

**AVALIAÇÃO DA POTENCIAL APLICAÇÃO DE DERIVADOS DE 2-ACETILPIRIDINA
N4 FENIL TIOSSEMICARBAZONAS EM TERAPIA E DIAGNÓSTICO ONCOLÓGICO**

Marcella Araugio Soares

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas
– Fisiologia e Farmacologia

2013

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biofísica e Fisiologia
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia

**AVALIAÇÃO DA POTENCIAL APLICAÇÃO DE DERIVADOS DE 2-ACETILPIRIDINA N-4 FENIL
TIOSEMICARBAZONAS EM TERAPIA E DIAGNÓSTICO ONCOLÓGICO**

MARCELLA ARAUGIO SOARES

**Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas –
Fisiologia e Farmacologia**

Orientador: Dr. Jorge Luiz Pesquero

Co-orientadora: Dra. Raquel Gouvêa dos Santos


BELO HORIZONTE

2013

**“AVALIAÇÃO DA POTENCIAL APLICAÇÃO DE DERIVADOS DE 2-
ACETILPIRIDINA N-4 FENIL TIOSSEMICARBAZONAS EM TERAPIA E
DIAGNÓSTICO ONCOLÓGICO”**

MARCELLA ARAUGIO SOARES

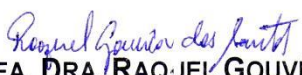
Tese de Doutorado defendida e aprovada no dia 25 de março de 2013, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:


PROF. DR. FÁBIO LUIZ NAVARRO MARQUES
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO


PROFA. DRA. MARIA JOSÉ NEVES
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR


PROFA. DRA. ELAINE MARIA DE SOUZA FAGUNDES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROFA. DRA. VIVIANE SANTUARI PARISOTTO MARINO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROFA. DRA. RAQUEL GOUVÊA DOS SANTOS
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR


PROF. DR. JORGE LUIZ PESQUERO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Belo Horizonte, 25 de março de 2013

DEDICATÓRIA

Ao papai e à mamãe, meus exemplos...

Ao Marcelo, meu grande amor...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas tantas graças concedidas...

À Dra. Raquel Gouvêa dos Santos, por ter plantado a sementinha da ciência em minha vida... Pela oportunidade, confiança e pelos valiosos anos de aprendizado... – Meus sinceros agradecimentos!

Ao Dr. Jorge Luiz Pesquero, pela oportunidade e confiança... Pelas várias vezes que fez com que eu refletisse sobre assuntos que vão muito além da ciência... - Admiro você pelo pesquisador e, ainda mais, pelo ser humano que você é!

À Dra. Priscilla B. Pujatti, minha amiga-irmã! Pela generosidade sem fim... Por ter tornado possível a colaboração com o IPEN... Pela colaboração efetiva e imprescindível no desenvolvimento desse trabalho... Pelas palavras de incentivo nos momentos de desânimo... Pela alegria contagiante... - Não tenho palavras para te agradecer por tudo... Muito obrigada, de coração!

À Dra. Elaine Bortoleti de Araújo, pela generosidade tão rara nesse “mundo da pesquisa”... Pela colaboração em todos os experimentos que envolveram o uso de radioisótopos e camundongos *Nude*.

À MSc. Priscila Rodrigues, pela amizade sincera e pela colaboração no desenvolvimento dos estudos toxicológicos.

À Dra. Heloísa Beraldo pela colaboração e à Dra. Josane Lessa pela atenção, boa vontade e pela síntese das tiossemicarbazonas.

Ao Natanael Gomes, por ser sempre tão prestativo e pela colaboração na realização dos estudos de imagem.

Ao Prof. MSc. Juneo Freitas Silva, pela atenção e boa vontade em realizar as análises histopatológicas.

Aos amigos da Radiobiologia: Paulo, Lu, Dani, Fred, Bárbara, Thaíssa e Estefânia pela convivência tão boa durante todos esses anos... – Vocês estarão sempre na minha memória e no meu coração!

Aos amigos do IPEN: Adriana, Ricardo, Luís Alberto, Renata e, em especial, à Camila pela colaboração nos experimento com camundongos *Nude*.

Aos amigos do INCA: Suely, Malu, Tiago e Terezinha pelo incentivo e pelas várias trocas de escala de trabalho e férias necessárias para a conclusão deste trabalho.

Aos pesquisadores: Dra. Maria José Neves, Dr. Antero Ribeiro, Dra. Juliana Batista, MSc. Marina Bicalho e Dra. Anayive Perez, por disponibilizar equipamentos e reagentes e, também, pela boa vontade em colaborar.

Aos colegas do Lab. de Biofísica: Juliana, Dayse, Mércia, Ivan, Taiane, Eliane e Israel.

Aos professores da pós-graduação: Dra. Adelina M. dos Reis, Dr. Cândido C. Coimbra, Dr. Igor D. G. Duarte, Dra. Maria Aparecida Vieira, Dr. Márcio F. D. Moraes, Dr. André Klein, Dra. Grace S. P. Moraes, Dra. Juliana C. Tavares e Dr. Fabrício A. Moreira.

Às secretárias da pós-graduação, Cynthia, Nilda e Celinha.

À UFMG, CDTN e IPEN pelas instalações.

À CNEN pelo apoio financeiro.

