demonstraram elevada citotoxicidade para as linhagens testadas sobressaindo-se os compostos LPSF/AA-2, LPSF/AA-3 e LPSF/AA-6 (percentuais de inibição maiores que 50%). Estes últimos foram testados ainda contra as linhagens HL-60 e CCRF-CEM apresentando também atividade citotóxica mas no entanto não tão eficaz como o controle positivo utilizado, a doxorrubicina ($IC_{50} > 1 \mu g/mL$). O composto LPSF/AA-5 que possui um átomo de cloro substituído na posição 4 do anel benzilidênico, não se mostrou eficaz frente às linhagens tumorais testadas com percentuais de inibição abaixo de 40%. O LPSF/AA-5 foi

o menos ativo de todos os compostos sintetizados e isso pôde ser atribuído ao efeito indutivo negativo e ao pequeno volume do cloro na posição para (GALDINO-PITTA, 2010).

O composto LPSF/AC-04 teve seu metabolismo *in vitro* elucidado contando com o auxílio da química computacional. O produto de metabolização encontrado, o 1-oxo-LPSF/AC-04 foi confirmado por análise de RMN e então submetido a ensaio *in vitro* utilizando microsossomos de fígado de rato além de um estudo piloto aplicando intravenosamente o LPSF/AC-04 em ratos Wistar. O produto de metabolismo foi então detectado no plasma de ratos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) correspondendo ao mesmo produto obtido anteriormente com a reação de Jacobsen *in vitro*. Este estudo teve por finalidade mostrar que os metabólitos podem ser estudados por meio de reações orgânicas *in vitro* na tentativa de diminuir a utilização de animais na investigação pré-clínica (PIGATTO et al., 2011).

Em outro estudo, a experimentação *in vivo* teve por finalidade investigar a farmacocinética plasmática e distribuição tecidual do derivado tiazacridínico 5-acridin-9-ilmetileno-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AC-04) e de seu metabólito, o 1-oxo-LPSF/AC-04 em ratos Wistar utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). O LPSF/AC-04 apresentou um amplo volume de distribuição e tempo de meia-vida penetrando extensivamente nos pulmões, baço e fígado assim como no tecido adiposo. (PIGATTO et al., 2012).

Do mesmo modo, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) foi também utilizada para quantificação precisa do derivado tiazacridínico LPSF/AC-04 em plasma de ratos durante a investigação da farmacocinética do composto (DE TONI UCHÔA et al., 2011).

Em 2012 foi desenvolvido e validado um método de cromatografia líquida com detecção ultravioleta para a quantificação do LPSF/AC-23 em plasma de ratos a fim de estabelecer um método eficaz de determinação quantitativa em estudos de farmacocinética e biodisponibilidade (VALÉRIO et al., 2012).

Com o intuito de melhorar a absorção e o metabolismo do composto tiazacridínico LPSF/AC-04 e conseqüentemente tornando-a mais eficaz e com menor efeito tóxico foi realizado um estudo com a molécula visando o encapsulamento em complexos contendo hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CyD) e hidroxipropil- γ -ciclodextrina (HP- γ -CyD) na tentativa de aumentar a solubilidade da molécula em meio aquoso. Os resultados obtidos mostram um aumento significativo na eficácia da molécula tiazacridínica na atividade antiproliferativa de linhagem tumoral de mama (T47D) (MENDONÇA et al., 2012).

Baseado no fato de que os compostos tiazacridínicos demonstram ação anticâncer, foi realizada síntese de novos compostos da série que foram testados no ensaio de MTT para avaliação da atividade

citotóxica assim como foi avaliada a interação com o DNA utilizando técnicas eletroquímicas (BARROS et al., 2012)

Quatro ATZDs foram testados frente a carcinoma de cólon humano (HCT-8) mostrando diminuição da proliferação tumoral de maneira dose e tempo dependentes. Além disso, interferência no DNA foi observada através da presença de fragmentação. Foi realizado ainda a avaliação do processo de morte celular por brometo de etídio onde se constatou que as moléculas agiram estimulando o processo de apoptose que pôde ser confirmado posteriormente através do ensaio de caspases 3/7 onde a despolarização mitocondrial e exposição da fosfatidilserina foram encontradas. Para avaliar a interação com o DNA, os compostos foram testados frente a *Saccharomyces cerevisiae* exibindo interferências na ação da topoisomerase 1 (BARROS et al., 2013).

Em 2013, oito novos compostos da série 3-acridin-9-il-metil-tiazolidin-2,4-diona e 3-acridin-9-il-metil-5-arilideno-tiazolidin-2,4-diona foram sintetizados e tiveram suas atividades antiproliferativas testadas no ensaio do MTT contra células tumorais de sistema nervoso central (SF-295), cólon (HCT-8) e melanoma (MDA-MB-435). Dois dos compostos sintetizados exibiram potente atividade anticancer contra as linhagens HCT-8 e MDA-MB-435 que após análise detalhada foi revelada possíveis interações do composto 3-acridin-9-il-metil-5-acridin-9-il-metileno-tiazolidina-2,4-diona com alvo farmacológico devido a presença de dois anéis aromáticos, a planaridade e a presença de três aceptores de pontes de hidrogênio (ROCHA PITTA et al., 2012)

Em 2013 foi realizado um trabalho no qual relatou-se a reação entre a acridina-9-carbaldeído e o dimetil malonato com o intuito de elucidar a planaridade da molécula e estabelecer o desvio angular dos carbonos componentes da molécula. Além disso, foi realizada cristalografia visando elucidar as interações carbono-carbono existentes assim como estabelecer a distância dessas interações (DE ALMEIDA et al., 2013).

Devido à alguns derivados tiazolidínicos N-acridínicos específicos terem sido sintetizados recentemente foi necessário iniciar um novo processo de patente para assegurar o seu processo de síntese e seu respectivo uso na terapia do câncer (GALDINO et al., 2013)

Buscando revisar a pesquisa por novas acridinas na literatura, foi publicado um artigo de revisão que mostrou a importância das acridinas nas últimas 4 décadas de pesquisa e seu papel como agente quimioterápico no tratamento do câncer desde 1970 (GALDINO-PITTA et al., 2013).

4.9.1. LPSF/AC-34: estado da arte da molécula em estudo

Em 2003 foi realizada a síntese e caracterização estrutural do composto LPSF/AC-34. O composto teve sua atividade biológica anticâncer testada *in vivo* em camundongos albinos Swiss (*Mus*

musculus) que tiveram sarcoma 180 implantados na região axilar. Os resultados obtidos mostraram redução da massa tumoral de sarcoma 180 em 68,84% sendo eficaz no combate à tumores sólidos (PITTA et al., 2004; SILVA, 2003).

4.9.2.LPSF/AC-129: estado da arte da molécula em estudo

A atividade antitumoral *in vitro* do composto LPSF/AC-129 já havia sido testada nas linhagens de células tumorais SF295 (SNC), HCT-8 (cólon) e MDA-MB-435 (mama) utilizando-se a concentração de 25µg/mL. Nesse estudo, o percentual de inibição do crescimento tumoral foi maior que 80%. Não houve nenhuma atividade hemolítica (PITTA; GALDINO; LIMA, 2007)

Adicionalmente, houve a avaliação da atividade antitumoral *in vivo* do composto utilizando camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) de 60 dias de vida obtidos do Biotério do Departamento de Antibióticos. Os animais foram separados em grupos de 6 animais por gaiola. A dose utilizada foi a mesma para o ensaio em *in vitro* e o volume a ser administrado foi calculado proporcionalmente ao peso corporal dos animais. Decorrido o período de tratamento, os animais foram sacrificados e tiveram seus tumores extirpados para observação das alterações morfológicas macroscópicas assim como para avaliação da extensão dos tumores. Foi observada uma significativa redução da massa tumoral da maioria dos animais e em alguns, a regressão quase total do crescimento tumoral (PITTA; GALDINO; LIMA, 2007).

Buscando ainda outras atividades biológicas para o composto tiazacridínico, o mesmo foi testado frente ao protozoário *Trypanosoma cruzi* para avaliação da ação tripanocida. Inicialmente foi realizado o teste de citotoxicidade utilizando células esplênicas de camundongos BALB/c. Células tratadas com saponina (0,05%) foram utilizadas como controle positivo e células sem tratamento como controle negativo. Todos os grupos foram incubados em presença de timidina tritiada (1µCi/poço). O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando-se a percentagem de incorporação de timidina tritiada entre o grupo tratado com o composto e o grupo não tratado. As concentrações atóxicas foram definidas como aquelas que causaram redução na incorporação da timidina tritiada abaixo de 30% em relação ao grupo controle não tratado. O LPSF/AC-129 apresentou percentual de inibição de 8,08% na concentração de 1 µg/ml (GALDINO et al., 2012).

O método de MTT também foi utilizado para determinação do efeito anti-proliferativo do composto e determinação da IC50 em formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Como controles positivos foram utilizados a anfotericina B (25µg/ml), benznidazol, nifurtimox e como controle negativo, cultura de parasitos sem tratamento. O percentual de atividade anti-parasitária foi determinado comparando-se os valores das absorbâncias do grupo tratado com o

composto e do grupo não tratado. O composto LPSF/AC-129 apresentou para a forma epimastigota o valor de IC50 de 3,53µg/ml e para a forma tripomastigota o valor não pôde ser determinado (GALDINO et al., 2012).

5. Referências

ABOU-JAWDE, R. et al. An overview of targeted treatments in cancer. **Clinical therapeutics**, v. 25, n. 8, p. 2121–37, ago. 2003.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Text Alternative for Rising Global Cancer Epidemic Infographic The American Cancer Society: The Official Sponsor Of Birthdays**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.cancer.org/research/infographicgallery/rising-global-cancer-epidemic-text-alternative>>.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Rising Global Cancer Epidemic**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@marketing/documents/document/acspc-036979.pdf>>.

BALKWILL, F. R.; MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. **Semin Cancer Biol**, v. 22, n. 1, p. 33–40, 2012.

BARROS, C. D. et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene-thiazolidine-2,4-diones as PPARgamma ligands. **Bioorg Med Chem**, v. 18, n. 11, p. 3805–3811, 2010.

BARROS, F. W. et al. Inhibition of DNA topoisomerase I activity and induction of apoptosis by thiazacridine derivatives. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 268, n. 1, p. 37–46, 2013.

BARROS, F. W. A. et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorg Med Chem**, v. 20, n. 11, p. 3533–3539, 1 jun. 2012.

BELMONT, P.; DORANGE, I. Acridine/acridone: a simple scaffold with a wide range of application in oncology. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 18, n. 11, p. 1211–1224, nov. 2008.

BRODY, T. M. **Farmacologia humana: da molecular à clínica**. [s.l.] Guanabara-Koogan, 1997.

CHEARWAE, W.; BRIGHT, J. J. PPARgamma agonists inhibit growth and expansion of CD133+ brain tumour stem cells. **British journal of cancer**, v. 99, n. 12, p. 2044–53, 16 dez. 2008.

CHOLEWIŃSKI, G.; DZIERZBICKA, K.; KOŁODZIEJCZYK, A. M. Natural and synthetic acridines/acridones as antitumor agents: their biological activities and methods of synthesis. **Pharmacological reports : PR**, v. 63, n. 2, p. 305–36, jan. 2011.

COATES, J. M.; GALANTE, J. M.; BOLD, R. J. Cancer therapy beyond apoptosis: autophagy and anoikis as mechanisms of cell death. **J Surg Res**, v. 164, n. 2, p. 301–308, 2010.

DA COSTA LEITE, L. F. et al. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of arylidene-thiazolidinediones with potential hypoglycemic and hypolipidemic activities. **Eur J Med Chem**, v. 42, n. 10, p. 1263–1271, 2007.

- DE ALMEIDA, S. M. V et al. Dimethyl 2-[(acridin-9-yl)methyl-ylene]malonate. **Acta crystallographica. Section E, Structure reports online**, v. 69, n. Pt 2, p. o224, 1 fev. 2013.
- DE BRUIN, E. C.; MEDEMA, J. P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. **Cancer Treat Rev**, v. 34, n. 8, p. 737–749, 2008.
- DE TONI UCHÔA, F. et al. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN LC-MS/MS METHOD FOR THE PRE-CLINICAL PHARMACOKINETIC INVESTIGATION OF THE ANTICANCER CANDIDATE AC04 IN RODENTS. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 34, n. 9, p. 744–752, 20 abr. 2011.
- DEMEUNYNCK, M.; CHARMANTRAY, F.; MARTELLI, A. Interest of acridine derivatives in the anticancer chemotherapy. **Current pharmaceutical design**, v. 7, n. 17, p. 1703–24, nov. 2001.
- DENNY, W. A. Acridine derivatives as chemotherapeutic agents. **Current medicinal chemistry**, v. 9, n. 18, p. 1655–65, set. 2002.
- DIAZ-MORALLI, S. et al. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacol Ther**, v. 138, n. 2, p. 255–271, 2013.
- FRANCO, R. et al. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois. **Mutat Res**, v. 674, n. 1-2, p. 3–22, 2009.
- GALDINO, S. L. et al. **Imidazolidine and thiazolidine molecules with anti-T. cruzi activity** BrasilWorld Intellectual Property Organization, , 2012. Disponível em: <<http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2012119212>>
- GALDINO, S. L. et al. **THIAZACRIDINES USED IN ANTI-CANCER THERAPY** BrasilWorld Intellectual Property Organization, , 2013. Disponível em: <[http://patentscope.wipo.int/search/en/detailPdf.jsf?ia=BR2012000421&docIdPdf=id00000020767145&name=\(WO2013053034\)THIAZACRIDINES USED IN ANTI-CANCER THERAPY&woNum=WO2013053034&prevRecNum=1&nextRecNum=2&recNum=1&queryString=&office=&sortOption=&prevFilter=&](http://patentscope.wipo.int/search/en/detailPdf.jsf?ia=BR2012000421&docIdPdf=id00000020767145&name=(WO2013053034)THIAZACRIDINES%20USED%20IN%20ANTI-CANCER%20THERAPY&woNum=WO2013053034&prevRecNum=1&nextRecNum=2&recNum=1&queryString=&office=&sortOption=&prevFilter=&)>
- GALDINO-PITTA, M. DA R. **Novos Agentes Anticâncer Tiazacridínicos Substituídos : Síntese , Estrutura e Efeitos Biológicos**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2010.
- GALDINO-PITTA, M. R. et al. Niche for acridine derivatives in anticancer therapy. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 9, p. 1256–71, 10 jun. 2013.
- GERMANO, G.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 374–379, 2008.
- GUERRA; GALLO, C. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Rev Bras**, v. 51, p. 227–234, 2005.
- GURRALA, S.; BABU, Y. R.; RAJU, M. B. ACRIDONE DERIVATIVES IN REVERSING MULTIDRUG RESISTANCE IN CANCER CELLS – WHERE ARE WE NOW? v. 2, n. 2, p. 308–318, 2011.

- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HAU, P. et al. Low-dose chemotherapy in combination with COX-2 inhibitors and PPAR-gamma agonists in recurrent high-grade gliomas - A phase II study. **Oncology**, v. 73, n. 1-2, p. 21–25, jan. 2008.
- HOFFBRAND, A.; MOSS, P.; PETTIT, J. **Fundamentos em Hematologia**. [s.l.] Artmed Editora, 2008. v. 59
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: [s.n.].
- JAIN, V. S.; VORA, D. K.; RAMAA, C. S. Thiazolidine-2,4-diones: progress towards multifarious applications. **Bioorg Med Chem**, v. 21, n. 7, p. 1599–1620, 2013.
- LERMAN, L. S. The Structure of the DNA-Acridine Complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 49, n. 1, p. 94–102, 1 jan. 1963.
- MATTAROLLO, S. R. et al. **Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors**. [s.l: s.n.]. v. 71
- MENDONÇA, E. A. M. et al. Enhanced antiproliferative activity of the new anticancer candidate LPSF/AC04 in cyclodextrin inclusion complexes encapsulated into liposomes. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 4, p. 1355–66, dez. 2012.
- MURPHY, G. J.; HOLDER, J. C. PPAR-gamma agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. **Trends in pharmacological sciences**, v. 21, n. 12, p. 469–74, dez. 2000.
- NIKOLETOPOULOU, V. et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochim Biophys Acta**, 2013.
- NOTEBORN, M. H. Proteins selectively killing tumor cells. **Eur J Pharmacol**, v. 625, n. 1-3, p. 165–173, 2009.
- PALUMBO, M. et al. Sequence-specific interactions of drugs interfering with the topoisomerase-DNA cleavage complex. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1587, n. 2-3, p. 145–54, 18 jul. 2002.
- PIGATTO, M. C. et al. Metabolism evaluation of the anticancer candidate AC04 by biomimetic oxidative model and rat liver microsomes. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4245–51, set. 2011.
- PIGATTO, M. C. et al. Pre-clinical pharmacokinetics of the acridine antitumor candidate AC04 and its 1-oxo-metabolite plasma profile. **Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems**, v. 42, n. 7, p. 701–7, 1 jul. 2012.
- PITTA, I. DA R. et al. **MOLECULES WITH ANTITUMOR ACTIVITY AND CHEMICAL SYNTHESIS** BrasilWorld Intellectual Property Organization, , 2004. Disponível em: <<http://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2004024058&recNum=1&maxRec=&office=&prevFilter=&sortOption=&queryString=&tab=PCT+Biblio>>

PITTA, I. DA R.; GALDINO, S. L.; LIMA, M. DO C. A. DE. **Acridine derivatives with antitumoral activity** BrasilWorld Intellectual Property Organization, , 4 out. 2007. Disponível em: <<http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2007109871>>. Acesso em: 28 ago. 2013

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 11, p. 1603–1616, 2010.

ROCHA PITTA, M. G. et al. Synthesis and in vitro anticancer activity of novel thiazacridine derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 5, p. 2421–2429, 28 set. 2012.

SÁNCHEZ, I. et al. Synthesis and biological evaluation of modified acridines: the effect of N- and O- substituent in the nitrogenated ring on antitumor activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 41, n. 3, p. 340–52, mar. 2006.

SANCHEZ-GARCIA, I.; VICENTE-DUENAS, C.; COBALEDA, C. The theoretical basis of cancer-stem-cell-based therapeutics of cancer: can it be put into practice? **Bioessays**, v. 29, n. 12, p. 1269–1280, 2007.

SANTIN, J. R. et al. Chemical synthesis, docking studies and biological effects of a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist and cyclooxygenase inhibitor. **Eur J Pharm Sci**, v. 48, n. 4-5, p. 689–697, 2013.

SERTZNIG, P. et al. Present concepts and future outlook: function of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) for pathogenesis, progression, and therapy of cancer. **Journal of cellular physiology**, v. 212, n. 1, p. 1–12, jul. 2007.

SILVA, T. G. DA. **SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS ACRIDINO-TIAZOLIDÍNICOS E ACRIDINO-IMIDAZOLIDÍNICOS**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

SILVA, T. G. et al. Synthesis and structural elucidation of new benzylidene imidazolidines and acridinylidene thiazolidines. **Heterocyclic Communications**, v. 7, n. 6, p. 523–528, jan. 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA. **Linfomas**. Disponível em: <http://www.sbcancer.org.br/home2/site/index.php?option=com_content&view=article&id=120:linfomas&catid=29&Itemid=123>. Acesso em: 29 out. 2013.