“O trabalho científico não deve ser considerado sob o ponto de vista da sua utilidade direta. Ele deve ser realizado por si só, pela beleza da ciência e, então, sempre existirá a chance da descoberta científica tornar-se algo como o rádio, um benefício”.

Marie Curie

RESUMO

SOARES M.A. - "Avaliação da potencial aplicação de derivados de 2-acetilpiridina N-4 fenil tiossemicarbazonas em terapia e diagnóstico oncológico"

Apesar do grande número de agentes antineoplásicos disponíveis, a resistência de alguns tipos de câncer e a toxicidade para as células normais têm sido apontadas como as principais causas da falha terapêutica e perda de vidas. A falta de diagnóstico precoce e preciso também é responsável pela redução da sobrevida dos pacientes com câncer. Neste contexto, o desenvolvimento de substâncias com baixa toxicidade e com potencial terapêutico e/ou diagnóstico, torna-se a principal ferramenta na tentativa de aumentar a sobrevida dos pacientes e garantir a segurança e eficácia do tratamento. As tiossemicarbazonas (TSC) constituem uma classe de compostos sintéticos que apresentam diversas atividades biológicas, incluindo a atividade antitumoral. Apesar de vários estudos demonstrarem o grande potencial das TSC como agentes terapêuticos e/ou diagnósticos, diferentes modificações químicas realizadas em moléculas pertencentes a essa classe indicam novas possibilidades para aplicações e ainda necessitam de estudos aprofundados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a potencial aplicabilidade de derivados de 2-acetilpiridina N-4 fenil tiossemicarbazonas para terapia e diagnóstico oncológico. Os resultados obtidos demonstraram que todos os 13 derivados de 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas testados foram citotóxicos para linhagens de tumor de mama e glioblastoma apresentando, inclusive, maior atividade antitumoral *in vitro*, que o etoposídeo, um antineoplásico inibidor da enzima topoisomerase II bastante utilizado na clínica médica. As TSC que possuem o halogênio ou nitro na posição orto apresentaram maior atividade antitumoral *in vitro* que seus respectivos isômeros nas posições meta ou para do grupo fenila. Os compostos H2Ac4oFPh e H2Ac4oClPh apresentaram a maior atividade antitumoral, dentre todos os compostos testados, com IC₅₀ na ordem de nanomolar. Essas TSC induziram morte por apoptose nas células tumorais e o estresse oxidativo foi responsável, ao menos em parte, por esse tipo de morte celular. H2Ac4oFPh, administrada por via s.c., na dose 5 mg.kg⁻¹, por 4 dias consecutivos, não induziu toxicidade importante nos animais tratados, no entanto, este mesmo protocolo de tratamento não se mostrou eficaz para redução do crescimento tumoral em modelo animal de tumor cerebral. Sondas radioativas da H2Ac4oFPh foram sintetizadas, utilizando ¹¹¹In e ⁶⁷Ga como radiotraçadores. A H2Ac4oFPh-¹¹¹In apresentou vantagens em relação à H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga como maior atividade específica, maior pureza química, maior estabilidade *in vitro*, maior volume de distribuição, maior clareamento sanguíneo e, portanto, foi considerada mais adequada para aplicação para estudos de imagem molecular. H2Ac4oFPh-¹¹¹In também apresentou natureza lipossolúvel e foi facilmente internalizada pelas células de glioblastoma, *in vitro*. H2Ac4oFPh-¹¹¹In foi captada pelas células de glioblastoma *in vivo*, porém, a alta captação abdominal e a alta radiação de fundo não permitiram uma boa distinção do tumor nos estudos de imagem. Por outro lado, a administração intratumoral permitiu maior difusão e retenção da H2Ac4oFPh-¹¹¹In no sítio tumoral e reduziu significativamente a atividade acumulada nos tecidos não tumorais. Estes dados encorajam

novos experimentos, que devem ser realizados com o intuito de promover a complexação da H₂Ac₄oFPh à emissores de partículas, como o ítrio-90, para avaliar sua aplicação em terapia radioisotópica local de glioblastoma multiforme.

ABSTRACT

SOARES M.A. – “Evaluation of the potential application of 2-acetylpyridine N4- phenyl thiosemicarbazones derivatives for cancer therapy and diagnosis”

Despite the wide range of antineoplastic agents available, resistance of some types of cancer and toxicity to normal cells have been identified as the main causes of treatment failure and death. The lack of early and precise diagnosis is also responsible for reducing survival of cancer patients. In this context, the development of substances with low toxicity and therapeutic potential and/or diagnosis purpose, is the major tool in an attempt to increase the survival of patients and assure the safety and efficacy of treatment. Thiosemicarbazones (TSC) are a class of synthetic compounds that have several biological activities, including antitumor. Although several studies have shown the great potential of TSC as therapeutic and / or diagnostic agents, different chemical modifications performed on this class of molecules indicate new possibilities for applications and still require further studies. The objective of this study was to evaluate the potential applicability of 2-acetylpyridine N-4-phenyl thiosemicarbazones derivatives for cancer therapy and diagnosis. The results showed that all 13 TSC tested were cytotoxic to breast and glioblastoma tumor cell lines, presenting higher *in vitro* antitumor activity than etoposide, an antineoplastic and inhibitor of topoisomerase II frequently used for cancer therapy. The TSC that have halogen or nitro on ortho position showed higher antitumor activity *in vitro* than their isomers with halogen or nitro on meta or para position of the phenyl group. H2Ac4oFPh and H2Ac4oClPh compounds showed the highest antitumor activity among all tested compounds, with IC₅₀ in nanomolar order. These TSC induced cell death by apoptosis and oxidative stress was responsible, at least in part, for this type of cell death. The 5 mg.kg⁻¹ H2Ac4oFPh dose, administered s.c., for 4 consecutive days, did not induce important toxicity; however, the same treatment protocol was not effective for tumor growth reduction in an animal model of brain tumor. Radioactive probes of H2Ac4oFPh were synthesized using ¹¹¹In or ⁶⁷Ga as radiotracers, with satisfactory specific activity and radiochemical purity. H2Ac4oFPh-¹¹¹In was more useful than H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga, with higher specific activity, better chemical purity, better *in vitro* stability, higher distribution volume, faster blood clearance and, therefore, was considered the most promising for application in molecular imaging studies. H2Ac4oFPh-¹¹¹In also showed high lipophilicity and was internalized by glioblastoma cells *in vitro*. H2Ac4oFPh-¹¹¹In showed significative tumor uptake *in vivo*, however, the high abdominal uptake and high background did not allow a good visualization of tumor in imaging studies. Unlike intravenous administration, intratumoral administration allowed greater diffusion and retention of H2Ac4oFPh-¹¹¹In in the tumor site and significantly reduced the activity accumulated in the organs. These results encourage new experiments to be performed in order to promote the complexation of H2Ac4oFPh with particle emitters, such as yttrium-90, to evaluate its application in local radioisotopic therapy for glioblastoma multiforme.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Distribuição proporcional dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil, exceto pele não melanoma. Estimativas para 2012/2013.....	24
FIGURA 2: Desenho esquemático representativo da aquisição das imagens cintilográficas em gama-câmara (A), SPECT (B) e PET (C).....	26
FIGURA 3: Conexão entre apoptose e autofagia..	37
FIGURA 4: Características morfológicas específicas dos diferentes tipos de morte celular..	38
FIGURA 5: Estrutura química genérica das tiossemicarbazonas.	42
FIGURA 6: Estrutura química da triapina.....	43
FIGURA 7: Estimativa das drogas halogenadas aprovadas pelo FDA no período entre 1988 a 2006.....	44
FIGURA 8: Esquema do planejamento experimental na primeira etapa do trabalho.....	49
FIGURA 9: Esquema do planejamento experimental na segunda etapa do trabalho.....	50
FIGURA 10: Estrutura química das tiossemicarbazonas utilizadas nos experimentos.	55
FIGURA 11: Análise da pureza química dos derivados de 2-acetilpiridina N-4 fenil TSC por CLAE (UV-Vis- método A).....	69
FIGURA 12: Efeito citotóxico das diferentes TSC sobre células U-87MG (A), T98-G (B) e MCF-7 (C)..	72
FIGURA 13: Análise morfológica das células U-87MG (A), T98-G (B) e MCF-7 (C) controles e tratadas com TSC.....	76
FIGURA 14: Análise do DNA cromossomal das células U-87MG (A), T98-G (B) e MCF-7 (C) controles e tratadas com TSC.....	79
FIGURA 15: Determinação do tipo de morte induzida pelas TSC em células U-87MG (A), T98-G (B) e MCF-7 (C), utilizando LA/BE.....	83
FIGURA 16: Determinação do tipo de morte induzida pela H2Ac4oFPh em células U-87MG, utilizando anexina V/IP.....	86
FIGURA 17: Geração de espécies reativas de oxigênio em células U-87MG tratadas com H2Ac4oFPh..	88
FIGURA 18: Peroxidação lipídica em células U-87MG tratadas com H2Ac4oFPh.....	88
FIGURA 19: Variação de massa de animais <i>Swiss</i> sadios tratados com H2Ac4oFPh.....	89
FIGURA 20: Efeito antitumoral da H2Ac4oFPh em modelo animal de tumor cerebral..	90