SOSA, V. et al. Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing Res Rev**, v. 12, n. 1, p. 376–390, 2013.

VALÉRIO, R. D. et al. Development and Validation of an LC-UV Method for Quantification of a New Thiazolidinedione (LPSF/AC-23) with Antitumor Activity in Rat Plasma. v. 23, n. 11, p. 2104–2113, 2012.

VITALE, G. et al. The PPAR-gamma agonist troglitazone antagonizes survival pathways induced by STAT-3 in recombinant interferon-beta treated pancreatic cancer cells. **Biotechnol Adv**, v. 30, n. 1, p. 169–184, 2012.

WOO, C. C. et al. Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: possible involvement of PPAR-gamma pathway. **Biochem Pharmacol**, v. 82, n. 5, p. 464–475, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/#>>. Acesso em: 11 dez. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION CATALOGUING-IN-PUBLICATION DATA. **Global status report on noncommunicable diseases 2010**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/en/>.

YIN, F. et al. Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 286, n. 5, p. 916–22, 7 set. 2001.

YOUSSEF, J.; BADR, M. Peroxisome proliferator-activated receptors and cancer: challenges and opportunities. **Br J Pharmacol**, v. 164, n. 1, p. 68–82, 2011.

ZHANG, G. Y. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) agonist inhibits transforming growth factor-beta1 and matrix production in human dermal fibroblasts. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**, v. 63, n. 7, p. 1209–1216, 2010.

Artigo 1

6. Artigo 1

A ser submetido na revista Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters (ISSN: 0960-894X)

Fator de Impacto: 2,331

Extrato no Qualis CAPES Farmácia: B1

Title: ASSOCIATED THIAZACRIDINIC COMPOUNDS LPSF/AC-34 AND LPSF/AC-129 SHOWS HIGH SELECTIVITY ON NEOPLASTIC CELL DEATH INDUCTION

Authors: THIAGO UBIRATAN LINS E LINS, MOACYR JESUS BARRETO DE MELO RÊGO, MICHELLY CRISTINY PEREIRA, RICARDO OLÍMPIO DE MOURA, MARINA GALDINO DA ROCHA PITTA, MARIA DO CARMO ALVES DE LIMA, IVAN DA ROCHA PITTA, MAIRA GALDINO DA ROCHA PITTA

Abstract: Two amsacrine analogues LPSF/AC-129 and LPSF/AC-34 were synthesized, structurally elucidated and assayed for anticancer activity against hematopoietic and solid tumor cell; Peripheral blood mononuclear cells was used to evaluate the cytotoxicity and selectivity through MTT assay. Flow cytometry was utilized to evaluate possible interferences on cell cycle phases and to elucidate the mechanism of cell death. The effect of both compounds shows high ability to inhibit cell growth of hematopoietic tumor cell lineages but not capable to inhibit adherent cells besides that also shows high selectivity to inhibits tumoral cells when assayed against normal cells PBMCs. Apoptosis was confirmed as cell death mechanism indicating the compound can be a new effective anticancer agent. But, no cell cycle arrest was observed. Thus, it can be suggested that the mixture shows a major cytotoxic activity than the cytostatic one and presents selectivity for cancer cell lineages.

Keywords: amsacrine analogues, cytotoxic, apoptosis

1. Introduction:

Most forms of chemotherapy against cancer currently attacking the basic mechanisms of cell division (synthesis and DNA replication, cell cycle and cytoskeletal changes). Some drugs as doxorubicin, vincristine, cyclophosphamide, paclitaxel and topotecan have limited selectivity front non-tumor cells. This fact causes high cytotoxicity against normal tissue and consequently side effects

(SANCHEZ-GARCIA; VICENTE-DUENAS; COBALEDA, 2007). In order to solve this problem, it is necessary to search for new selective therapeutic agents.

One of them is the acridine derivatives, very known for their chemical and biological stability and their ability of effective binding to DNA or RNA resulting in the disorder of the biological functions in living cells (BELMONT; DORANGE, 2008; CHOLEWIŃSKI; DZIERZBICKA; KOŁODZIEJCZYK, 2011). The most known acridine derivative is N-(4-(acridin-9-ylamino)-3-methoxyphenyl) methanesulfonamide also called Amsacrine or m-AMSA (Figure 1A). Their major activity has been shown in the refractory treatment of acute leukemia and lymphomas. It can be classified in three groups according the mechanism of action: the topoisomerase inhibitors, the telomerase inhibitors and the inhibitor of P-glycoprotein mediated resistance (DEMEUNYNCK; CHARMANTRAY; MARTELLI, 2001).

On the other hand, there is other class of compounds best known in therapeutic: the thiazolidine derivatives. Because of its hypoglycemic activity the TZDs have been used as therapeutic targets to decrease the level of hyperglycemia, hyperlipidemia and insulin resistance (DA COSTA LEITE et al., 2007; JAIN; VORA; RAMAA, 2013). These agents act by stimulating a member of the nuclear receptor hormone family, peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR- γ) and their binding to receptor leads to modulation of expression of specific genes (ZHANG et al., 2010).

Thus, studies shows that PPAR agonists can inhibit glioblastoma growth (CHEARWAE; BRIGHT, 2008; GROMMES et al., 2006) mainly when the patients are treated with cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and low-dose chemotherapy (HAU et al., 2008). PPAR γ agonists like troglitazone or pioglitazone causes inhibition on cellular growth of lung cancer cells in vitro when used in synergy with antitumoral drugs like paclitaxel or cisplatin (REDDY et al., 2008).

So, the synthesis knowledge of these two class of compounds, has led many research groups to synthesize new antitumoral molecules. Since 2004, Pitta and his group has aimed to obtain new molecules with better efficacy on cancer treatment. For this, the strategy used was to couple acridine and thiazolidine nucleus to obtain a new class of compounds, the thiazacridine derivatives (BARROS et al., 2012; GALDINO-PITTA et al., 2013).

The aim of this study was synthesize, purify and characterize the thiazacridinic compounds mixture LPSF/AC-129 ((Z)-5-acridin-9-ylmethylene-3-(3-chloro-benzyl)-4-thioxo-thiazolidin-2-one) (Figure 1B) and LPSF/AC-34 ((Z/E)-5-acridin-9-ylmethylene-3-(3-chloro-benzyl)-thiazolidin-2,4-dione) (Figure 1C) to evaluate the antitumoral activity through selectivity assay and also cytostatic and death induction mechanism.

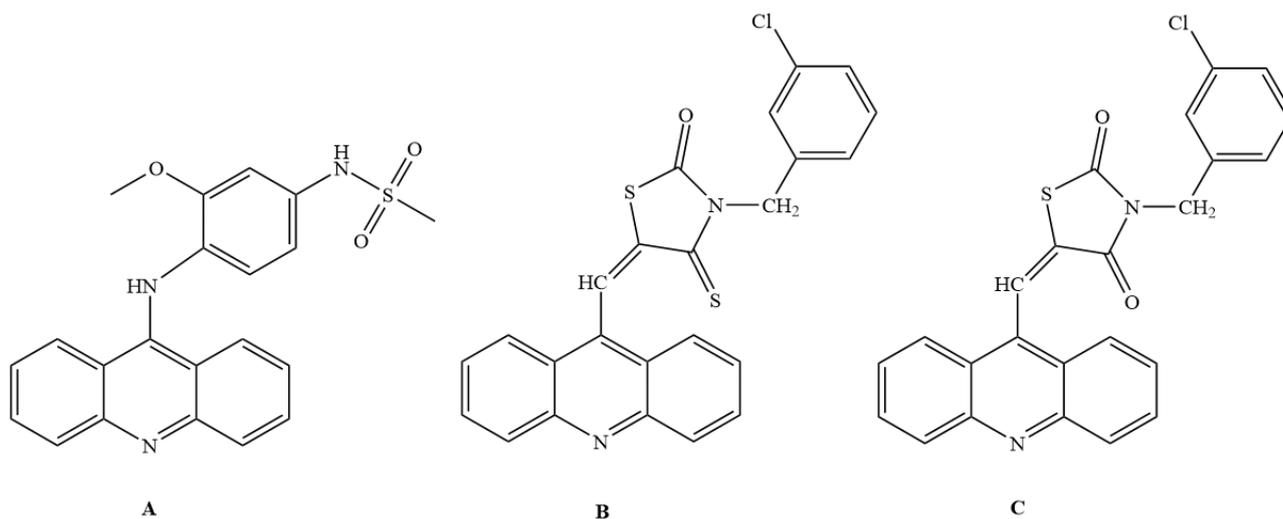


Figure 1: m-AMSA (A), LPSF/AC-129 (B) and LPSF/AC-34 (C)

2. Material and Methods:

2.1. Chemistry:

The melting points were measured in capillary tubes on a Buchi (or Quimis) apparatus. Thin layer chromatography was performed on silica gel plates from Merck (60F254). The infrared spectra of 1% KBr pellets were recorded on a Bruker IFS66 spectrometer. ¹HNMR spectra were recorded on a Varian Plus 300 MHz spectrophotometer using DMSO-d₆ as the solvent, with tetramethylsilane as an internal standard. Electronic impact mass spectra were measured at 70 eV on a Finnigan GCQ Mat Quadrupole Ion-Trap. The MS data fully agreed with the proposed structures. The synthetic route (Figure 2) used to obtain the compound is similar to the synthetic procedures of document WO 2004/024058 (PITTA et al., 2004) and it is part of procedures existing in the document WO 2007/109871 and other works (MOURA, 2009; PITTA; GALDINO; LIMA, 2007; SILVA, 2003; SILVA et al., 2011).

The reaction of diphenylamine with acetic acid leads to 9-methyl-acridine (Figure 2). Following the footsteps of synthetic route, we used 2.5g - 0.0147 moles of diphenylamine (1), 3 mL of acetic acid (2) and 10g - 0.0734 moles of zinc chloride (3), which were heated to a temperature of 220°C for 8 hours. The reaction mixture was initially treated with a freshly prepared solution of 10% sulfuric acid and then basified by the addition of a solution of ammonium hydroxide at 30%. The 9-methyl-acridine was isolated by an extraction with ethyl acetate, and concentrated to dryness on the rotaevaporator a temperature of 50°C. The product was purified by chromatography under pressure on silica gel 60 using as eluting system 7:3 n-hexano/AcOEt (TSUGE et al., 1963).

Initially were placed in a flask burners, the pyridinium chlorochromate (PCC) (4) (2.0392g - 0.0094 moles) and magnesium sulfate (5) (5.0980g - 0.0423 moles) in the presence of anhydrous dichloromethane (6) (51 mL). The reaction mixture was stirred and soon after the 9-methyl acridine (AC-1) (1.7264g - 0.0089 moles) was added. Stirring was continued at room temperature under an inert atmosphere for 18 hours. The compound acridine-9-carboxaldehyde (AC-2) was extracted from the reaction medium with ethyl ether and evaporated to dryness. The aldehyde obtained was purified by chromatography under pressure on silica gel 60 using as eluting system 6:4 n-hexano/AcOEt (MOURA, 2009; SILVA, 2003).

Were introduced into a round-bottomed flask acridine-9-carboxaldehyde (AC-2) (2.1821 g - 0.0105 moles) and ethyl cyanoacetate (7) (3 mL) in presence of piperidine (8) (250 μ L) as a catalyst and anhydrous benzene (9) (50 ml) as solvent. The reaction mixture was refluxed at a temperature of 110°C for 8 hours. The acridin-2-cyano-9-yl-ethyl acrylate was stored in the refrigerator for 12 hours. The cianocinnamic ester obtained was purified by chromatography under pressure on silica gel 60, 6:4 n-hexano/AcOEt (MOURA, 2009; SILVA, 2003).

Through the reaction of the thiourea (10) with chloroacetic acid (11) in the presence of distilled water was obtained thiazolidine-2,4-dione (12) (LIBERMANN; HIMBERT; HENGL, 1948). The N-alkylation reaction that began with the preparation of a solution of potassium hydroxide (13) (2.4 g - 0.042735 mol). Then the solution was added dropwise to a suspension of thiazolidine -2,4- dione (5 g - 0.042735 mol) in 10 mL of a 6:4 MeOH/H₂O solution . In the presence of potassium hydroxide (13) the salt formation occurs thiazolidine-2,4-dione (14) due to the acidity of the hydrogen atom in position 3 of the ring. The salt formed promoted, so a nucleophilic attack to the substituted benzyl chloride. After complete dissolution of the salt of thiazolidine-2,4-dione (14) was added to 3-chlorobenzyl chloride (15) (5.42 mL - 0.42735 mol) . The mixture was heated at 70°C for 15 hours. After the reaction period, the product was taken to the freezer and then the crystals were separated. The intermediate 3-(3-chloro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (TA-1) was purified by successive crystallizations.

The thionation reaction is carried out starting from 3-(3-chloro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (1g - 0.0038834 mol) (TA-1) with phosphorus pentasulfide (16) (0;86 g - 0.0038834 mol) in 40 mL of dry dioxane (17) under an inert atmosphere (argon) and heated to a temperature of 110°C for 8 hours. The reaction mixture was evaporated to dryness and 3-(3-chloro-benzyl)-4-thioxo-thiazolidin-2-one (TAS-1) was purified by washing with hot distilled water.

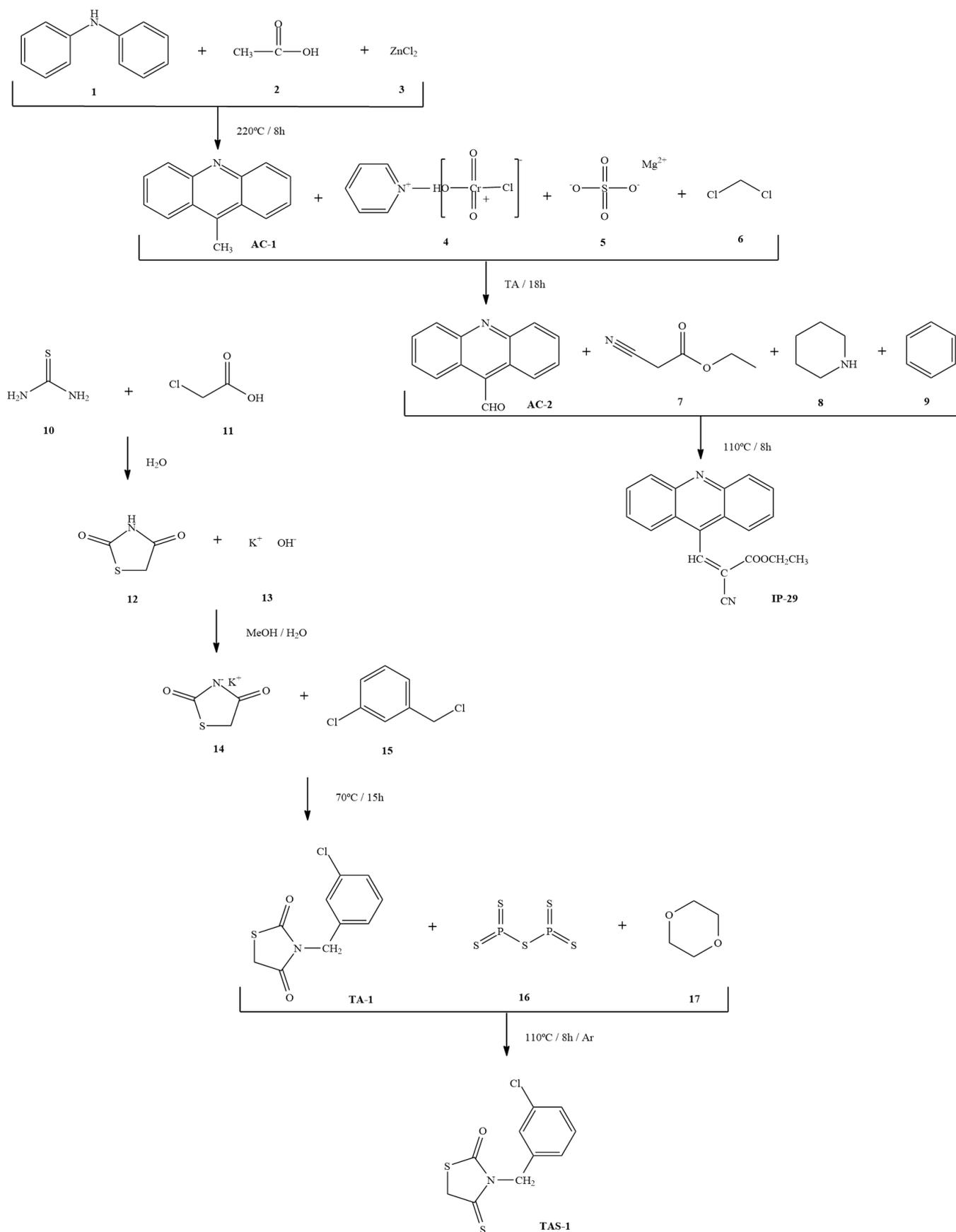


Figure 2: Synthetic route for TAS-1 and IP-29 intermediaries obtention

2.2. LPSF/AC-34 ((Z/E)-5-acridin-9-ylmethylene-3-(3-chloro-benzyl)-thiazolidin-2,4-dione)

To obtain the LPSF/AC-34, in a 250 mL flask was added 3-(3-chloro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (TA-1) (0.2g – 0.0008281 mol) (A) and 2-cyano-acridin-9-yl ethyl acrylate (IP-29) (B) (0.250 g - 0.0008281 mol) dissolved in anhydrous ethanol (10 mL) and 6 drops of piperidine as a catalyst at a temperature of 60°C for 2 hours. It was observed that precipitation of crystals of 5-(acridin-9-yl-methylene)-3-(3-chloro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (C), which was filtered and purified by successive washings with distilled water (Figure 3).

Yellow solid. CAS Registry Number: 950986-16-0. Molecular weight: 430,5g. Molecular formula: $C_{24}H_{15}ClN_2SO_2$. Mp 220-222°C. Yield 65 %. TLC Ethyl acetate: toluene (7:3) Rf: 0,34. IR (KBr, cm^{-1}): ν 1747, 1683 (C=O); 1572-1476 (C=C); 1328 (C-N); 756 (C-S). 1H NMR (δ ppm, DMSO- d_6): 8,79 (s, 1H, benzyl); 4,88 (s, 2H); 7,47 (s, 4H); 8,25 (d, 2H acridin, J=8,4Hz); 8,16 (d, 2H, acridin, J=8,7Hz); 7,92 (dt, 2H, acridin, J=7,8Hz); 7,70 (dt, 2H, acridin).

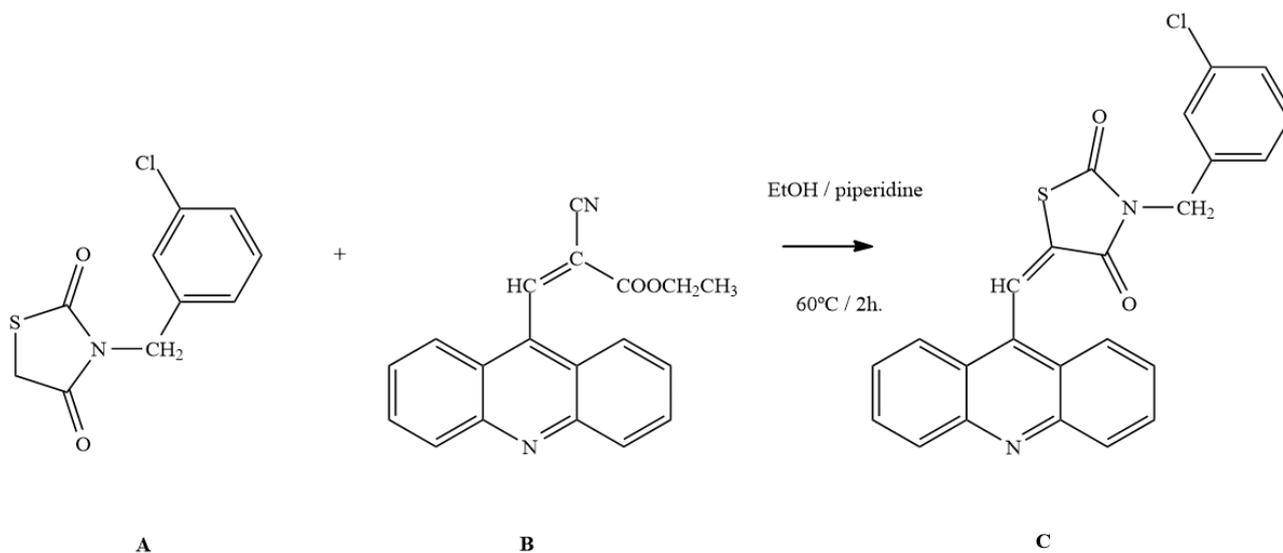


Figure 3: Michael addition reaction for obtaining the thiazacridinic derivative LPSF/AC-34

2.3. LPSF/AC-129 ((Z)-5-acridin-9-ylmethylene-3-(3-chloro-benzyl)-4-thioxo-thiazolidin-2-one)

To obtain the LPSF/AC-129, in a 250 mL flask was added 3-(3-chloro-benzyl)-4-thioxo-thiazolidin-2-one (TAS-1) (A) (0.15g - 0.0005825 moles) and 2-cyano-acridin-9-yl ethyl acrylate (IP-29) (B) (0.17 g - 0.0005825 mol) dissolved in anhydrous ethanol (8 mL) and 250 μ L of piperidine as a catalyst at a temperature of 80°C for 4 hours. It was observed that precipitation of crystals of 5-(acridin-9-yl-methylene)-3-(3-chloro-benzyl)-4-thioxo-thiazolidin-2-one (C), which was filtered and purified by successive washings with distilled water (Figure 4).

Yellow solid. $C_{24}H_{15}N_2ClOS_2$. Mp 171-172 °C. Yield 87 %. TLC Ethyl acetate: n-hexane (7:3) R_f : 0,78. IR (KBr, cm^{-1}): ν 1718, 1602, 1491, 1349, 1296, 754. 1H NMR (δ ppm, DMSO- d_6): 5,32 (s, CH_2); 7,44-7,39 (m, 3H, benzyl); 7,51 (s, 1H, benzyl); 7,73-7,68 (m, 2H acridin); 7,95-7,90 (m, 2H acridin); 8,10 (d, 2H acridin, $J=8,69Hz$); 8,25 (d, 2H acridin, $J=8,69Hz$); 9,03 (s, CH). Ms m/z (%): 446 ($M+ 9,46$); 448 ($M+2 4,3$); 321 (27,93); 235 (47,93); 203 (42,90); 125 (73,32); 127 ($m/z + 2 9,01$); 89 (100); 86 (25,59).

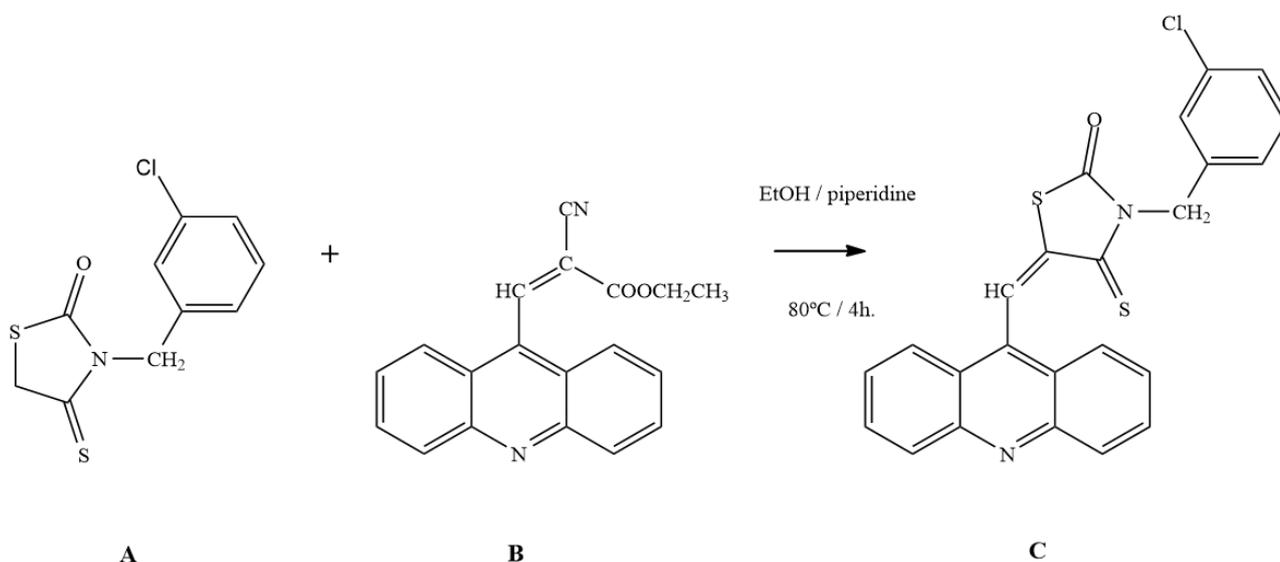


Figure 4: Michael addition reaction for obtaining the thiazacridinic derivative LPSF/AC-129

2.4. Biological assays:

2.4.1. Cytotoxicity assay:

NG97 (glioblastoma) cell line was gently given by Prof. Rogger Chamas (FM-USP). T47D (breast carcinoma), Raji (Burkitt lymphoma) and Jurkat (acute T cell leukemia) cell lines, obtained from Rio de Janeiro Cell Bank/RJ, Brazil. All the cells lineages were grown in RPMI 1640 medium containing antibiotics (penicillin 100U/mL; streptomycin 100mg/mL) and supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, in 5% CO_2 humidified atmosphere at 37°C.

The cytotoxicity of the LPSF/AC-34 (22%) + LPSF/AC-129 (72%) mixture was evaluated through MTT assay. For all experiments, the cells were seeded in 96-well plates (1×10^4 cells/well). After 24 h, the mixture (1, 10, 50 and 100 μM), dissolved in DMSO, were added to each well and incubated for 72 h. Amsacrine (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) was used as a positive control. Supplemented RPMI medium containing DMSO 0,1% was used as vehicle. At the end of the

incubation, the MTT (0,5 mg/mL) was added in each well. After 3 h, the formazan product was dissolved in SDS 20% 130 μ L and the absorbance was measured using a multiplate reader (Biotek). The substance effect was quantified as the percentage of the vehicle absorbance at 570 nm. All the results was compared with the assays realized with peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with the objective of evaluation of compound selectivity to cancer cells.

2.4.2. Selectivity assay:

In this work, the LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture selectivity was obtained through MTT assay. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were harvested of whole blood of health volunteers who remained without drinking alcohol and use of drugs during 15 days. All experiments were in accordance with the Research Ethics Committee (Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco – CEP/CCS). All volunteers were aware of the research objectives through the presentation of a Consent Form and Clarification to Literate Citizens that was properly completed and signed by the volunteers.

The whole blood collected was centrifuged in a Ficol-Hypaque (GE Healthcare) gradient for 45 minutes and purified through repeated washings with erythrocyte lysis buffer and centrifugations. Then, the cells were seeded in 96-well plates (1×10^4 cells/well) for treatment during 48h with compound mixture at 1, 10, 50 and 100 μ M doses. The assay was performed by the MTT method.

2.4.3. Apoptosis assay

1×10^6 cells were seeded in 6-well plates. It was used the IC50 concentration of LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture compound and amsacrine groups which are compared to untreated group. The cells were suspended in 1% (w/v) paraformaldehyde-PBS solution and maintained in ice for 30 minutes. After the cells were centrifuged during 5 minutes, 300g and the supernatants were discarded. The pellets was washed with PBS and other centrifugation was performed. Ice-cold 70% ethanol was added to the pellet and the suspension were maintained in ice for 30 minutes. The Apo-BrdU Apoptosis Detection Kit (eBioscience, Phoenix Flow Systems, San Diego, California) was used according the manufacturer's instructions. The analysis was performed on cytometer analyzer BD FACSAria II (BD Pharmingen, California, USA).

2.4.4. Cell cycle assay

The extent of cell cycle progression in the cells was estimated by flow cytometric analysis after propidium iodide (Roche Diagnostics, IN, USA) staining of the cells. After compound mixture treatment, cells were transferred to FACS tubes (BD Biosciences, USA) and fixed in 70% ethanol for 12 hours at -20°C . Briefly, after washing with PBS cells were incubated with RNase (1 mg/ml) at 37°C for 30 min. Finally, cells were re-suspended in propidium iodide (50 mg/ml) for at least 3 h at $+2$ to $+8^{\circ}\text{C}$ protected from light until flow-cytometric analysis. The samples detection was performed through flow cytometry using BD FACSAria II cell cytometer analyzer (BD Pharmingen, California, USA). The cells were quantified through the software FCS Express 4 Plus.

2.4.5. Statistical analysis

All values showed are the mean of three independent experiments run in triplicate. Results were expressed as a percentage of the controls and the computer software Origin 8 was used to determine IC50 values (concentration required to inhibit 50% of the cell viability). The results was considered significant when $p < 0,05$.

3. Results

3.1. Cytotoxicity

The LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture shows high activity against lymphoma cells (Raji) showing a $\text{IC}_{50} = 3,98 \mu\text{M}$ followed by leukemia cells (Jurkat) that had a $\text{IC}_{50} = 35,6 \mu\text{M}$. For adhered cell lineages, the results obtained for glioblastoma cells (NG97) that presented $\text{IC}_{50} = 55,77 \mu\text{M}$. For breast cell line (T47D), the IC_{50} was higher than $100 \mu\text{M}$. The IC_{50} obtained for PBMC was higher than $100 \mu\text{M}$. The results are expressed in Figure 5 and Table 1.

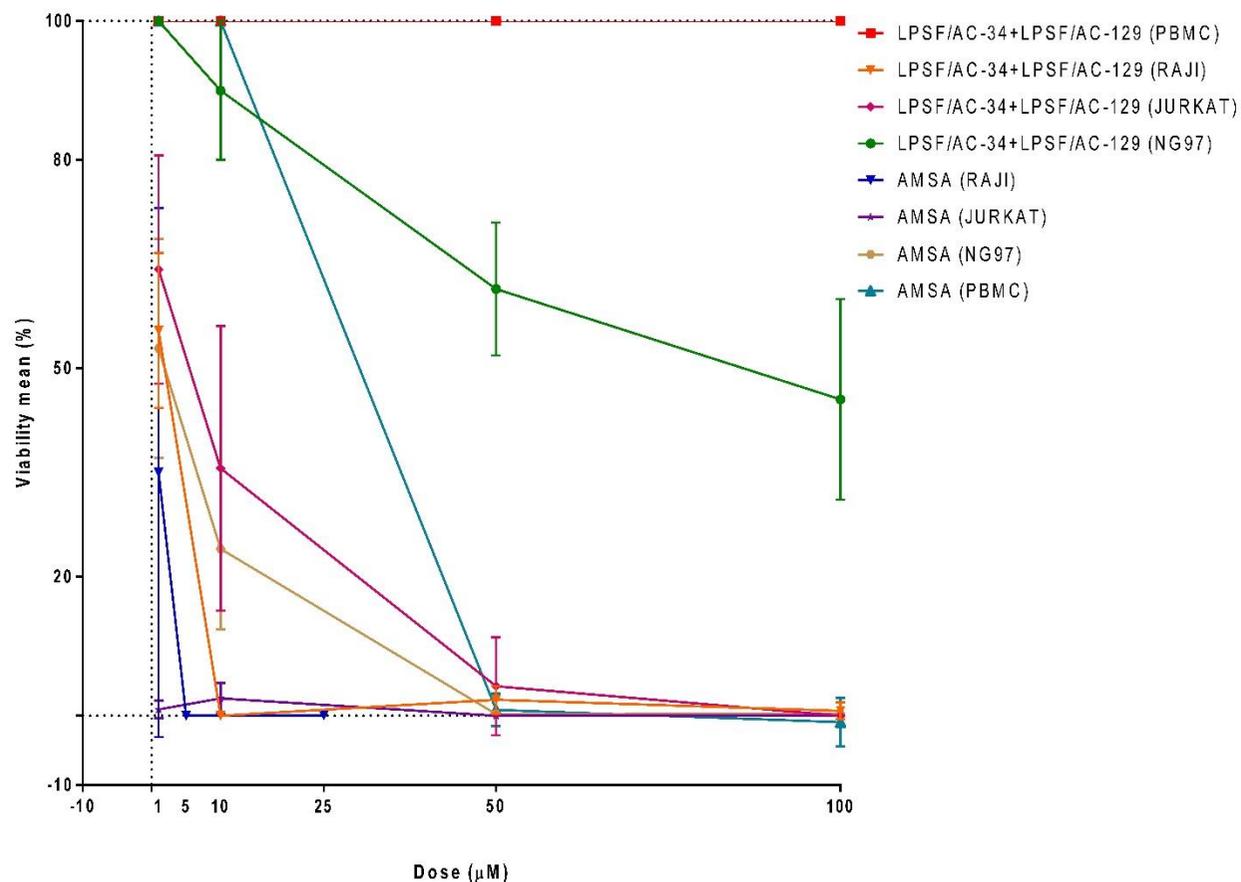


Figure 5: Effect of LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture on cell viability. The results are expressed as percentage of viability mean versus dose assayed (μM). The viability expressed as percentages indicates the compound mixture antiproliferative activity: below 30% - EXCELLENT; between 30-60% MODERATED; between 60-100% - INACTIVE.

Table 1: IC50 values from MTT and selectivity assays

Cell lineage	IC50 (μM)	
	LPSF/AC-34+AC-129	AMSA
Raji	3,98	
Jurkat	35,6	
NG97	55,77	0,69
T47D	> 100	
PBMC	> 100	13,6

3.2. Cell cycle and apoptosis assay

It was evaluated if LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 (IC₅₀=3,98) mixture compound induces interferences in cell cycle and apoptosis of lymphoma cells (Raji). The results obtained with evaluation of cell cycle showed that LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture compound does not induce significantly changes in all cell cycle phases (59,2% to G₀/G₁ and 33,9% to S/G₂/M) when compared to untreated group (56,6% to G₀/G₁ and 37,1% to S/G₂/M) (Figure 6 and Table 2). Furthermore, was not seen any cycle cell arrest in cell cycle phases. The Figure 7 shows the results for 24h period comparing cell population treated with LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture and untreated cells (p=0,1618).

These results confirm that the percentage of cells observed in sub G₀/G₁ phase are undergoing apoptosis (Table 2) and are compatible with the results obtained in the assessment of cell viability by MTT (Figure 5) and with annexin V/PI flow cytometric analysis (Figure 6) methods. Thus, it can be suggested that LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture compound shows a major cytotoxic activity than the cytostatic one and presents selectivity for cancer cell lineages. This can be demonstrated by the fact of the LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture not presents activity against normal cells PBMC differently to amsacrine that affects all cell types with none selectivity.

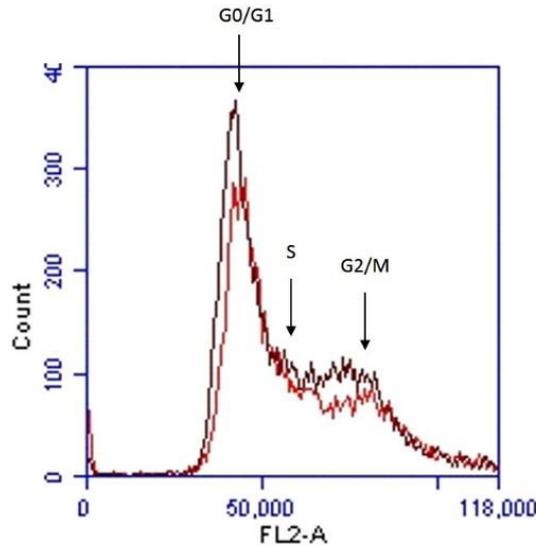


Figure 6: Effect of LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture in cell cycle of Burkitt lymphoma cells (Raji). The arrows indicates the cell cycle phases. The black line indicates LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture treated group. The red line indicates untreated group. The cell cycle was determined by analysis of tagging cells with propidium iodide (PI) by flow cytometry.

Table 2: Percentage of cells on different cell cycle phases. G0/G1: Gap 1 and Gap 2 cell cycle phases; S/G2/M: Synthesis, Gap 2 and Mitosis cell cycle phases; PI: propidium iodide; NT: non-treated group.

	G0/G1	S/G2/M	PI
	(%)	(%)	(%)
LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129	59,2	33,9	6,9
NT	56,6	37,1	0,7

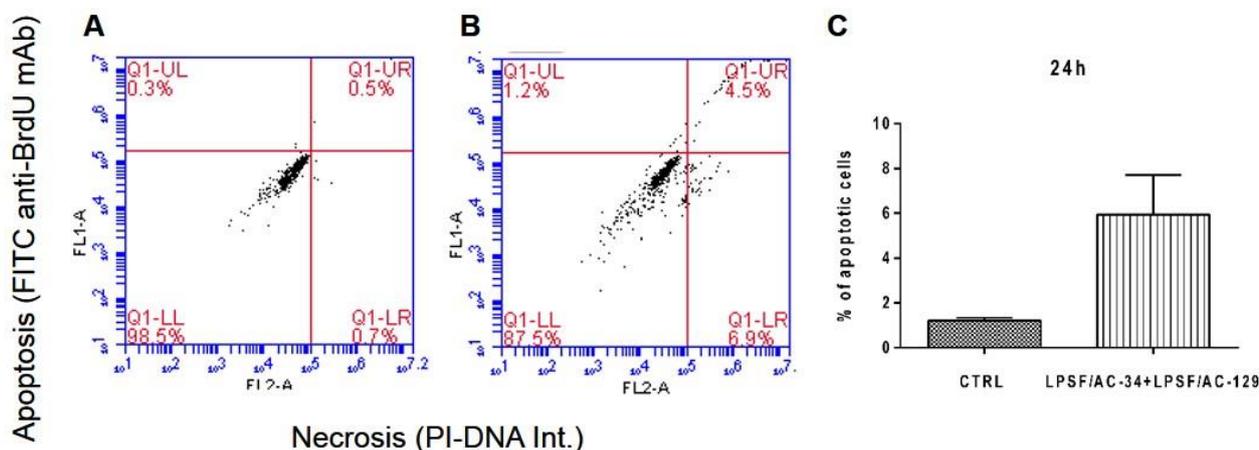


Figure 7: Evaluation of Burkitt lymphoma (Raji) cell death induced by LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture. The dot plots graphs indicates the apoptotic cell population in comparison to untreated cell population. The apoptosis was determined by analysis of tagging cells with BrdU by flow cytometry. FL1-A: Apoptosis. FL2-A: Necrosis. A: Untreated cell group; B: LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture treated group; C: Percentage of apoptotic cells for 24h period in earlier stage. Statistical analysis: Mann-Whitney test ($p=0,3333$)

4. Discussion

4.1. Cytotoxicity assay

According to the obtained results, the LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture shows significantly selectivity to tumor cells when compared to normal cells. Similar selectivity can be observed with thiazolo-[5,4-b]-quinolines front of K-562 cell line (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ et al., 2011). These compounds are isosteric of 9-anilinoacridines and share some structural similarities that can be related to similar biological activity.