FIGURA 21: Massa tumoral dos animais controle e tratados com H2Ac4oFPh (protocolo 1).	91
FIGURA 22: Efeito antitumoral da H2Ac4oFPh em modelo animal de tumor cerebral..	92
FIGURA 23: Massa tumoral dos animais controle e tratados com H2Ac4oFPh (protocolo 2).	92
FIGURA 24: Fotomicrografias histológicas representativas do coração, pulmões, fígado, rim e baço, após coloração com hematoxilina/eosina, dos animais controle e tratados com H2Ac4oFPh..	94
FIGURA 25: Fotomicrografias histológicas representativas da massa tumoral dos animais controle e tratados com H2Ac4oFPh, após coloração com hematoxilina/eosina..	95
FIGURA 26: Perfis de CLAE (UV-Vis; método B) representativos da H2Ac4Ph e H2Ac4oFPh..	96
FIGURA 27: Perfil de CLAE (radioativo; método B) representativo da H2Ac4Ph e H2Ac4oFPh radiomarcadas com ¹¹¹ In e ⁶⁷ Ga..	99
FIGURA 28: Curva de clareamento sanguíneo da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In (A) e da H2Ac4oFPh- ⁶⁷ Ga (B) em camundongos <i>Swiss</i> .	101
FIGURA 29: Biodistribuição da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In (A) e da H2Ac4oFPh- ⁶⁷ Ga (B) em camundongos <i>Swiss</i> sadios..	103
FIGURA 30: Estudos cintilográficos da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In em camundongos <i>Swiss</i> sadios. ...	104
FIGURA 31: Estudos cintilográficos da H2Ac4oFPh- ⁶⁷ Ga em camundongos <i>Swiss</i> sadios. ...	105
FIGURA 32: Estudos cintilográficos da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In em modelo animal de tumor cerebral.....	106
FIGURA 33: Estudos cintilográficos da H2Ac4oFPh- ⁶⁷ Ga em modelo animal de tumor cerebral.....	106
FIGURA 34: Quantificação da captação tumoral da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In e H2Ac4oFPh- ⁶⁷ Ga 1 e 3 horas após a administração <i>i.v.</i> (1,85 MBq).....	107
FIGURA 35: Biodistribuição da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In, em modelo animal de tumor cerebral, 1 e 3 horas após administração <i>i.v.</i> (1,85 MBq).....	108
FIGURA 36: Biodistribuição da H2Ac4oFPh- ⁶⁷ Ga, em modelo animal de tumor cerebral, 1 e 3 horas após administração <i>i.v.</i> (1,85 MBq).....	108
FIGURA 37: Perfil de internalização total e não específica (NE) em função do tempo de incubação com H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In.....	111
FIGURA 38: Quantificação da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In ligada às proteínas plasmáticas ou livre no plasma.	112
FIGURA 39: Análise comparativa das imagens cintilográficas obtidas 1, 3 e 24h após	

administração <i>i.v</i> de H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In ou ¹¹¹ InCl3 (1,85 MBq) em animais Swiss sadios.....	114
FIGURA 40: Estudos cintilográficos da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In em modelo animal de tumor cerebral, 24 e 48 horas após administração <i>i.v</i> . (1,85 MBq).....	115
FIGURA 42: Biodistribuição da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In, em modelo animal de tumor cerebral, 24 e 48 horas após administração <i>i.v</i> . (1,85 MBq).....	117
FIGURA 43: Estudos cintilográficos da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In em modelo animal de tumor cerebral, 3, 24 e 48 horas após administração <i>i.t</i> . (1,85 MBq)..	118
FIGURA 44: Quantificação da captação tumoral da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In 3, 24 e 48 horas após a administração <i>i.t</i>	119
FIGURA 45: Biodistribuição da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In, em modelo animal de tumor cerebral, 3, 24 e 48 horas após administração <i>i.t</i> . (1,85 MBq).	120

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Radioisótopos emissores gama e de pósitrons mais comumente utilizados em Medicina Nuclear, no Brasil (Saha, 2010).	27
TABELA 2: Linhagens de células tumorais utilizadas nos experimentos	53
TABELA 3: Tiossemicarbazonas utilizadas nos experimentos.....	54
TABELA 4: Análise comparativa do efeito citotóxico das diferentes TSC. IC ₅₀ sobre células U-87MG, T98-G e MCF-7 e avaliação da atividade hemolítica.	71
TABELA 5: Análise comparativa da pureza radioquímica, determinada por CLAE (método B), das TSC marcadas com ¹¹¹ In e ⁶⁷ Ga em temperatura ambiente ou a 90°C.....	97
TABELA 6: Estabilidade, determinada por CLAE (método B), das TSC radiomarcadas após armazenamento por 24h, sob 2 - 8°C.	100
TABELA 7: Parâmetros farmacocinéticos para H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In e H2Ac4oFPh- ⁶⁷ Ga determinados em camundongos Swiss sadios.....	102
TABELA 8: Razão da atividade acumulada no tumor/órgão não alvo da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In e H2Ac4oFPh- ⁶⁷ Ga, 1 e 3 horas após a administração <i>i.v.</i>	109
TABELA 9: Coeficiente de partição (log P) (n-octanol : salina) experimental da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In.....	110
TABELA 10: Análise em CLAE (método B) da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In livre após diferentes tempos de incubação em soro humano (% do total adicionado).	112
TABELA 11: Razão da atividade acumulada no tumor/órgão não alvo da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In, 24 e 48 horas após administração <i>i.v.</i>	117
TABELA 12: Razão da atividade acumulada no tumor/órgão não alvo da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In, 3, 24 e 48 horas após administração <i>i.t.</i>	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% AI	Porcentagem de atividade injetada
% AI.g⁻¹	Porcentagem de atividade injetada por grama de tecido
μCi	Micro curie
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μmol	Micromol
3-AP	Triapina
¹¹¹In	Isótopo radioativo de índio com número de massa 111
¹²³I	Isótopo radioativo de iodo com número de massa 123
¹⁸F	Isótopo radioativo de flúor com número de massa 18
⁶⁴Cu	Isótopo radioativo de cobre com número de massa 64
⁶⁷Ga	Isótopo radioativo de gálio com número de massa 67
⁶⁸Ga	Isótopo radioativo de gálio com número de massa 68
⁹⁰Y	Isótopo radioativo de ítrio com número de massa 90
^{99m}Tc	Isótopo radioativo de tecnécio metaestável com número de massa 99
⁶⁶Zn	Isótopo radioativo de zinco com número de massa 66
⁶⁸Zn	Isótopo radioativo de zinco com número de massa 68
AI	Atividade injetada
LA	Laranja de acridina
Apaf-1	Fator de ativação da apoptose
ATSM	Diacetil bis(N4-metil tiossemicarbazona)
ATCC	American Type Cell Collection
ATG	Genes relacionados à autofagia
ATP	Adenosina trifosfato
ASC	Área sob a curva
BCG	Bacilo Calmete-Guérin – cepa da vacina antituberculose
Bq	Bequerel
CH₃CN	Acetonitrila
DP	Depuração
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência

CT	“Computed tomography”: Tomografia computadorizada
Ci	Curie
d	Dêuterons
DAPI	Diidrocloreto de 4, 6- diamidino- 2- fenindole
DCF	Diclorofluoreceína
DCFH-DA	2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato
DFF	Fator de fragmentação de DNA
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Àcido desoxirribonucleico
Dp44mT	di-2 piridilcetona-4,4 dimetil-3 tiossemicarbazona
EB	Brometo de etídio
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
EDTMP	Ácido etileno-amino-tetrametileno fosfônico
EQ	Equação
FasL	Ligante Fas
FasR	Receptor Fas
FDA	Food and Drug Administration
FDG	Fluordesoxiglicose
FIG	Figura
GBM	Glioblastoma multiforme
GC	Gama-câmara planar
g	Grama
GSH	Glutathiona
GSSH	Glutathiona oxidada
h	Horas
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HNE	4 hidroxil-2-nonenal
IC₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
INCA	Instituto Nacional do Câncer

IP	Iodeto de propídeo
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
i.t.	Intratumoral
i.v.	Intravenosa
kg	Kilograma
L	Litros
Log	Logarítmo
LP	ligada às proteínas séricas
M	Molar
MM	Massa molecular
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mmol	Milimol (10^{-3} mol)
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-tetrazolium
n	Nêutrons
N	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
NCI	Instituto Nacional de Câncer Norte Americano
ND	Não determinado
NE	Não específica
nmol	nanomol (10^{-9} mol)
NRC	National Research Council
O	Oxigênio
O₂^{•-}	Ânion superóxido
OH[•]	Radical hidroxil
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Prótons
p.a.	Pós administração
PARP	Polimerase poli ADP-ribose

PBS	Tampão fosfato-salina
PET	“Positron emission tomography”: Tomografia por emissão de pósitrons
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K III	Beclina-1 e fosfatidilinositol 3- cinase classe III
PL	Peroxidação de lipídios
PQ	Pureza química
PTSM	Piruvaldeído bis(N4-metil tiossemicarbazona)
FS	Fosfatidilserina
p/v	Concentração expressa em percentual peso por volume
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RR	Ribonucleotídeo redutase
S	Enxofre
REA	Relação estrutura-atividade
s.c.	Subcutânea
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
SPECT	“Single-photon emission computed tomography”: Tomografia por emissão de fóton único
t_{1/2}	Meia vida
t_{1/2}α	Meia-vida da fase rápida ou de distribuição
t_{1/2}β	Meia-vida da fase lenta ou de eliminação
TAB	Tabela
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico
TBq.mmol⁻¹	Tera Becquerel por milimol
TCA	Ácido tricloroacético
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TNFR1	Receptor de fator de necrose tumoral tipo 1
TR	Tempo de retenção
TSC	Tiossemicarbazonas
T98-G	Linhagem celular de glioblastoma multiforme humano – P53 mutante

UV	Ultra violeta
U-87MG	Linhagem celular de glioblastoma multiforme humano – P53 selvagem
v/v	Concentração expressa em percentual volume por volume
Vd	Volume de distribuição
α	Constante de distribuição
β	Constante de eliminação
ρ	Coefficiente de partição

SUMÁRIO

1. Revisão bibliográfica.....	23
1.1 Câncer: conceitos e dados epidemiológicos.....	23
1.2 Diagnóstico oncológico: aplicações da medicina nuclear	24
1.2.1 Considerações sobre o desenvolvimento de radiofármacos	27
1.2.1.1 Gálio-67 e Índio-111	29
1.3 Terapia oncológica.....	29
1.4 Tipos de morte celular	33
1.5 Estresse oxidativo e morte celular	38
1.6 Considerações gerais sobre a pesquisa de novos fármacos.....	40
1.7 Tiossemicarbazonas.....	41
2. Justificativa	46
3. Objetivos.....	47
3.1 Geral	47
3.2 Específicos	47
4. Materiais e métodos	48
4.1 Planejamento experimental	48
4.2 Cultivo celular	53
4.3 Tiossemicarbazonas.....	54
4.4 Animais	55
4.5 Avaliação do efeito citotóxico	56
4.6 Análise das alterações morfológicas por microscopia óptica	57
4.7 Análise das alterações morfológicas no DNA cromossomal	57
4.8 Determinação do tipo de morte induzida	57
4.9 Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio	58