Additionally, one of the thiazacridine molecules synthesized by GPIT research group, the LPSF/AC-10 (5Z)-5-(acridin-9-ylmethylene)-3-(4-chloro-benzyl)-1,3-thiazolidine-2,4-dione) was assayed against hematopoietic and solid tumor cell lines. The results obtained shows a better result for OVCAR-8 (ovarian carcinoma) on this cell line where the compound could inhibit the tumor cell growth lesser efficient than the ansacrine but in a way much more selective. However, the results to HL-60 were not satisfactory presenting cytotoxicity on tumoral and normal cells (BARROS et al., 2012). The results obtained to LPSF/AC-129 (5-acridin-9-ylmethylene-3-(3-chloro-benzyl)-4-thioxo-thiazolidin-2-one) are opposite: the molecule was more efficient to inhibit hematopoietic

tumor cell lines growth than the solid ones. Furthermore, another molecule associated with LPSF/AC-129, the LPSF-AC-34 (5-acridin-9-ylmethylene-3-(3-chloro-benzyl)-thiazolidin-2,4-dione) may have contributed to this change of biological activity because there are structural similarities among three related molecules. There is an evident resemblance between two molecules that occurs because: (1) both share the same amsacrine ring substituted on -9 position; (2) the thiazolidine ring is substituted with a sulfur atom in -4 position and a oxygen atom in -2 position for LPSF/AC-129 and substituted with two oxygen atoms in -2, -4 positions for LPSF/AC-10 and LPSF/AC-34; and (3) the benzyl group with a chloro atom as substituent in -3 position for LPSF/AC-129 and LPSF/AC-34 and in -4 position for LPSF/AC-10. The structural modifications promoted in LPSF/AC-129 enhanced the biological activity against hematopoietic cell lines and improve the selectivity but decreased the biological activity against adherent cells.

In 2010, 8 thiazacridinic compounds had their cytotoxicity activity assayed by the MTT method against SF-295 (SNC), HCT -8 (colon carcinoma) and MDA-MB435 (melanoma). The results were satisfactory because the compounds showed high cytotoxicity to the lineages tested highlighting the compounds LPSF/AA-2, LPSF/AA-3 and LPSF/AA-6 with an inhibition percentage greater than 50%. These three compounds were further tested against HL -60 and CCRF -CEM lineages also showing cytotoxic activity but not effective than the doxorubicin positive control used ($IC_{50} > 1 \mu\text{g/mL}$). Another compound, the LPSF/AA-5 (3-acridin-9-ylmethil-5-(4-chloro-benzylidene)-thiazolidin-2,4-dione) that has a chloro atom substituted at the 4-position of benzylidenic ring, was not effective against the tumor cell lines tested presenting inhibition percentage below than 40%. The LPSF/AA-5 was the least active of all the compounds synthesized and this can be attributed by the negative inductive effect and the small chloro atom size in the para position did not contribute to the activity (GALDINO-PITTA, 2010).

Furthermore, it is also reported by literature the low activity of amsacrine against breast cancer and other solid tumors being necessary the synthesis of new analogues to improve the capacity to combat solid tumors (BAGULEY et al., 1984). This can be attributed to resistance of tumor cell lines against many anticancer agents like amsacrine and this fact became an object of study for many researchers. Among some problems that could occur, one can list severe genetic instability and hypoxia. In this context, DNA intercalating agents such as acridine derivatives, are revealed as an important class of antineoplastic drugs designed to solve these problems (ATWELL et al., 1987).

The results obtained showed that LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture not causes significant changes in cell cycle phases and any cycle cell arrest was occurred. LPSF/AC-10 (5Z)-5-(acridin-9-ylmethylene)-3-(4-chloro-benzyl)-1,3-thiazolidine-2,4-dione) caused a small increase in the number of cells in the G2/M phase compared with the negative control (BARROS et al., 2013). When the two

results are compared, it can be concluded that the two compounds do not have the ability to interfere with cell cycle since they share the same structural chemical similarities. Even though the compound LPSF/AC-129 is not fully pure and that have a proportion of another analogue (LPSF/AC-34), there were any effect able to induce interference in cell cycle showed similar results to the previous performed with the compound LPSF/AC-10.

5. Conclusion

In this work we utilized the LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture. Additionally, was performed biological assays aiming evaluate the antitumoral activity against Raji, Jurkat and NG97 tumor cell lineages been presenting efficacy on decrease of cell growth. It was evident that there was more activity against hematopoietic cells than the solid ones. Selectivity assay was performed showing high selectivity of LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture against PBMCs. The new compound presented better than AMSA showing selectivity despite the IC₅₀ values higher than the presented by AMSA. Furthermore, the flow cytometry results showed the death induction mechanism by apoptosis suggesting a cytostatic effect.

6. References

- ATWELL, G. J. et al. Potential antitumor agents. 50. In vivo solid-tumor activity of derivatives of N-[2-(dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide. **Journal of medicinal chemistry**, v. 30, n. 4, p. 664–9, abr. 1987.
- BAGULEY, B. C. et al. Synthesis, antitumor activity, and DNA binding properties of a new derivative of amsacrine, N-5-dimethyl-9-[(2-methoxy-4-methylsulfonylamino) phenylamino]-4-acridinecarboxamide. **Cancer research**, v. 44, n. 8, p. 3245–51, ago. 1984.
- BARROS, F. W. et al. Inhibition of DNA topoisomerase I activity and induction of apoptosis by thiazacridine derivatives. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 268, n. 1, p. 37–46, 2013.
- BARROS, F. W. A. et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorg Med Chem**, v. 20, n. 11, p. 3533–3539, 1 jun. 2012.
- BELMONT, P.; DORANGE, I. Acridine/acridone: a simple scaffold with a wide range of application in oncology. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 18, n. 11, p. 1211–1224, nov. 2008.
- CHEARWAE, W.; BRIGHT, J. J. PPAR γ agonists inhibit growth and expansion of CD133+ brain tumour stem cells. **British journal of cancer**, v. 99, n. 12, p. 2044–53, 16 dez. 2008.

CHOLEWIŃSKI, G.; DZIERZBICKA, K.; KOŁODZIEJCZYK, A. M. Natural and synthetic acridines/acridones as antitumor agents: their biological activities and methods of synthesis. **Pharmacological reports : PR**, v. 63, n. 2, p. 305–36, jan. 2011.

DA COSTA LEITE, L. F. et al. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of arylidene-thiazolidinediones with potential hypoglycemic and hypolipidemic activities. **Eur J Med Chem**, v. 42, n. 10, p. 1263–1271, 2007.

DEMEUNYNCK, M.; CHARMANTRAY, F.; MARTELLI, A. Interest of acridine derivatives in the anticancer chemotherapy. **Current pharmaceutical design**, v. 7, n. 17, p. 1703–24, nov. 2001.

GALDINO-PITTA, M. DA R. **Novos Agentes Anticâncer Tiazacridínicos Substituídos : Síntese , Estrutura e Efeitos Biológicos**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

GALDINO-PITTA, M. R. et al. Niche for acridine derivatives in anticancer therapy. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 9, p. 1256–71, 10 jun. 2013.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, I. et al. Antineoplastic activity of the thiazolo[5,4-b]quinoline derivative D3CLP in K-562 cells is mediated through effector caspases activation. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 6, p. 2102–8, jun. 2011.

GROMMES, C. et al. Inhibition of in vivo glioma growth and invasion by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist treatment. **Molecular pharmacology**, v. 70, n. 5, p. 1524–33, nov. 2006.

HAU, P. et al. Low-dose chemotherapy in combination with COX-2 inhibitors and PPAR-gamma agonists in recurrent high-grade gliomas - A phase II study. **Oncology**, v. 73, n. 1-2, p. 21–25, jan. 2008.

JAIN, V. S.; VORA, D. K.; RAMAA, C. S. Thiazolidine-2,4-diones: progress towards multifarious applications. **Bioorg Med Chem**, v. 21, n. 7, p. 1599–1620, 2013.

LIBERMANN, D.; HIMBERT, J.; HENGL, L. La thiazolidione, point de depart d'une synthèse des acides thiopyruviques et thioglyoxyliques substituées. **Bull. Soc. Chim. France**, v. 4, p. 1120–1124, 1948.

MOURA, R. O. DE. **Síntese e avaliação antitumoral in vitro de novos derivados isoquinolínicos, quinazolínicos e piridínicos acridínicos**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2009.

PITTA, I. DA R. et al. **MOLECULES WITH ANTITUMOR ACTIVITY AND CHEMICAL SYNTHESIS** BrasilWorld Intellectual Property Organization, , 2004. Disponível em: <<http://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2004024058&recNum=1&maxRec=&office=&prevFilter=&sortOption=&queryString=&tab=PCT+Biblio>>

PITTA, I. DA R.; GALDINO, S. L.; LIMA, M. DO C. A. DE. **Acridine derivatives with antitumoral activity** BrasilWorld Intellectual Property Organization, , 4 out. 2007. Disponível em: <<http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2007109871>>. Acesso em: 28 ago. 2013

REDDY, R. C. et al. Chemotherapeutic drugs induce PPAR-gamma expression and show sequence-specific synergy with PPAR-gamma ligands in inhibition of non-small cell lung cancer. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 10, n. 6, p. 597–603, jun. 2008.

SANCHEZ-GARCIA, I.; VICENTE-DUENAS, C.; COBALEDA, C. The theoretical basis of cancer-stem-cell-based therapeutics of cancer: can it be put into practice? **Bioessays**, v. 29, n. 12, p. 1269–1280, 2007.

SILVA, T. G. DA. **SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS ACRIDINO-TIAZOLIDÍNICOS E ACRIDINO-IMIDAZOLIDÍNICOS**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

SILVA, T. G. et al. Synthesis and structural elucidation of new benzylidene imidazolidines and acridinylidene thiazolidines. **Heterocyclic Communications**, v. 7, n. 6, p. 523–528, jan. 2011.

TSUGE, O. et al. Compounds Related to Acridine. I.* Condensation of Acridine Derivatives Having Active Methyl Group and Aromatic Nitroso Compounds. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 36, n. 11, p. 1477–1485, 1963.

ZHANG, G. Y. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) agonist inhibits transforming growth factor-beta1 and matrix production in human dermal fibroblasts. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**, v. 63, n. 7, p. 1209–1216, 2010.

7. Acknowledgements

Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco (FACEPE), Instituto Nacional da Ciência e Tecnologia – Indústria Farmacêutica (INCT_if) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Artigo 2

7. Artigo 2

A ser submetido na revista Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters (ISSN: 0960-894X)

Fator de Impacto: 2,331

Extrato no Qualis CAPES Farmácia: B1

Title: EVALUATION OF GENE AND PROTEIN MODULATION BY ASSOCIATED THIAZACRIDINIC COMPOUNDS LPSF/AC-34 AND LPSF/AC-129 IN LEUKEMIC CELLS

Authors: THIAGO UBIRATAN LINS E LINS, MICHELLY CRISTINY PEREIRA, MOACYR JESUS BARRETO DE MELO RÊGO, MARDONNY BRUNO DE OLIVEIRA CHAGAS, KAMILA DE MELO VILAR, RICARDO OLÍMPIO DE MOURA, MARINA GALDINO DA ROCHA PITTA, MARIA DO CARMO ALVES DE LIMA, IVAN DA ROCHA PITTA, MAÍRA GALDINO DA ROCHA PITTA

Abstract: The effect of LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture was assayed against two hematopoietic tumor cell lineages and normal cells PBMCs. The cytotoxicity and selectivity were evaluated through MTT assay. RT-PCR was performed to evaluate the possible alterations on genic expression after 10h of incubation with the compound mixture. Western blotting analysis was performed aiming to elucidate protein expression in a period of 24h. The LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture showed high ability to inhibit cell growth of both hematopoietic tumor cell lineages and presented high selectivity to inhibits tumoral cells when assayed against normal cells PBMCs. The LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 derivatives mixture led to upregulation of GADD153 and PPAR genes in HL-60 lineage. These genes are related to stress reticulum and nuclear transcription respectively. The expression of SOD1 decreased in CCRF-CEM cell lineage indicating that the compound interferes in processes related to oxidative stress. The LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture led to a decrease in protein expression of NFkB ($p = 0.3012$) and increased expression of Bax ($p = 0.9221$) in the HL-60 cell line showing that Bax participates in the apoptosis and the mixture has anti-inflammatory activity by inhibiting the NFkB. Thus, it can be suggested that LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture contributes to induce the apoptotic process by modulation of genic and protein expression playing an important role on cell growth inhibition of tumor cells.

Keywords: amsacrine analogues, selectivity, apoptosis, genic expression, protein expression, upregulation

1. Introduction:

Hematopoietic cancers (leukemias), have high incidence affecting many people in the world. Acute myeloid leukemia (AML) is characterized by presence of myeloid progenitor cells in bone marrow causing hematopoietic failure (ROBAK; WIERZBOWSKA, 2009). The incidence of AML in adults (>60 years) is very accentuated. This disease has implications as cytogenetic and molecular alterations that causes chromosomal abnormalities that can be used as markers for prognosis. For treatment is used cytotoxic agents as cytarabine and daunorubicin (KUENDGEN; GERMING, 2009). In acute lymphoblastic leukemia (ALL) there is the presence of lymphoid precursors that originates leukemias of B- or T-cells. ALL affects in majority children with a median age of 12 years old. The treatment is realized with chemotherapy which is effective for most of patients (CORTES; KANTARJIAN, 1995).

For both types of leukemia, chemotherapy is an essential stage of treatment needing different antineoplastic agents that be effective to treatment of hematopoietic cancers (MARSH, 1976). In this context, there is the thiazolidine compounds. Some studies have demonstrated that thiazolidine ring has antitumoral properties against various types of cell lineages (ONEN-BAYRAM et al., 2012). PPAR γ is expressed in both myeloid and lymphoid leukemic cells and the PPAR γ agonists have leukemia cell proliferation inhibitory properties (LIU et al., 2012b). Another class of compounds with antitumoral activity against hematopoietic cancers is the amsacrine derivatives that has been used successfully in the treatment of acute promyelocytic leukemia, adult acute lymphoblastic leukemia and adult acute myeloid leukemia but it has not been successful in the treatment of solid tumors and it has presented high cytotoxicity (DENNY, 2002).

In this context, the synthesis of two new molecules, the LPSF/AC-34 and LPSF/AC-129 was performed. The molecules obtained were structurally characterized by nuclear magnetic resonance (^1H NMR), mass spectrometry and infrared spectroscopy. The antitumoral activity of the compounds was tested against tumor cell lines Raji, Jurkat, T47D and NG97 presenting efficacy on decrease of cell growth mainly of hematopoietic cells and presenting high selectivity when assayed against normal cells PBMCs. Furthermore, the flow cytometry was performed showing death induction mechanism by apoptosis.

So, the aim of this study was evaluate the cytotoxicity and selectivity of LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 thiazacridinic mixture on hematopoietic cancer cell lines and evaluate genic and protein expression modulated by this new derivative.

2. Material and Methods:

2.1. Cytotoxicity assay:

Human myeloid leukemia (HL-60) and human lymphoid leukemia (CCRF-CEM) cell lines, obtained from Rio de Janeiro Cell Bank/RJ, Brazil. All the cells lineages were grown in RPMI 1640 medium containing antibiotics (penicillin 100ug/mL; streptomycin 100ug/mL) and supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, in 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C.

The cytotoxicity of the LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture was evaluated through MTT assay that quantifies the ability of living cells to reduce a yellow dye, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), to a purple formazan product. For all experiments, the cells were seeded in 96-well plates (1×10^4 cells/well). After 24 h, the mixture (25, 50 and 75 μ M) was dissolved in DMSO, added to each well and incubated for 72 h. Amsacrine (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) was used as a positive control. Supplemented RPMI medium containing DMSO 0,1% was used as vehicle. At the end of the incubation, the MTT (5 mg/mL) was added in each well. After 3 h, the formazan product was dissolved in SDS 20% and the absorbance was measured using a multiplate reader (Biotek). The substance effect was quantified as the percentage of the vehicle absorbance at 570 nm.

2.2. Selectivity assay

In this work, the LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture selectivity was obtained through MTT assay. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were harvested of whole blood of health volunteers who remained without drinking alcohol and use of drugs during 15 days. All experiments were in accordance with the Research Ethics Committee (Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco – CEP/CCS). All volunteers were aware of the research objectives through the presentation of a Consent Form and Clarification to Literate Citizens that was properly completed and signed by the volunteers.

The whole blood collected was centrifuged in a Ficol-Hypaque (GE Healthcare) gradient for 45 minutes and purified through repeated washings with erythrocyte lysis buffer and centrifugations. Then, the cells were seeded in 96-well plates (1×10^4 cells/well) for treatment during 48h with compound mixture at 1, 10, 25, 50, 75 and 100 μ M doses. The assay was performed by the MTT method.

2.3. Quantitative RT-PCR

HL-60 and CCRF-CEM cells (2×10^6) were seeded in six-well plates with LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture (IC50) to evaluate the genic expression. After 10h, cells were washed twice with ice-cold PBS and RNA was extracted by Trizol method. The cDNAs amplification reaction was performed with PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) and specific probes for genes: PPAR γ (TaqMan Hs01115513_m1), p21 (Hs00355782_m1 TaqMan), BID (Hs00609632_m1 TaqMan), GADD153 (TaqMan Hs00358796_g1) and RIP-3 (Hs00819388_m1 TaqMan), using the amplification equipment ABI Prism 7900HT sequence Detection PCR machine (Applied Biosystems, California, USA) according to the manufacturer's instructions. It was used the GADPH reference gene (TaqMan Hs03928990_g1) whose expression is constitutive for subsequent comparative analysis of the expression level of the transcripts of interest. The results were expressed as a geometric medium of three independent experiments.