4.10	Avaliação da peroxidação lipídica	58
4.11	Tratamento <i>in vivo</i>	59
4.12	Síntese de sonda radioativa da H2Ac4oFPh	60
4.13	Determinação da pureza radioquímica dos compostos radiomarcados.....	61
4.14	Análise da estabilidade dos compostos radiomarcados.....	61
4.15	Avaliação da biodistribuição da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In e H2Ac4oFPh- ⁶⁷ Ga	62
4.16	Avaliação da farmacocinética da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In e H2Ac4oFPh- ⁶⁷ Ga.....	62
4.17	Estudos cintilográficos da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In e H2Ac4oFPh- ⁶⁷ Ga.....	63
4.18	Caracterização adicional da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In	64
4.18.1	Determinação do coeficiente de partição.....	64
4.18.2	Determinação do comportamento em soro humano <i>in vitro</i>	64
4.18.3	Estudo de internalização <i>in vitro</i>	65
4.19	Análise dos dados.....	65
5.	Resultados	66
5.1	Tiossemicarbazonas.....	66
5.2	Avaliação do efeito citotóxico	70
5.3	Análise das alterações morfológicas por microscopia óptica	75
5.4	Análise das alterações morfológicas no DNA cromossomal	75
5.5	Determinação do tipo de morte induzida	81
5.6	Seleção da TSC mais potente.....	87
5.7	Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio	87
5.8	Avaliação da peroxidação lipídica.....	88
5.9	Tratamento <i>in vivo</i>	89
5.10	Síntese de sonda radioativa da H2Ac4oFPh	95
5.11	Determinação da pureza radioquímica dos compostos radiomarcados.....	95
5.12	Análise da estabilidade dos compostos radiomarcados.....	100

5.13	Avaliação da farmacocinética da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In e H2Ac4oFPh- ⁶⁷ Ga.....	100
5.14	Avaliação da biodistribuição da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In e H2Ac4oFPh- ⁶⁷ Ga em camundongos <i>Swiss sadios</i>	102
5.15	Estudos cintilográficos da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In e H2Ac4oFPh- ⁶⁷ Ga em camundongos <i>Swiss sadios</i>	103
5.16	Avaliação da interação <i>in vivo</i> da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In e H2Ac4oFPh- ⁶⁷ Ga com o sítio tumoral: Estudos cintilográficos em modelo animal de tumor cerebral	105
5.17	Caracterização adicional da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In	109
5.17.1	Determinação experimental do coeficiente de partição	110
5.17.2	Estudo de internalização <i>in vitro</i>	110
5.17.3	Determinação do comportamento em soro humano <i>in vitro</i>	111
5.17.4	Estudo cintilográfico da H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In e ¹¹¹ InCl ₃ em camundongos <i>Swiss sadios</i> : Análise comparativa	112
5.17.5	Estudos cintilográficos em modelo animal de tumor cerebral, 24 e 48 horas após a administração intravenosa (i.v).	115
5.17.6	Estudos cintilográficos em modelo animal de tumor cerebral, após administração por via intratumoral	117
6.	Discussão	122
7.	Conclusões.....	133
8.	Perspectivas futuras	135
	Referências bibliográficas.....	136
	Anexo.....	156

1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 CÂNCER: CONCEITOS E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Câncer é a designação de um grupo de doenças caracterizadas pela perda do controle da divisão celular e pela capacidade de invasão de estruturas do organismo (INCA, 2012). Acredita-se que uma célula normal se transforma em uma célula cancerosa em decorrência às mutações em seu DNA, que podem ser herdadas ou adquiridas (Rang et al., 2012). Essas mutações promovem alterações bioquímicas, morfológicas e funcionais variadas que conferem às células cancerosas propriedades importantes para o seu desenvolvimento (Filho et al., 2009). De maneira geral, as células cancerosas apresentam, em graus variáveis, características que as distinguem das células normais como: proliferação descontrolada, desdiferenciação, perda de função, poder de invasão e propriedades metastáticas (Rang et al., 2012).


Além dos fatores genéticos (ABTA, 2006), vários fatores químicos, físicos e biológicos aumentam a propensão individual ao câncer, entre os quais estão inclusos: fumo, hábitos alimentares, excesso de peso, consumo de álcool e a exposição às várias formas de radiação (ACS, 2012). Alguns tipos de vírus também são importantes desencadeadores do processo de carcinogênese. O papilomavírus, por exemplo, tem sido identificado em vários tipos de carcinoma de colo uterino (zur Hausen, 2001).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam o câncer como a primeira causa de morte nos países economicamente desenvolvidos e a segunda causa de morte nos países em desenvolvimento, subsequente, apenas, às doenças do sistema cardiovascular. A

incidência do câncer vem crescendo nos países em desenvolvimento como resultado do aumento da urbanização, da industrialização e da maior expectativa de vida da população que favorece não só a maior produção dos agentes carcinógenos ambientais, mas também, a maior e mais prolongada exposição dos seres humanos a esses agentes. Estima-se que, em 2030, ocorrerão 27 milhões de casos incidentes de câncer e 17 milhões de mortes por câncer, no mundo (WHO, 2012).

No Brasil, as estimativas para 2012 e 2013 apontam a ocorrência de aproximadamente 520 mil casos novos de câncer. Os tipos com maior incidência serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon, reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon, reto e glândula tireóide para o sexo feminino (FIG. 1) (INCA, 2012).