2.4. Protein expression

The protein expression was performed by Western Blotting protocol. HL-60 and CCRF-CEM cells (5×10^6) were seeded in six-well plates with LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture (IC50) to evaluate the protein expression. After 24h, cells were washed twice with ice-cold PBS and scraped off the wells in lysis buffer containing 3% SDS, 0.25 M Tris and 1 mM phenyl-methyl-sulfonyl fluoride (PMSF). Protein concentration was performed with a Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Protein samples (50 μ g) were analyzed by SDS-PAGE 10% acrylamide for NF κ B and pPTEN and SDS-PAGE 12% acrylamide for Bax and GADD153. Then, the gels were electro-blotted on PVDF membrane (Amersham Hybond-P PVDF Membrane - GE Healthcare UK Ltd., England). Immunoblots were performed according to standard methods using the following antibodies: rabbit polyclonal antihuman pPTEN (Ser380) sc-31714; rabbit polyclonal antihuman NF κ B p65 (C-20) sc-372; mouse monoclonal antihuman Bax (2D2) sc-20067; mouse monoclonal antihuman GADD 153 (B-3) sc-7351; mouse monoclonal antihuman PPAR γ (E-8) sc-7273; mouse monoclonal antihuman β -actin (C4) sc-47778 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:500 in PBS 1x free fat milk 5% tween 20 0,05%). Proteins were visualized with a substrate-chromogen system (DAKO K3468) for use in peroxidase-based immunohistochemical methods (DAKO North America, Inc., Carpinteria, CA, USA). Colorimetric bands were analyzed with an image densitometer (AlphaImager Mini System, Protein Simple, Santa Clara, CA, USA) using the ImageJ software for band densitometry

(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). The quantification was performed by calculating the protein expression ratio between proteins of interest and β -actin.

2.5. Statistical analysis

All values showed are the mean of three independent experiments in triplicate. Results were expressed as a percentage of the controls and the computer software Origin 8 was used to determine IC50 values (concentration required to inhibit 50% of the cell viability). The results was considerate significant when $p < 0,05$.

3. Results

3.1. Cytotoxicity

The LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture showed activity against both human myeloid leukemia (HL-60) (IC50 = 8,05 μ M) and human lymphoid leukemia (CCRF-CEM) (IC50 = 14,27 μ M) cell lineages. All the results was compared with antitumoral compound amsacrine that shows IC50 = 0,25 μ M for HL-60 and IC50 = 1,84 μ M for CCRF-CEM. It was still assayed the cytotoxicity tests using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (IC50 > 100 μ M for LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture; IC50 = 3,45 μ M for AMSA). The results are showed in Figure 1 (A, B and C) and Table 1.

Table 1: IC50 values from MTT and selectivity assays

Cell lineage	IC50 (μ M)	
	LPSF/AC-34+AC-129	AMSA
HL-60	8,05	0,25
CCRF-CEM	14,27	1,84
PBMC	> 100	3,45

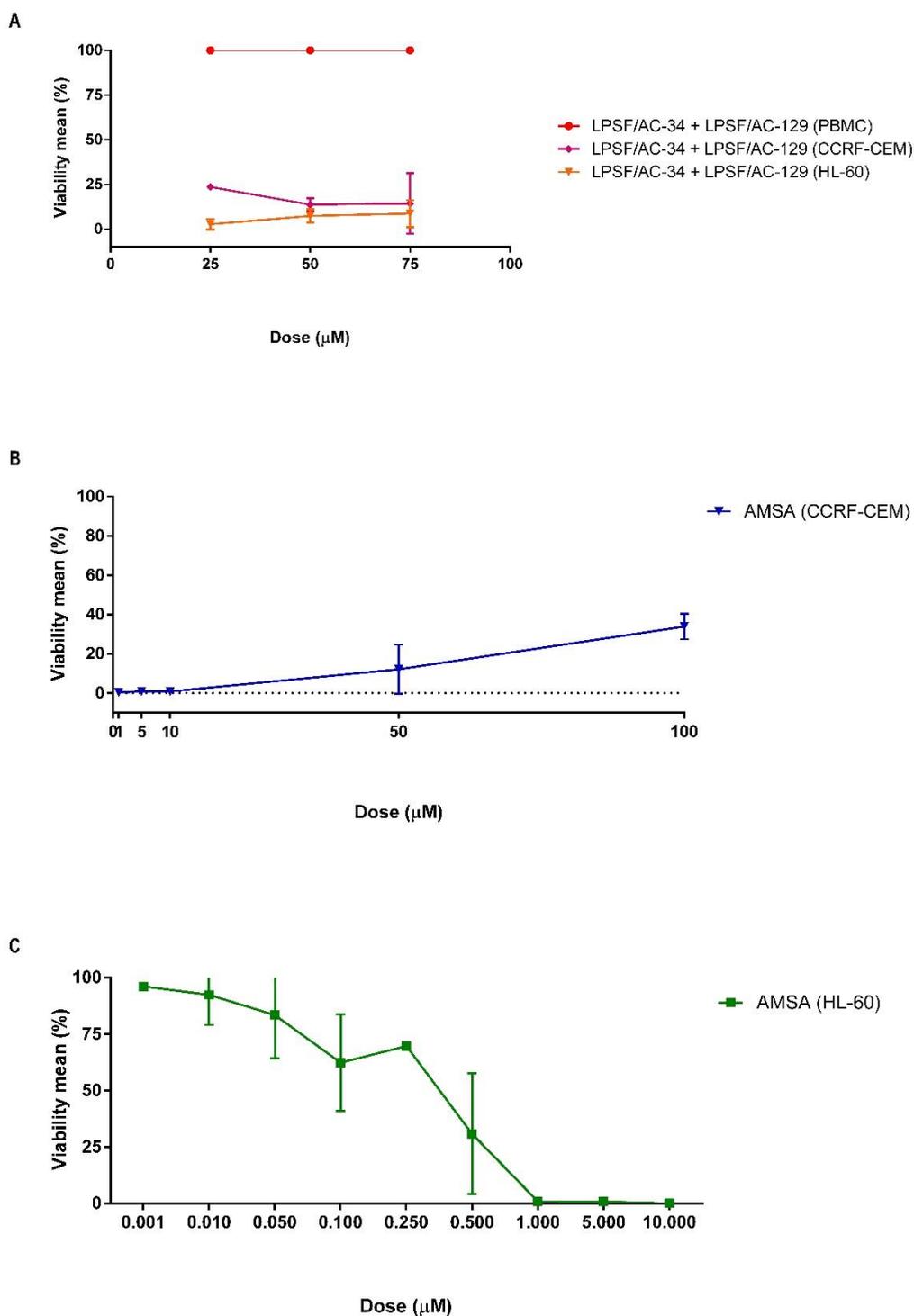


Figure 1: Cell viability evaluation of LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture on HL-60 and CCRF-CEM lineages (A). Amsacrine was assayed as positive control on CCRF-CEM (B) and HL-60 (C) lineages. The results are expressed as percentage of viability mean versus dose assayed (μM). The viability expressed as percentages indicates the compound mixture antiproliferative activity: below 30% - EXCELLENT; between 30-60% MODERATED; between 60-100% - INACTIVE.

3.2. Quantitative RT-PCR

The LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture had the ability to modulate the genic expression for both cells lineages. For HL-60 cell line, the expression of gene GADD153 was increased 12,4701 fold (ratio between means of LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 and AMSA) with a $p=0,0808$ (Figure 2A). The same was occurred for genic expression of PPAR γ compared to cell not treated. The enhancement of PPAR γ was 4,8202 fold ($p=0,2277$) (Figure 2B). The p value indicates the statistical significance between treated and control groups.

The results obtained to CCRF-CEM cell line was more apparent than the other cell line tested because more genes were modulated (Figure 3). In these assays, 7 genes had their genic expression modulated: Bcl-2 (0,9760 fold; $p=0,4409$); Beclin (0,8436 fold; $p=0,7877$); Bid (1,6224 fold; $p=0,3911$); GADD153 (0,3133 fold; $p=0,2643$); p21 (0,2191; $p=0,8423$); RIP3 (0,9710; $p=0,3722$); SOD1 (1,2995; $p=0,0172$). Only SOD1 genic expression showed significant results ($p<0,05$).

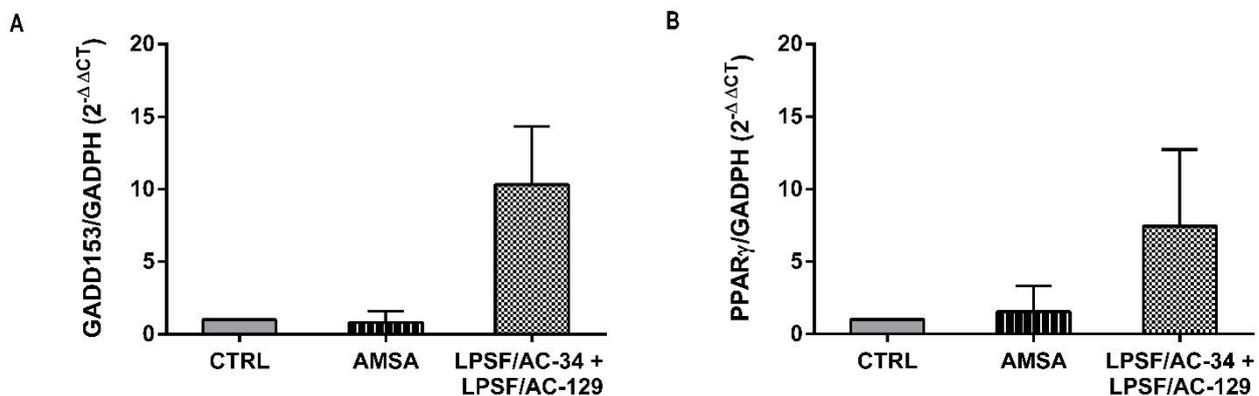


Figure 2: Analysis of genic expression related with apoptosis process in HL-60 cell lineage for a period of 10h. A: GADD153 ($p=0,0808$); B: PPAR γ ($p=0,2277$). Unpaired Student t-test considering $p<0,05$ as significative was performed for statistical analysis. The results are expressed as the average of 3 independent experiments.

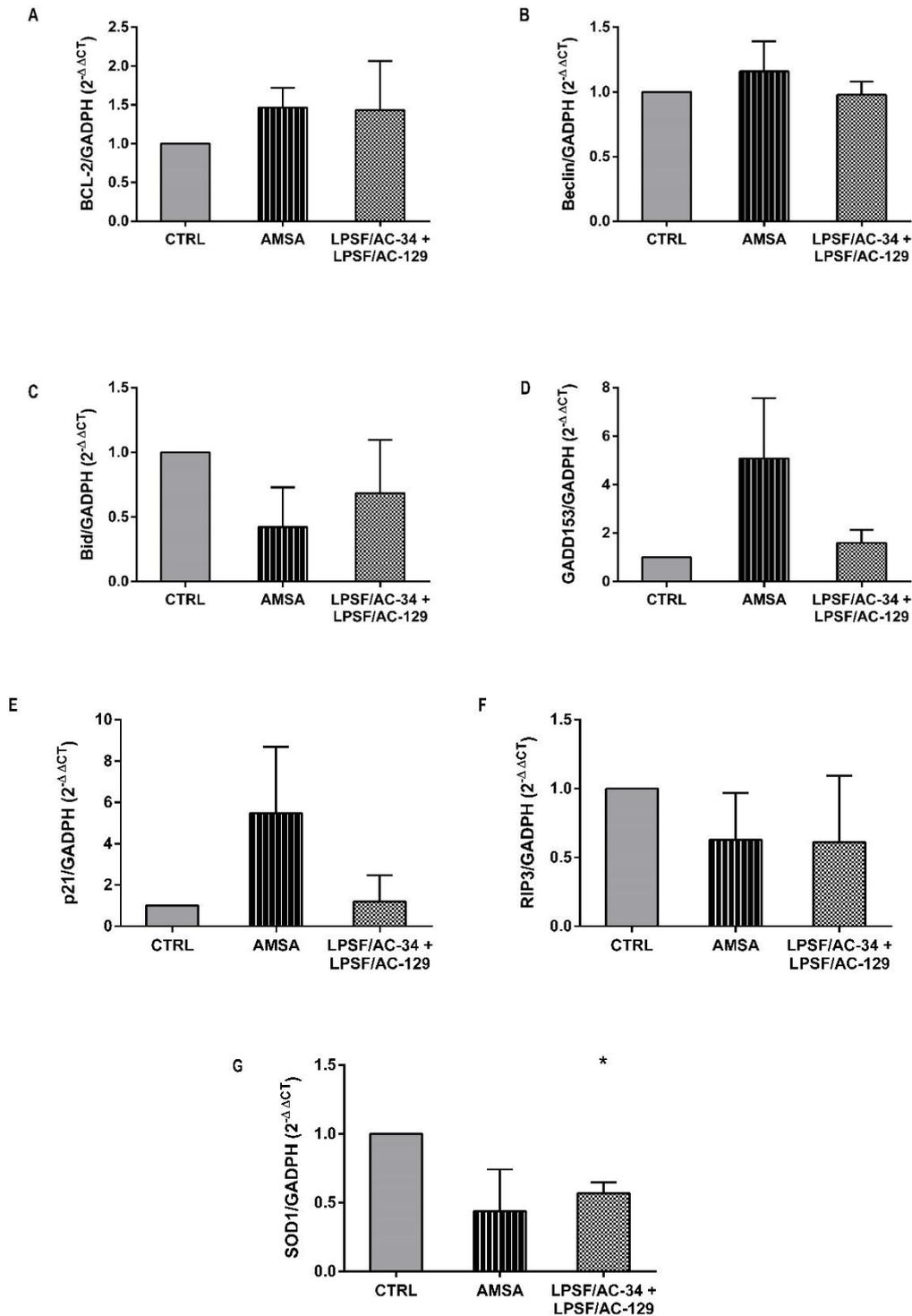


Figure 3: Analysis of genic expression related with apoptosis process in CCRF-CEM cell lineage for a period of 10h. A: Bcl-2 ($p=0,4409$); B: Beclin ($p=0,7877$); C: Bid ($p=0,3911$); D: GADD153 ($p=0,2643$); E: p21 ($p=0,8423$); F: RIP3 ($p=0,3722$); G: SOD1 ($p=0,0172$). Unpaired Student t-test considering $p<0,05$ as significative was performed for statistical analysis.

3.3. Protein expression

The expression of proteins related with apoptosis was assayed through western blotting. The results obtained shows that only Bax and NfκB were modulated by treatment with LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture. The level of Bax in both cells lineages HL60 and CCRF-CEM were increased by mixture when compared to control ($p=0,9221$ and $p=0,6956$, respectively). For CCRF-CEM, there was significative difference between LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture and control groups ($p=0,0053$) and, at the same time, between LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture and AMSA groups ($p=0,0247$). For HL-60 cell lineage, the results shows that NFκB levels are more increased in AMSA group than the LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture group when compared to control ($p=0,3012$) (Figure 4) but the results were not significant. But, the levels of GADD153 and pPTEN were detected, not being possible to visualize the bands (Table 2).

Table 2: Ratio average of protein expression

Proteins	HL-60 (Ratio average)			CCRF-CEM (Ratio average)		
	LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129	AMSA	NT	LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129	AMSA	NT
Bax	0,7609	0,5356	0,7166	0,9704	0,7785	0,9028
NFκB	0,5610	0,6855	0,6315	3,9045	2,2065	1,6185
GADD153	-	-	-	-	-	-
pPTEN	-	-	-	-	-	-
PPARγ	-	-	-	-	-	-

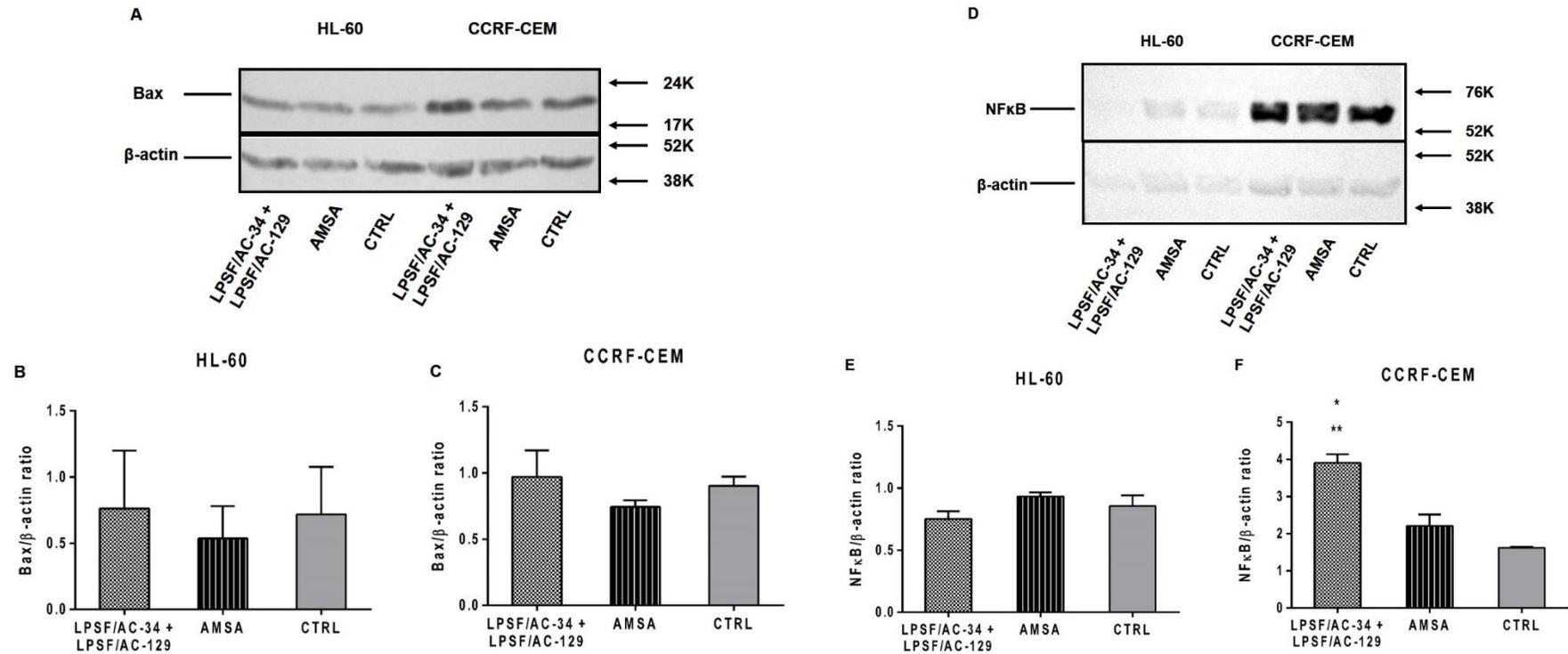


Figure 4: Protein densitometry determined by Western Blotting analysis. A: Representative bands of Bax and β -actin; B: Densitometry graph of Bax of HL-60 cell lisate ($p=0,9221$); C: Densitometry graph of Bax of CCRF-CEM cell lisate ($p=0,6956$); D: Representative bands of NF κ B and β -actin; E: Densitometry graph of NF κ B of HL-60 cell lisate ($p=0,3012$); F: Densitometry graph of NF κ B of CCRF-CEM cell lisate ($p=0,0053$). One * indicates statistical significance between LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 and AMSA groups. Two ** indicates statistical significance between LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture and control groups. All results are demonstrated as ratio between the protein of interest and the housekeeping protein β -actin. Unpaired Student t-test was performed for compare all groups considering $p>0,05$ as significative.