Os cânceres cerebrais constituem apenas 1-2% dos tumores em adultos, no entanto, são de difícil prognóstico e a sobrevivência dos pacientes geralmente é muito baixa. Dentre os diferentes tipos de tumores cerebrais o glioblastoma multiforme (GBM) é o mais freqüente e agressivo (Ohka et al., 2012) e, em geral, os pacientes com esse tipo de câncer morrem em até dois anos após o diagnóstico (UWhealth, 2012).

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%	Homens		Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

FIGURA 1: Distribuição proporcional dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil, exceto pele não melanoma. Estimativas para 2012/2013 (INCA, 2012).

1.2 DIAGNÓSTICO ONCOLÓGICO: APLICAÇÕES DA MEDICINA NUCLEAR

O diagnóstico precoce do câncer promove, em geral, tratamento bem sucedido e

pode ser feito por meio de análises bioquímicas do sangue, estudos cito e anatomopatológicos, imuno-histoquímica e imagem (INCA, 2012).

As técnicas de imagem permitem monitoramento da doença em tempo real e acessibilidade sem a destruição do tecido. Além disso, elas desempenham papel importante na predição, diagnóstico, estadiamento, planejamento terapêutico, avaliação da eficácia terapêutica e da recorrência do câncer (Fass, 2008). Métodos de imagem como a tomografia computadorizada (CT), a imagem por ressonância magnética (IRM) e o ultrassom permitem caracterizar alterações anatômicas decorrentes da doença (Oliveira et al., 2006). A imagem na Medicina Nuclear é realizada por meio de gama-câmaras planas (GC), tomografia por emissão de fóton único (SPECT) e tomografia por emissão de pósitron (PET) (FIG. 2), as quais permitem a caracterização funcional e metabólica dos tecidos, complementando os dados anatômicos e, desta forma, auxiliando no diagnóstico e, principalmente, no estadiamento e otimização do tratamento dos pacientes com câncer (Tinois, 2005).

As GC permitem a obtenção de imagem bidimensional da distribuição da radioatividade no organismo. Por este motivo, elas possuem menor sensibilidade e pequenas lesões podem não ser detectadas. As GC são utilizadas para detecção de radiação gama (γ), uma vez que os detectores empregados em sua instrumentação requerem emissão gama abundante com energia entre 100 e 300 keV (Kowalsky et al., 2004).

A SPECT permite a aquisição de imagem tridimensional e, assim como a gama-câmara, é utilizada para detecção de radiação gama (γ). A imagem tridimensional é obtida graças à presença de uma, duas ou três cabeças, contendo os detectores de radiação, que giram $180^\circ - 360^\circ$ ao redor do paciente, para aquisição de imagens. A sensibilidade deste equipamento aumenta proporcionalmente ao número de cabeças de detecção (Kowalsky et al., 2004).

A PET é um tipo de tomografia que detecta radiação gama proveniente da aniquilação de pósitrons. Quando os pósitrons se combinam com elétrons negativos, eles se aniquilam dando origem a dois fótons de 511 keV na mesma direção, porém, em sentidos opostos (Thrall et al., 2003). A detecção simultânea dos dois fótons emitidos, por meio de um sistema de coincidência acoplado aos detectores, permite a localização da posição em que os dois fótons foram originados, promovendo maior eficiência de quantificação da radiação nos órgãos (Jurisson et al., 2008). Por este motivo, a imagem PET apresenta maior resolução quando comparada à imagem SPECT (Kowalsky et al., 2004).

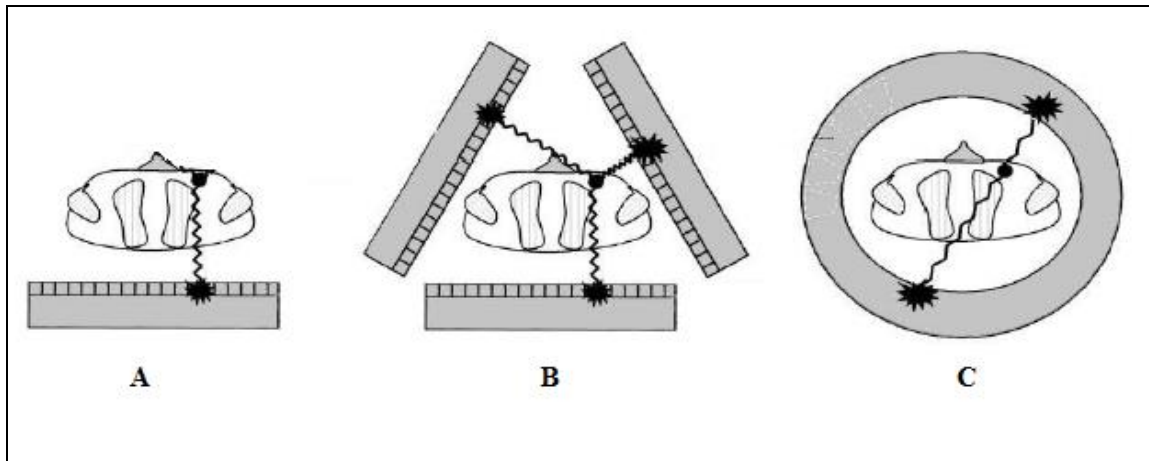


FIGURA 2: Desenho esquemático representativo da aquisição das imagens cintilográficas em gama-câmara (A), SPECT (B) e PET (C).