4. Discussion

4.1. Cytotoxicity

In cancer treatment, cytostatic drugs toxicity is usually a limiting factor of the administered dose. Some of the research aimed to reduce the toxic effects of cytostatic drugs such as amsacrine on normal cells while shows selectivity to inhibit tumor cell growth (SUNDMAN-ENGBERG; TIDEFELT; PAUL, 1998)

In the results obtained, it can be observed that LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture showed significantly selectivity to inhibit hematopoietic tumor cells and at the same time not caused interferences on normal cells PBMCs. This find can be partially explained by the fact of amsacrine and their analogues has been used successfully in the treatment of acute promyelocytic leukemia, adult acute lymphoblastic leukemia and adult acute myeloid leukemia but it has not been succesful in the treatment of solid tumors (DENNY, 2002). Trials clinical assays with 109 acute myeloblastic leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL) adults patients had showed that AMSA is an active antileukemic agent, with an overall response rate of 28% in patients with acute myeloblastic leukemia (LEGHA et al., 1982). These studies confirm the efficiency of amsacrine and their derivative to inhibit growth of hematopoietic cancers.

Another study on literature shows that two thiazacridinic compounds synthesized by GPIT group, the LPSF/AA-3 (3-acridin-9-yl-methyl-5-(4-metoxi-benzylidene)-thiazolidin-2,4-dione) and LPSF/AA-6 (3-acridin-9-yl-methyl-5-(4-bromo-benzylidene)-thiazolidin-2,4-dione) have structural similarity with LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture. These compounds had their cytotoxicity evaluated and presented an IC₅₀ values higher than 25 µg/mL against HL-60 and CCRF-CEM lineages. These results shows a discrete cytotoxic activity when compared to doxorubicin used as positive control (IC₅₀ >1 µg/mL) (GALDINO-PITTA, 2010).

Thus, it can be concluded that association between LPSF/AC-34 and LPSF/AC-129 caused enhancement in efficacy against the hematopoietic tumor cells. This may be attributed to the higher binding flexibility with the nitrogen thiazolidine benzyl group when compared to LPSF/AA-5 (3-acridin-9-ylmethyl-5-(4-chloro-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione). This molecule has the benzyl group in a more rigid position (thiazolidine 5 position) where a double bond exists decreasing the flexibility of the side chain and at the same time promoting decreased cytotoxicity effect to compound (GALDINO-PITTA, 2010).

4.2. Quantitative RT-PCR

In this work, it was demonstrated the PPAR γ genic expression upregulation was promoted by LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture in HL-60 leukemic cells. It is known that PPAR γ can inhibit the activity of p65 subunit of NF κ B. Agonists of PPAR γ can interfere directly in NF κ B promoting the deactivation of antiapoptotic pathway leading the cells to apoptosis (SHIMADA, 2002). These agonists have capacity of inhibition cell growth in some cancers as lung, prostate, colon, thyroid, gastric and pancreas (TERASHITA et al., 2002).

Also, it was demonstrated upregulation occurred on GADD153 genic expression in HL-60 cell line. Studies shows that oxidative stress caused by reactive oxygen species (ROS) is an existing process in various types of cancer including the hematopoietics. The ROS presence causes damages to lipids, proteins, carbohydrates and nucleic acids. Consequently, these damages results in high level of oxidative stress leading the cells to accumulate prooxidant species. One of ROS source is the mitochondrial oxidative phosphorylation via cytochrome oxidase. Some genes like GADD153, are responsible of antioxidant protein expression related with the mitochondrial via (CROSBY et al., 2000). So, the upregulation of GADD153 it is a good find. A study with HT-29 colon cancer cells, for example, showed that upregulation in GADD153 genic expression can be stimulated by agonists of PPAR γ as troglitazone when incubated during 8 hours (SHIMADA, 2002).

Another notable result is the SOD1 genic expression decrease in CCRF-CEM cell line (1,2995; $p=0,0172$). It is known there is a relationship between genic expressions of SOD1 and NF κ B. The cytoprotective effect of NF κ B is related to the target genes regulation of apoptosis regulators such as members of Bcl-2 family and SOD1. The increased expression of SOD1 is related to the TNF-mediated death inactivation preventing the cells from ROS production induced apoptosis (DELHALLE et al., 2002). Thereby, NF κ B protects the cells from oxidative stress by inducing the SOD1 gene (REUTER et al., 2010). The result obtained in this work shows decreased SOD1 genic expression indicating decreased genic expression causing the cell to be less resistant to effect of ROS production induced apoptosis and maybe by the compounds percentages difference. On other hand, the p21, RIP3, GADD153, BID, Beclin and Bcl-2 genic expression not had any alterations. This fact could be explained by the fact that the incubation time in culture have been too much considering that the majority of genes have a genic expression peak with less than 8 hours.

4.3. Protein expression

The enhanced modulation of BAX protein in Western Blotting analysis for both cell lineages could be explained by the fact of some amsacrine analogues stimulate the protein expression. Camptothecin, an analogue of amsacrine has demonstrated your effect on modulation of Bax increasing the protein levels after treatment of 24h (GIULIANO et al., 1998). Studies using HCT116/Bax^{-/-} cells have demonstrated resistance to treatment with acridine derivatives indicating that the mitochondrial pathway plays an important role in the mechanism of acridine-derivative-induced apoptosis (WANG et al., 2005).

In this work, NFκB protein levels was decreased to HL-60 and increased to CCRF-CEM cell lines. The literature shows that NFκB homodimers and heterodimers remain dormant associated to IκB inhibitors family. Some compounds with DNA damage properties like as camptothecin and amsacrine promotes the transient activation of NFκB (DEJARDIN, 2006). NFκB promotes apoptosis and senescence through mediation of recruitment of FADD and caspase 8 leading to induction of signalling complex to increase tumor cell sensitivity in apoptosis mediated by Fas (LIU et al., 2012a).

5. Conclusion

In this work was evaluated the cytotoxicity and selectivity of the new thiazacridine compound LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 mixture. Also, it was clear that the compound cause interferences on cell metabolism. It can be suggested that mixture contributes to stimulate the apoptotic process by modulation of genic and protein expression playing an important role on cell growth inhibition of tumor cells.

6. References

CORTES, J. E.; KANTARJIAN, H. M. Acute lymphoblastic leukemia a comprehensive review with emphasis on biology and therapy. **Cancer**, v. 76, n. 12, p. 2393–2417, 15 dez. 1995.

CROSBY, L. M. et al. Morphologic analysis correlates with gene expression changes in cultured F344 rat mesothelial cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 169, n. 3, p. 205–21, 15 dez. 2000.

DEJARDIN, E. The alternative NF-κB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. **Biochemical pharmacology**, v. 72, n. 9, p. 1161–79, 30 out. 2006.

- DELHALLE, S. et al. NF-kappaB-dependent MnSOD expression protects adenocarcinoma cells from TNF-alpha-induced apoptosis. **Oncogene**, v. 21, n. 24, p. 3917–24, 30 maio 2002.
- DENNY, W. A. Acridine derivatives as chemotherapeutic agents. **Current medicinal chemistry**, v. 9, n. 18, p. 1655–65, set. 2002.
- GALDINO-PITTA, M. DA R. **Novos Agentes Anticâncer Tiazacridínicos Substituídos : Síntese , Estrutura e Efeitos Biológicos**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2010.
- GIULIANO, M. et al. Induction of apoptosis in human retinoblastoma cells by topoisomerase inhibitors. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 39, n. 8, p. 1300–11, jul. 1998.
- KUENDGEN, A.; GERMING, U. Emerging treatment strategies for acute myeloid leukemia (AML) in the elderly. **Cancer treatment reviews**, v. 35, n. 2, p. 97–120, abr. 2009.
- LEGHA, S. S. et al. Evaluation of AMSA in previously treated patients with acute leukemia: results of therapy in 109 adults. **Blood**, v. 60, n. 2, p. 484–90, ago. 1982.
- LIU, F. et al. NF-κB directly regulates Fas transcription to modulate Fas-mediated apoptosis and tumor suppression. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 30, p. 25530–40, 20 jul. 2012a.
- LIU, J.-J. et al. Inhibition of lymphoma cell proliferation by peroxisomal proliferator-activated receptor-γ ligands via Wnt signaling pathway. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 62, n. 1, p. 19–27, jan. 2012b.
- MARSH, J. C. The effects of cancer chemotherapeutic agents on normal hematopoietic precursor cells: a review. **Cancer research**, v. 36, n. 6, p. 1853–82, jun. 1976.
- ONEN-BAYRAM, F. E. et al. A novel thiazolidine compound induces caspase-9 dependent apoptosis in cancer cells. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 17, p. 5094–102, 1 set. 2012.
- REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 11, p. 1603–1616, 2010.
- ROBAK, T.; WIERZBOWSKA, A. Current and emerging therapies for acute myeloid leukemia. **Clinical therapeutics**, v. 31 Pt 2, p. 2349–70, jan. 2009.
- SHIMADA, T. Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. **Gut**, v. 50, n. 5, p. 658–664, 1 maio 2002.
- SUNDMAN-ENGBERG, B.; TIDEFELT, U.; PAUL, C. Toxicity of cytostatic drugs to normal bone marrow cells in vitro. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 42, n. 1, p. 17–23, jan. 1998.
- TERASHITA, Y. et al. Decreased peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression is correlated with poor prognosis in patients with esophageal cancer. **Japanese journal of clinical oncology**, v. 32, n. 7, p. 238–43, jul. 2002.
- WANG, W. et al. Acridine derivatives activate p53 and induce tumor cell death through Bax. **Cancer biology & therapy**, v. 4, n. 8, p. 893–8, ago. 2005.

7. Acknowledgements

Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco (FACEPE), Instituto Nacional da Ciência e Tecnologia – Indústria Farmacêutica (INCT-IF) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conclusões

8. Conclusões

- Foi obtido com êxito a partir de síntese orgânica foi obtido a mistura dos derivados tiazacridínicos, o LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129.
- A mistura de compostos mostrou-se eficaz na inibição da proliferação celular principalmente dos tumores hematopoiéticos semelhantes à leucemia humana indicando atividade citotóxica.
- A mistura LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 apresentou elevada seletividade na inibição do crescimento de células tumorais em comparação com as células mononucleadas do sangue periférico de voluntários sadios
- Constatou-se que a mistura LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 possui atividade citotóxica e que possivelmente induz a célula tumoral à morte por apoptose.
- A mistura dos derivados LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 levou a maior expressão dos genes GADD153 e PPAR γ na linhagem HL-60. Estes genes estão relacionados com estresse de retículo e transcrição nuclear de genes pró/anti-inflamatórios respectivamente.
- A mistura dos derivados LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 levou a diminuição da expressão de SOD1 na linhagem CCRF-CEM. Este gene está relacionado à proteção ao processo de estresse oxidativo celular
- A mistura dos derivados LPSF/AC-34 + LPSF/AC-129 levou a uma significativa diminuição da expressão proteica de NF κ B na linhagem CCRF-CEM e um aumento da expressão de Bax na linhagem HL-60 mostrando que Bax participa do processo de apoptose podendo induzi-la e que a mistura pode induzir a atividade de NF κ B.

Persperctivas

9. Perspectivas

- Para comprovação da atividade anticâncer da mistura das moléculas LPSF/AC-34 e AC-129, será necessária a realização de uma purificação para que, uma vez as moléculas estando separadas, possam ser realizados os experimentos já citados neste trabalho, atribuindo-se assim uma atividade anticâncer para cada uma delas de forma proporcional.
- Para melhor elucidação dos mecanismos celulares e moleculares apresentados será necessária a repetição de alguns experimentos como por exemplo a avaliação da expressão gênica por RT-PCR
- Para comprovar que a mistura de compostos possui atividade apoptótica será necessária realização do ensaio de caspases 3 e 7, componentes essenciais no desencadeamento do processo de apoptose.
- Uma vez cumpridas as perspectivas citadas, serão incluídos os resultados obtidos nos artigos apresentados neste trabalho para que possam ser publicados devidamente nos periódicos previamente estabelecidos.

Anexos

10. Anexos

10.1. Parte Química

10.1.1. Descrição da metodologia de síntese

A síntese do derivado acridínico foi realizada de acordo com a via plena convergente, onde se realizou separadamente a obtenção de todos os intermediários acridínicos, e paralelamente foi obtido o núcleo tiazolidínico substituído na posição 3 a ser adicionado ao anel acridínico (MOURA, 2009; SILVA, 2003).

10.1.2. Síntese da 9-metil-acridina (AC-1)

A reação da difenilamina com o ácido acético conduz à 9-metil-acridina (TSUGE et al., 1963). Foram utilizados 2,5 g - 0,0147 mols de difenilamina (1), 3 mL de ácido acético (2) e 10 g - 0,0734 mols de cloreto de zinco (3), que foram aquecidos a uma temperatura de 220 °C, durante 8 horas. A mistura reacional foi tratada inicialmente com uma solução recém preparada de ácido sulfúrico a 10 % e, em seguida, alcalinizada através da adição de uma solução de hidróxido de amônio a 30 %. A 9-metil-acridina foi isolada através de uma extração com acetato de etila, e concentrada à secura em rotaevaporador a uma temperatura de 50 °C. O produto obtido foi purificado através de cromatografia sob pressão em sílica gel 60, utilizando como sistema de eluição n-hexano/AcOEt 7:3.

10.1.3. Síntese da acridina-9-carboxaldeído (AC-2)

Inicialmente foram colocados, em um balão de duas bocas, o clorocromato de piridínio (PCC) (4) (2,0392 g - 0,0094 mols) e o sulfato de magnésio (5) (5,0980 g - 0,0423 mols) em presença de diclorometano anidro (6) (51 mL). A mistura reacional foi agitada e logo em seguida a 9 metil-acridina (AC-1) (1,7264 g - 0,0089 mols) foi adicionada. A agitação foi mantida à temperatura ambiente e sob uma atmosfera inerte durante 18 horas. O composto acridina-9-carboxaldeído (AC-2) foi extraído do meio reacional com éter etílico e evaporado à secura. O aldeído obtido foi purificado através de cromatografia sob pressão em sílica gel 60, utilizando como sistema de eluição n-hexano/AcOEt 6:4.

10.1.4. Síntese do 2-ciano-acridin-9-il-acrilato de etila (IP-29)

Foram introduzidos a um balão de fundo redondo a acridina-9-carboxaldeído (AC-2) (2,1821 g - 0,0105 mols) e o cianoacetato de etila (7) (3 mL) em presença de piperidina (8) (250 µL), como catalisador, e benzeno anidro (9) (50 mL), como solvente. A mistura reacional foi aquecida a refluxo a uma temperatura de 110 °C, durante 8 horas. O 2-ciano-acridin-9-il-acrilato de etila foi guardado na geladeira por 12 horas. O éster cianocinâmico obtido foi purificado por cromatografia sob pressão em sílica gel 60, n-hexano/AcOEt 6:4.

10.1.5. Síntese do 3-(3-cloro-benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona (TAS-1)

Através da reação da tiouréia (10) com o ácido cloroacético (11), na presença de água destilada, obteve-se a tiazolidina-2,4-diona (12) (LIBERMANN; HIMBERT; HENGL, 1948). A reação de N-Alquilação que se iniciou com a preparação de uma solução de hidróxido de potássio (13) (2,4 g - 0,042735 mols). Em seguida a solução foi adicionada gota a gota a uma suspensão de tiazolidina-2,4-diona (5 g - 0,042735 mols) em 10 mL de uma solução MeOH/H₂O 6:4. Em presença de hidróxido de potássio (13) ocorre a formação do sal da tiazolidina-2,4-diona (14), devido à acidez do átomo de hidrogênio em posição 3 do anel. O sal formado promoveu, portanto, um ataque nucleofílico ao cloreto de benzila substituído. Após completa dissolução do sal da tiazolidina-2,4-diona (14), adicionou-se o cloreto de 3-cloro-benzil (15) (5,42 mL - 0,42735 mols). A mistura foi aquecida à temperatura de 70 °C durante 15 horas. Após o período reacional o produto foi levado ao freezer e posteriormente os cristais foram separados. O intermediário 3-(3-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (TA-1) foi purificado através de cristalizações sucessivas.

A reação de tionação se realizou a partir de 3-(3-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (1 g - 0,0038834 mols) (TA-1) com pentassulfeto de fósforo (16) (0,86 g - 0,0038834 mols) em 40 mL de dioxano seco (17), sob uma atmosfera inerte (argônio), e aquecida a uma temperatura de 110 °C durante 8 horas. A mistura reacional foi evaporada a securo, e o 3-(3-cloro-benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona (TAS-1) foi purificado através de lavagens com água destilada quente.

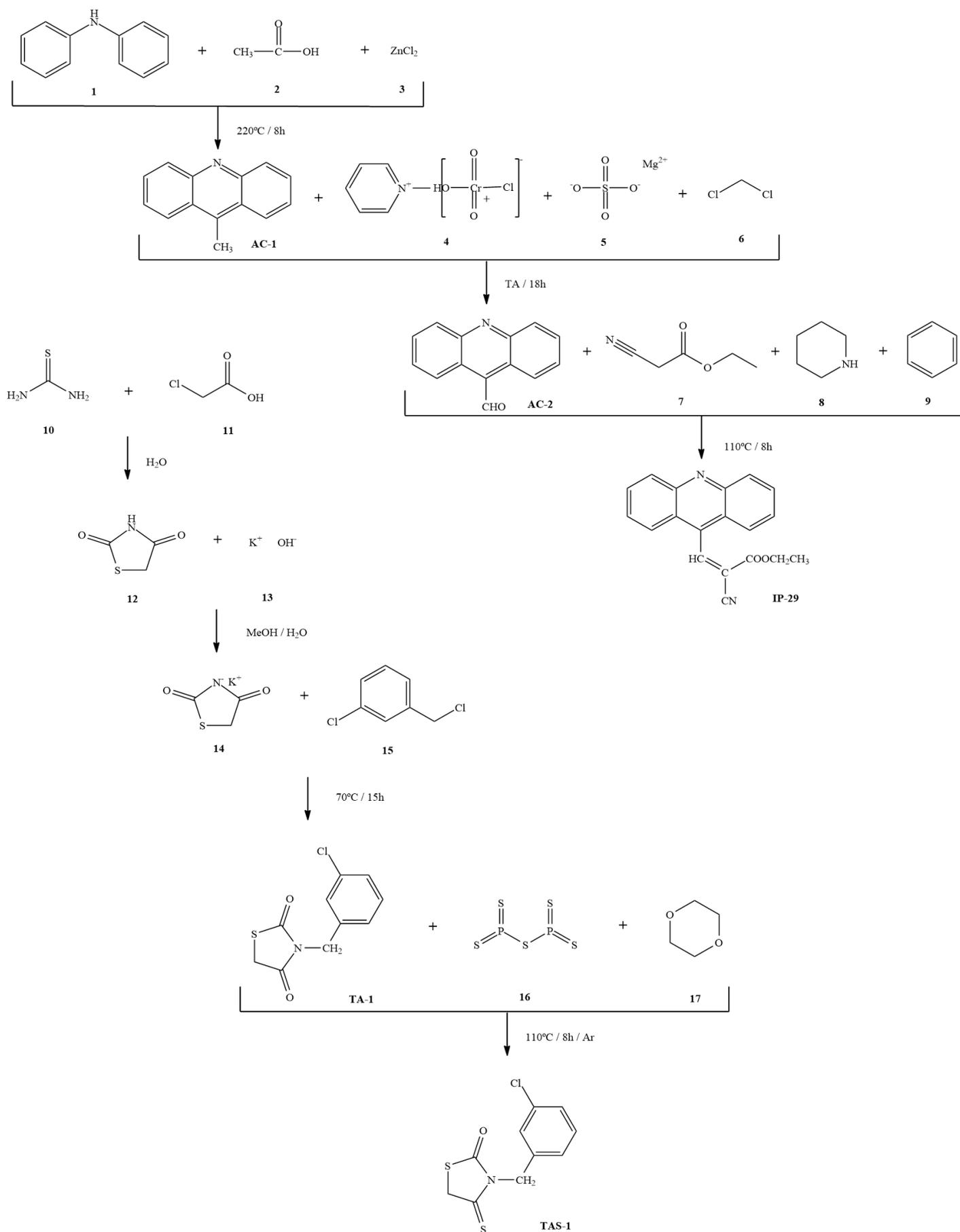


Figura 1: Diagrama de síntese dos intermediários IP-29 e TAS-1

10.1.6. Síntese do 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(3-cloro-benzil)-tiazolidin-2,4-diona (LPSF/AC-34)

Para a obtenção do LPSF/AC-34, em um balão de 250 mL adicionou-se o 3-(3-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (TA-1) (0,2 g - 0,0008281 mols) (A) e o 2-ciano-acridin-9-il-acrilato de etila (IP-29) (B) (0,250g - 0,0008281 mols) dissolvidos em etanol anidro (10 mL) e 6 gotas de piperidina como catalisador a uma temperatura de 60 °C por 2 horas. Observou-se a precipitação dos cristais do 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(3-cloro-benzil)-tiazolidin-2,4-diona (C), que foi filtrado e purificado através de lavagens sucessivas com água destilada (Figura 2) (SILVA, 2003).

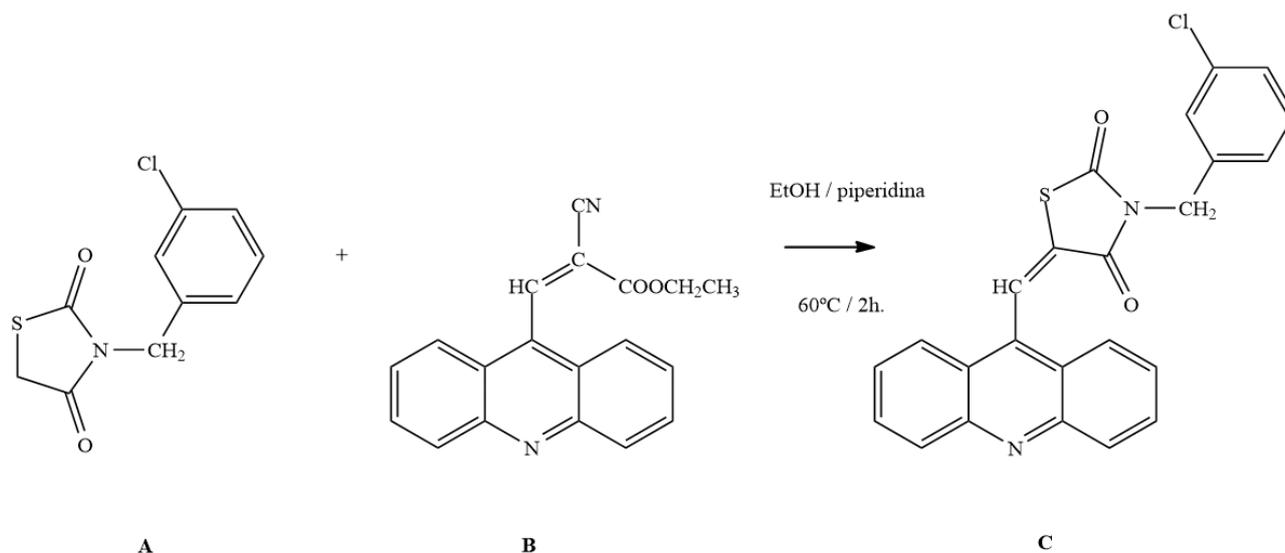


Figura 2: Reação de adição de Michael para obtenção do derivado tiazacridínico LPSF/AC-34

10.1.7. Síntese do 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(3-cloro-benzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona (LPSF/AC-129)

Para a obtenção do LPSF/AC-129, em um balão de 250 mL adicionou-se o 3-(3-cloro-benzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona (TAS-1) (A) (0,15 g - 0,0005825 mols) e o 2-ciano-acridin-9-il-acrilato de etila (IP-29) (B) (0,17 g - 0,0005825 mols) dissolvidos em etanol anidro (8 mL) e 250 µL de piperidina como catalisador a uma temperatura de 80 °C por 4 horas. Observou-se a precipitação dos cristais do 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(3-cloro-benzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona (C), que foi filtrado e purificado através de lavagens sucessivas com água destilada (Figura 3) (MOURA, 2009).

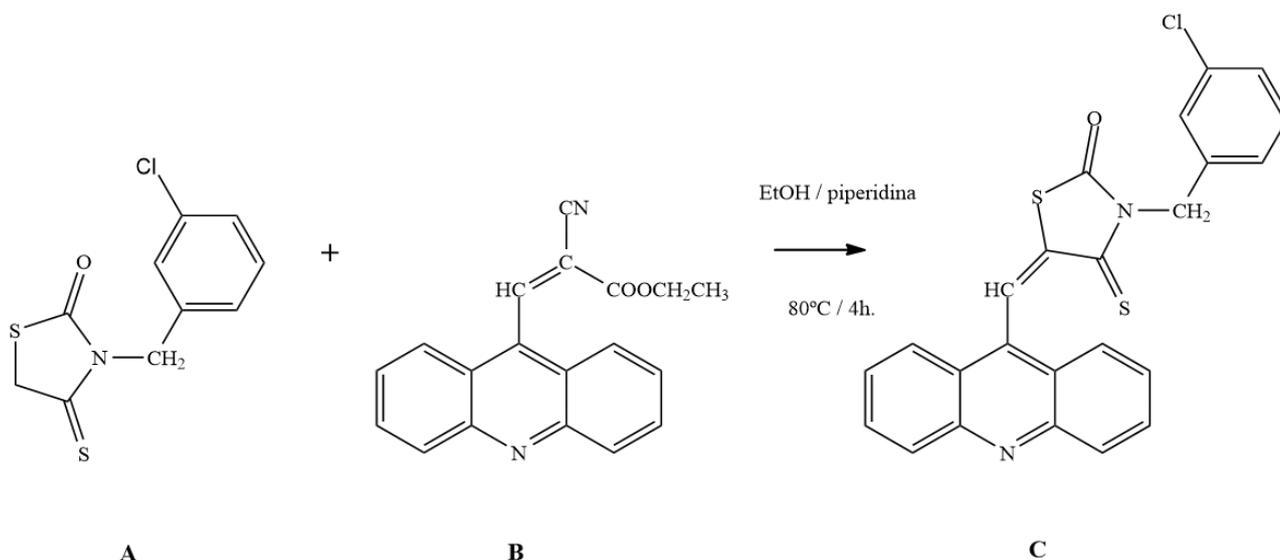


Figura 3: Reação de adição de Michael para obtenção do derivado tiazacridínico LPSF/AC-129

10.1.8. Características físico -químicas

10.1.8.1. Ponto de fusão

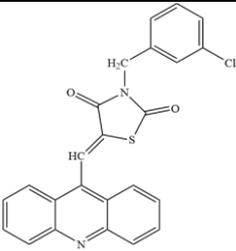
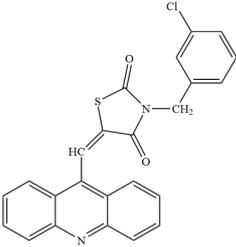
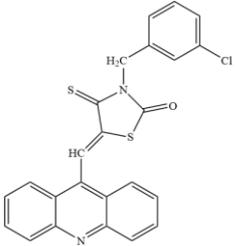
Os pontos de fusão foram determinados em aparelho Quimis Modelo 340.27 (Tabela 1).

10.1.8.2. Cromatografia

As cromatografias analíticas em camada delgada foram efetuadas em placas de sílica gel Merck 60 F254, de 0,25 mm de espessura. As revelações foram feitas por luz ultravioleta (254 ou 366 nm). A cromatografia em coluna sob pressão (flash) foi realizada em sílica gel 60 Merck (230-400 Mesh). Todos os solventes utilizados nos sistemas de eluição possuíam especificação P.A. Todos os dados obtidos estão expressos na tabela 1.

Tabela 1: Características físico-químicas dos derivados tiazacridínicos LPSF/AC-34 e LPSF/AC-

129

COMPOSTO	NOME QUÍMICO	CAS Registry Number	F.M.	M.M.	P.F. (°C)	Rdt (%)	Rf	ELUENTE
	(<i>Z/E</i>) 5-(acridin-9-il)metileno-3-(3-cloro-benzil-tiazolidin-2,4-diona	950986-16-0	$C_{24}H_{15}ClN_2SO_2$	430,5	220-222	65	0,34	Tolueno/AcOEt 7:3
LPSF/AC-34 (<i>Z</i>)								
	(<i>Z</i>)-5-(acridin-9-il)metileno-3-(3-cloro-benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona	950986-20-6	$C_{24}H_{15}ClN_2OS_2$	446,97	171-172	87	0,78	<i>n</i> -hex/AcOEt 7:3
LPSF/AC-34 (<i>E</i>)								
								
LPSF/AC-129 (<i>Z</i>)								

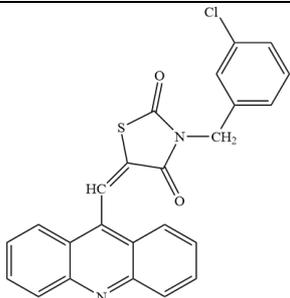
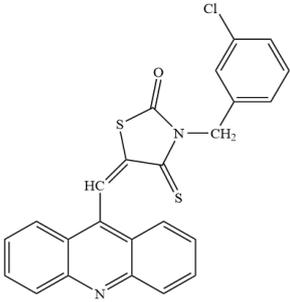
10.1.9. Espectroscopia

A elucidação estrutural do produto descrito foi realizada por:

10.1.9.1. Espectrofotometria de absorção de infravermelho (IV)

Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro FTIR Bruker Modelo IFS 66, em pastilhas de KBr e expressos em cm^{-1} .

Tabela 2: Frequências de absorção no infravermelho, em cm^{-1} , dos derivados tiazacridínicos LPSF/AC-34 e LPSF/AC-129

COMPOSTO	C=O	C=C	C-N	C-S
 LPSF/AC-34	1747 e 1683	1572-1476	1328	756
 LPSF/AC-129	1710	1478-1626		

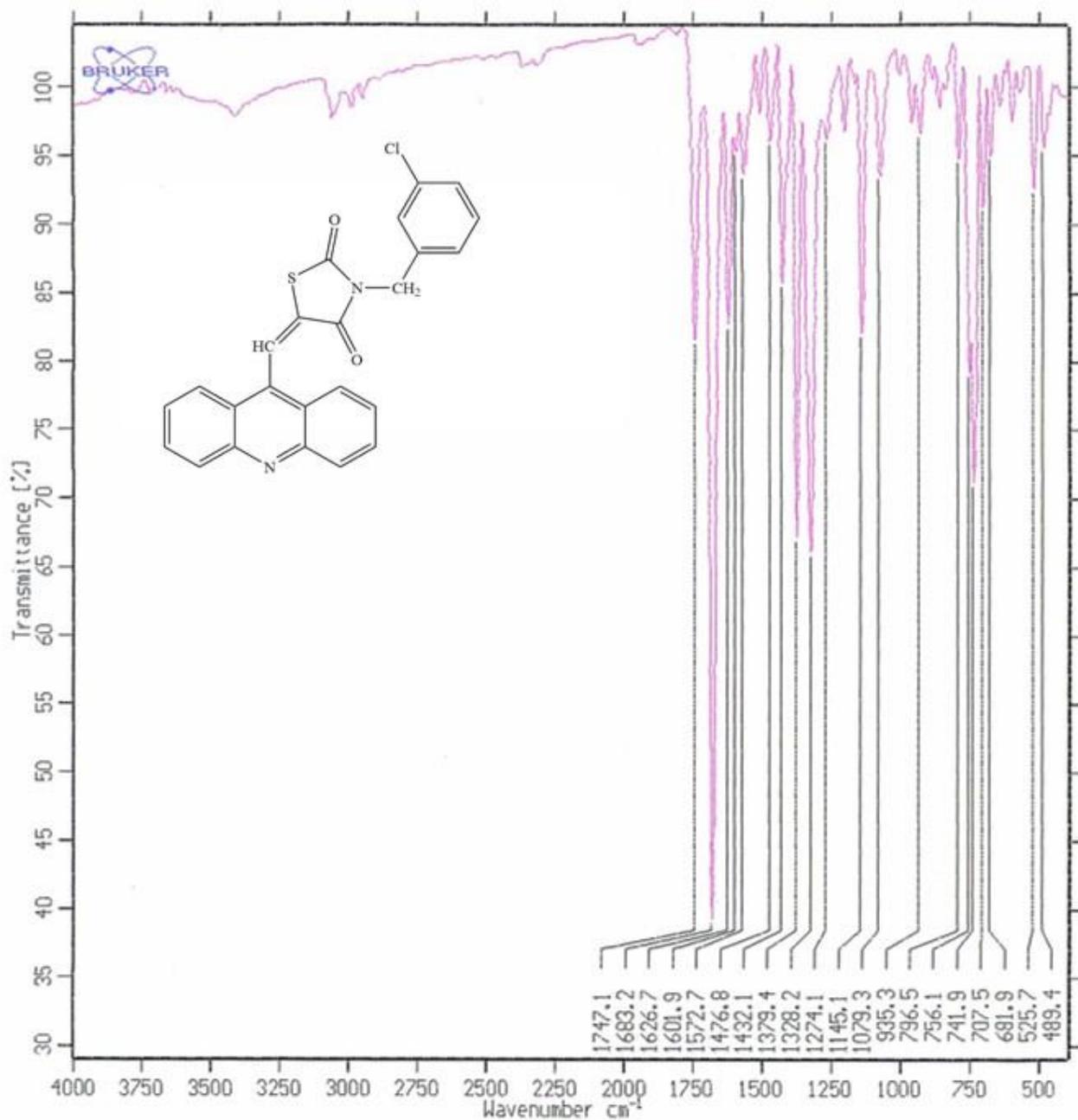


Figura 4: Espectro de infravermelho em cm^{-1} do 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(3-cloro-benzil)-tiazolidin-2,4-diona (LPSF/AC-34) adaptada (SILVA, 2003)

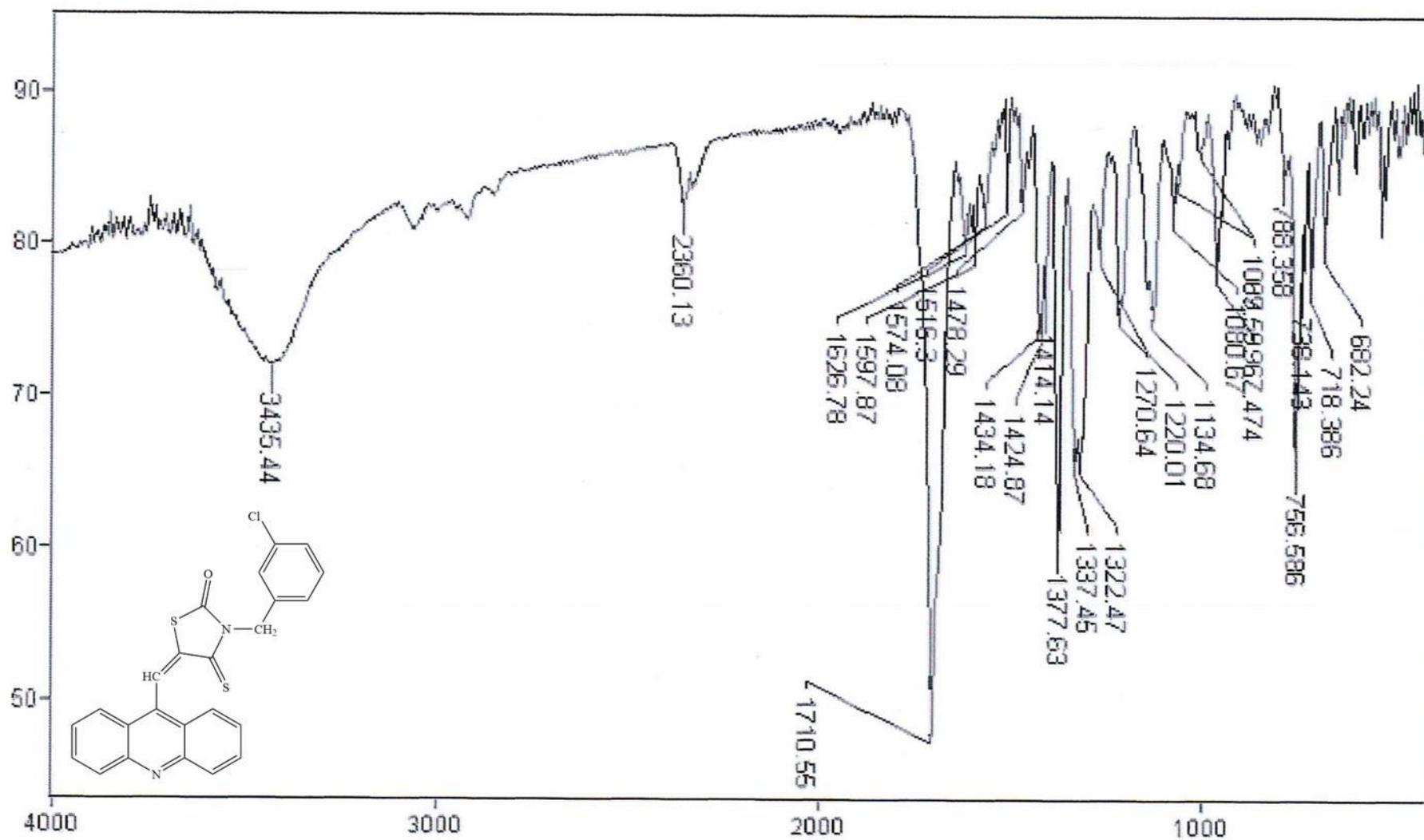
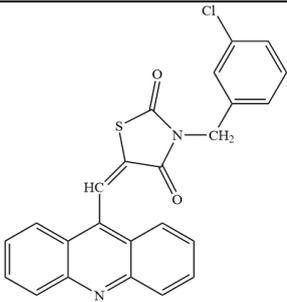
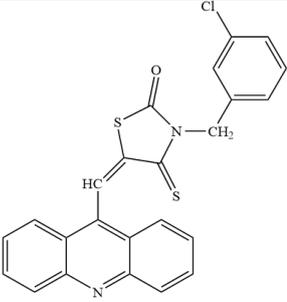


Figura 5: Espectro de infravermelho em cm^{-1} do 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(3-cloro-benzil)-4-tioxo-2-ona (LPSF/AC-129)

10.1.9.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram efetuados em espectrofotômetro em aparelho Varian Modelo Plus 300 MHz. Os espectros de RMN¹H foram realizados utilizando-se como solvente o DMSO-d₆.

Tabela 3: Deslocamentos químicos (δ) em ppm dos derivados tiazacridínicos LPSF/AC-34 (Z/E) e LPSF/AC-129 (Z)

ESTRUTURA	CH	CH ₂	BENZÍLICOS	ACRIDÍNICOS
 <p>LPSF/AC-34 (Z/E)</p>	8,79/8,39 (Z/E, s, 1H)	4,89/4,59 (Z/E, s, 2H) 7,51/7,4	7,51/7,4 (Z/E, s, 1H) 7,4 (Z, m, 3H) 5,23	8,24/8,18 (Z/E, d, 2H) J = 9Hz 8,16/8,13 (Z/E, d, 2H) J=8,7/8,4Hz 7,92/7,86 (Z/E, dt, 2H) J=7,8/7,2Hz 7,70/7,6 (Z/E, dt, 2H) J=7,8Hz
 <p>LPSF/AC-129 (Z)</p>	9,03 (Z, s, 1H)	5,32 (Z, s, 2H)	7,51 (Z, s, 1H) 7,44 – 7,39 (Z, m, 3H)	8,25 (Z, d, 2H) J = 8,69 Hz 8,10 (Z, d, 2H) J = 8,69 Hz 7,95 – 7,90 (Z, m, 2H) 7,73 – 7,68 (Z, m, 2H)

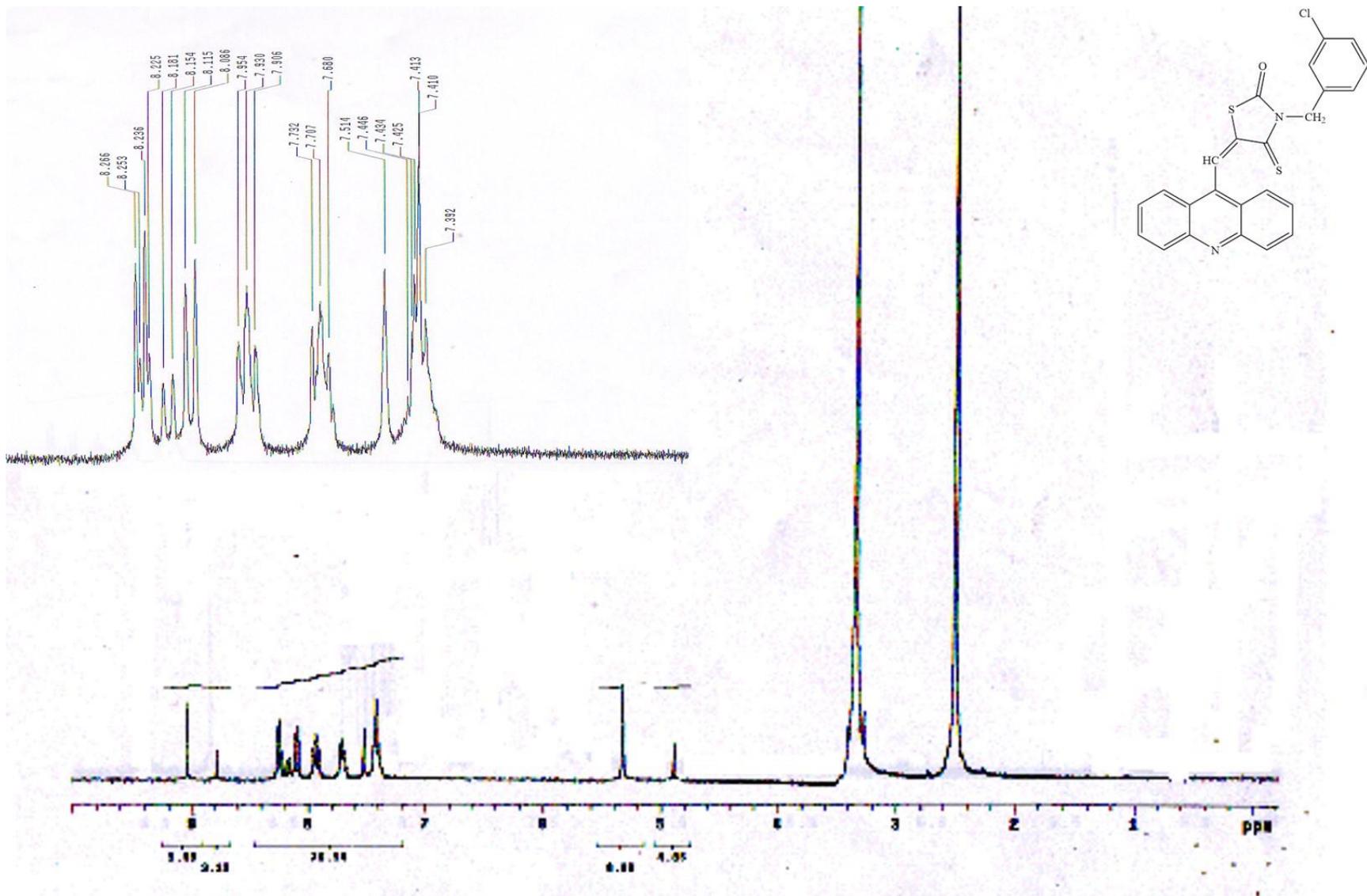


Figura 7: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(3-cloro-benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona (LPSF/AC-129) adaptada (MOURA, 2009)

10.1.9.3. Espectrometria de massas (MS) e avaliação do grau de pureza por HPLC

Os espectros de massas e os graus de pureza da mistura de compostos foram registrados em espectrômetro de massas HCT Ultra (Bruker) / acoplado à cromatografia líquida de alta eficiência LC-20AT (Shimadzu) situados na Central Analítica do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do NUPIT.

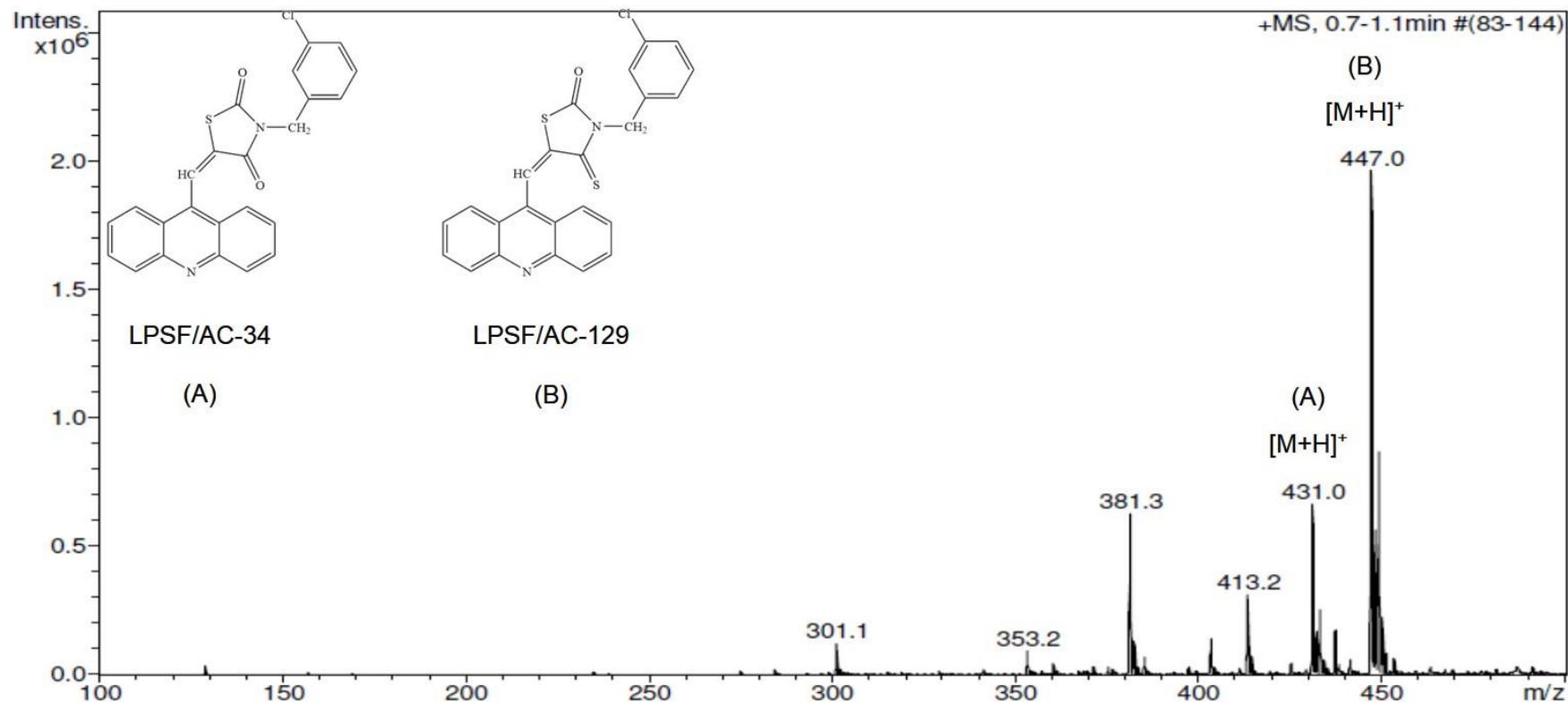


Figura 8: Espectro de massas por IES da mistura de derivados tiazacridínicos (Z/E)-5-(acridin-9-il-metileno)-3-(3-cloro-benzil)-tiazolidin-2,4-diona (LPSF/AC-34) (MM=430) (A) e (Z)-5-(acridin-9-il-metileno)-3-(3-cloro-benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona (LPSF/AC-129) (MM=446) (B)

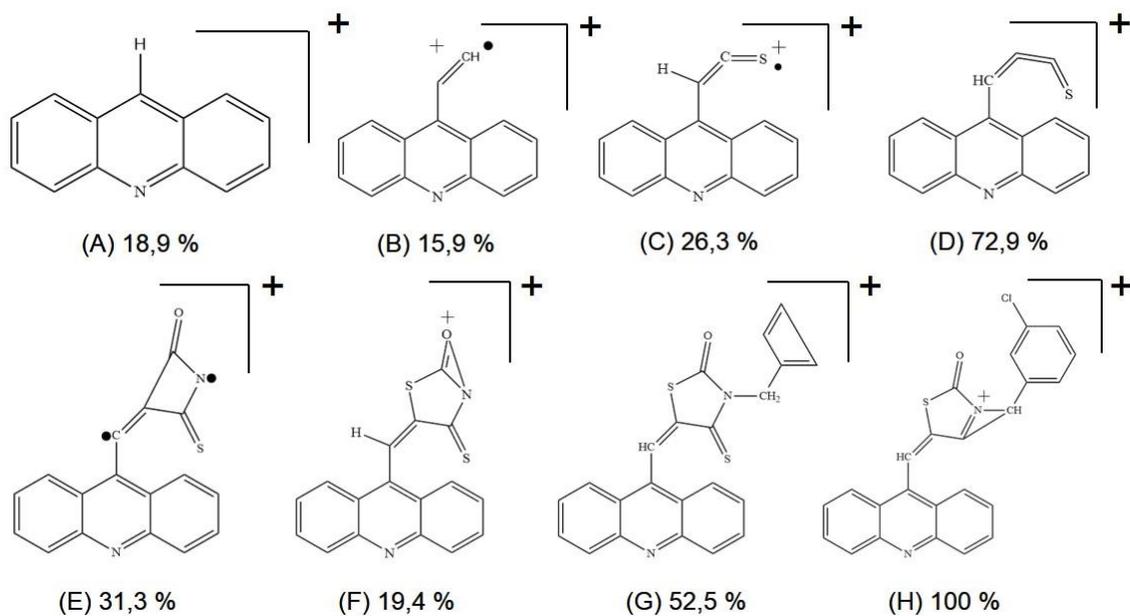
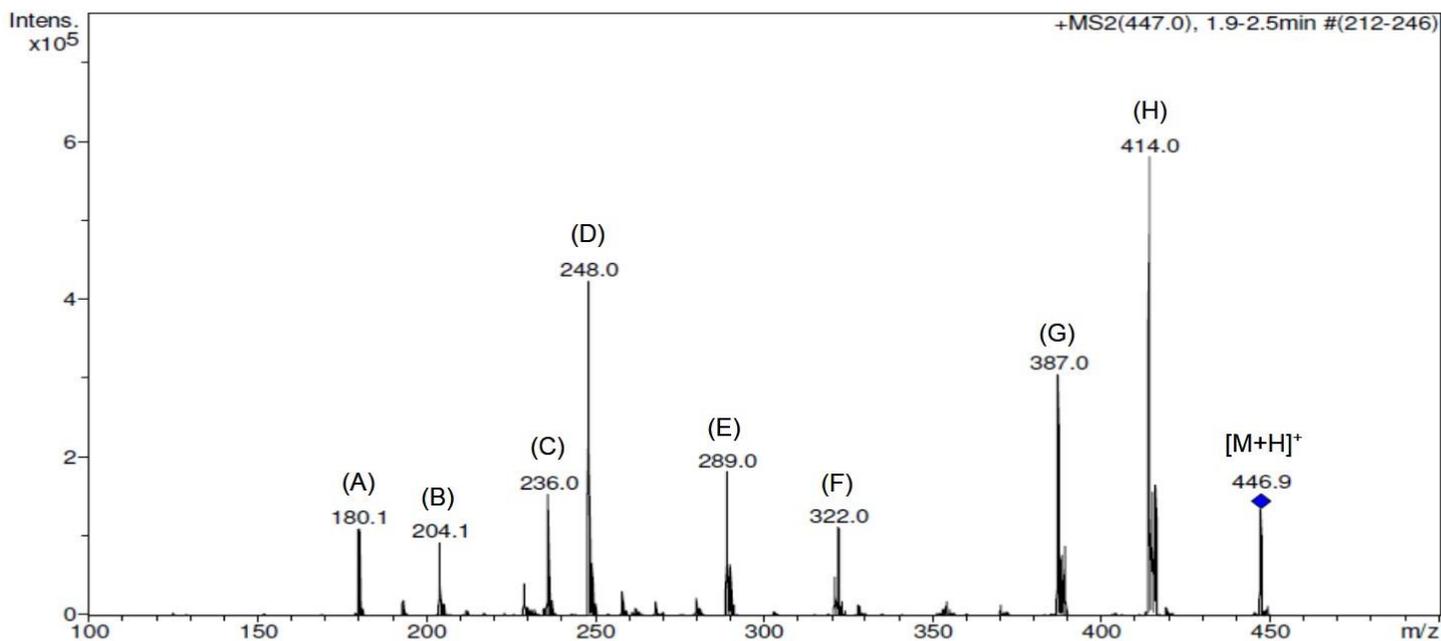
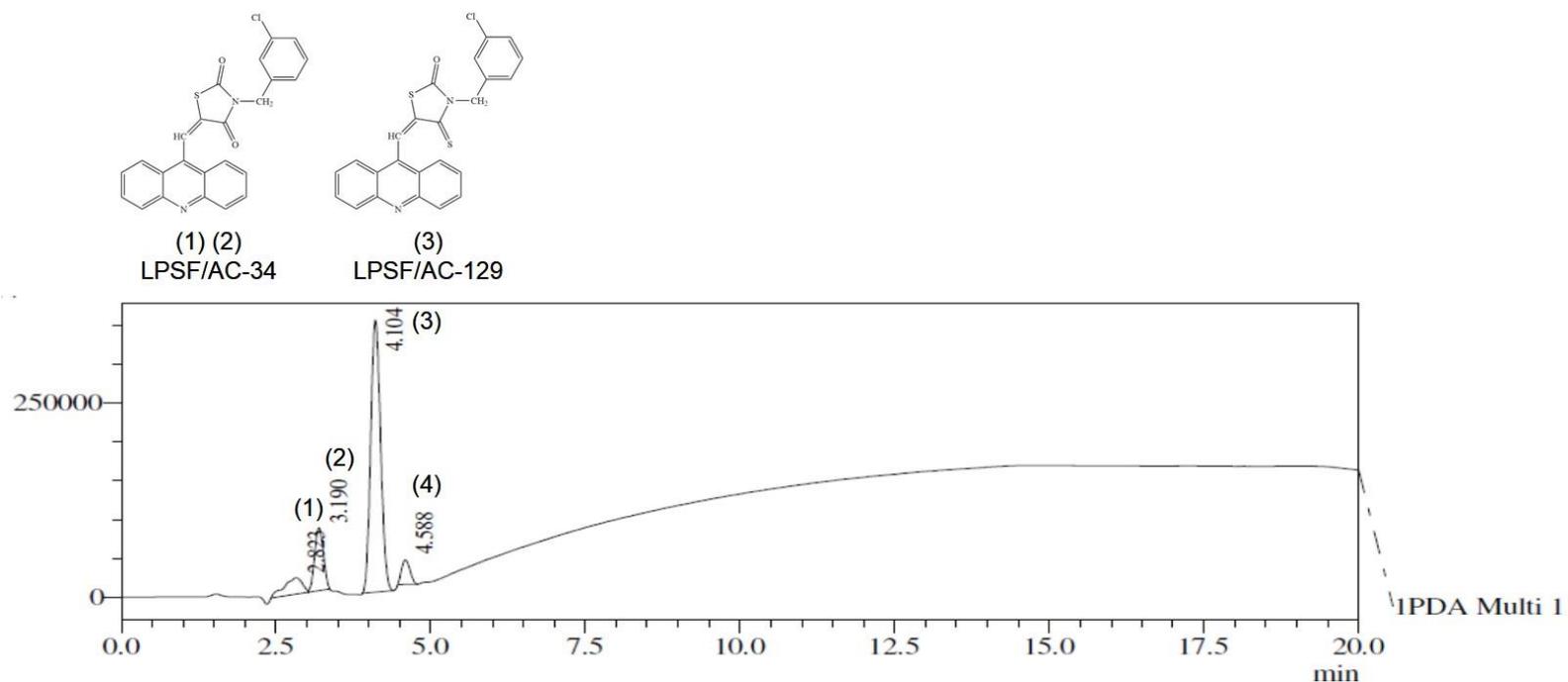


Figura 9: Espectro de massas por IES + MS2 (modo positivo) do derivado tiazacridínico (Z)-5-(acridin-9-il-metileno)-3-(3-cloro-benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona (LPSF/AC-129) (MM=446)



Composto	Pico	Tempo de retenção (min.)	Área	% Área	Fração (%)
LPSF/AC-34 (Z/E)	1	2.823	443946	8.147	4.393 (E)
	2	3.190	803229	14.741	16.742 (Z)
LPSF/AC-129 (Z)	3	4.104	3905644	71.675	72.387
Indeterminado	4	4.588	296290	5.437	6.479

Figura 10: Espectro de LC/MS da mistura de derivados tiazacridínicos LPSF/AC-34 (MM = 430) e LPSF/AC-129 (MM = 446)

10.1.10. Referências Bibliográficas da Parte Química

LIBERMANN, D.; HIMBERT, J.; HENGL, L. La thiazolidione, point de depart d'une synthèse des acides thiopyruviques et thioglyoxyliques substitués. **Bull. Soc. Chim. France**, v. 4, p. 1120–1124, 1948.

MOURA, R. O. DE. **Síntese e avaliação antitumoral in vitro de novos derivados isoquinolínicos, quinazolínicos e piridínicos acridínicos**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2009.

SILVA, T. G. DA. **SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS ACRIDINO-TIAZOLIDÍNICO E ACRIDINO-IMIDAZOLIDÍNICO**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

TSUGE, O. et al. Compounds Related to Acridine. I.* Condensation of Acridine Derivatives Having Active Methyl Group and Aromatic Nitroso Compounds. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 36, n. 11, p. 1477–1485, 1963.