A TAB. 1 apresenta os emissores gama e de pósitrons mais comumente utilizados para diagnóstico oncológico em Medicina Nuclear no Brasil, bem como suas energias e meia-vida ($T_{1/2}$) física.

A base da utilidade diagnóstica da Medicina Nuclear está na distribuição e captação seletiva de traçadores, denominados radiofármacos (Josephs et al., 2009). A maioria dos radiofármacos é uma combinação de um isótopo radioativo, que pode ser detectado externamente, e de um componente químico não radioativo, que é responsável pela sua distribuição no organismo e fixação no órgão alvo (Thrall et al., 2003).

Os principais radiofármacos disponíveis atualmente no Brasil, para diagnóstico oncológico, são: citrato de gálio-67, para linfoma; iodeto de sódio (iodo-123), para tumores tireoidianos; metileno difosfonato marcado com tecnécio-99 metaestável, para metástases ósseas; sestamibi marcado com tecnécio-99m, para tumores de mama; octreotídeo marcado com índio-111, para tumores neuroendócrinos e metaiodobenzilguanidina marcada com iodo-123 para neuroblastoma (IPEN, 2012). Além dos radiofármacos para SPECT citados, existem também, dois radiofármacos para PET oncológico disponíveis para comercialização no Brasil: o fluoreto de sódio (flúor-18), para metástase óssea e a fluordesoxiglicose (FDG - flúor-18), indicada para linfoma, carcinoma de pulmão, melanoma maligno e carcinoma de cólon (IPEN, 2012). Dentre todos os radiofármacos citados, apenas o octreotídeo marcado com índio-111 e a metaiodobenzilguanidina marcada com iodo-123 são tumores-específicos; os demais são tecido-específicos e permitem, apenas, diferenciar zonas hiper- ou hipocaptantes.

TABELA 1: Radioisótopos emissores gama e de pósitrons mais comumente utilizados em Medicina Nuclear, no Brasil (Saha, 2010).

Radioisótopo	Energia do fóton * ou		Meia-vida	Aplicação
	Energia máxima do pósitron ** (abundância %)			
⁶⁷ Ga	93 (40), 184 (24), 300 (22) e 393 (7) keV *		78,3 h	GC/SPECT
¹¹¹ In	171 (89) e 245 (94) keV *		67,2 h	GC/SPECT
¹²³ I	159 keV *		13,2 h	GC/SPECT
^{99m} Tc	140 keV *		6,0 h	GC/SPECT
¹⁸ F	635 keV **		110 min	PET
⁶⁸ Ga	1900 keV **		68 min	PET

1.2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE RADIOFÁRMACOS

O desenvolvimento de radiofármacos adequados para diagnóstico em Medicina Nuclear está relacionado com a correta seleção de seus dois componentes básicos: o componente químico não radioativo e o radioisótopo.

É importante que o componente químico apresente biodistribuição adequada para atingir o objetivo e propriedades químicas favoráveis à ligação ao componente radioativo. Quanto ao radioisótopo, é importante que seja um emissor gama ou de pósitron, para radiofármacos SPECT e PET, respectivamente, com energia e abundância adequadas para a detecção externa. Deve ter pouca ou nenhuma emissão de partículas α ou β^- e sua meia-vida deve ser longa o suficiente para o propósito (Thrall et al., 2003).

Os radiofármacos ideais não devem sofrer dissociação *in vitro* ou *in vivo*, devem ser de fácil radiomarcagem e de custo razoável (Thrall et al., 2003). Além disso, devem apresentar qualidade química, radioquímica, radionuclídica e biológica, satisfatórias. A farmacocinética deve ser favorável de forma que a meia-vida biológica não seja muito mais longa que o tempo necessário para completar o estudo e as imagens obtidas devem apresentar elevada razão alvo-não alvo (Saha, 2010).

Alguns fatores devem ser considerados para o desenvolvimento de radiofármacos:

- Compatibilidade: é necessário conhecer as propriedades químicas do radioisótopo e da molécula a ser marcada avaliando se há compatibilidade entre eles;
- Estequiometria: é importante determinar a quantidade de cada componente a ser utilizada na reação de radiomarcção, de forma a obter boa eficiência de marcação;
- Carga da molécula: é importante conhecer a carga do radiofármaco uma vez que ela pode interferir na sua solubilidade; quanto mais polar for a molécula, maior será a sua solubilidade em solventes aquosos. Moléculas apolares tendem a apresentar maior solubilidade em solventes orgânicos;
- Tamanho da molécula: o tamanho de um radiofármaco é um determinante importante na sua absorção no organismo. Moléculas grandes ($MM > 60.000$) não são filtradas pelos glomérulos no rim;
- Ligação às proteínas plasmáticas: a ligação às proteínas plasmáticas afeta a biodistribuição, a depuração plasmática e a absorção do radiofármaco no órgão de interesse. Portanto, deve-se determinar a extensão da ligação de qualquer novo radiofármaco às proteínas antes da sua utilização clínica;
- Solubilidade: quanto maior a lipossolubilidade de um radiofármaco, maior a difusão através da membrana celular e, portanto, maior é a sua localização nos órgãos. No entanto, o radiofármaco a ser injetado no paciente deve estar em solução aquosa com pH compatível ao do sangue;
- Biodistribuição: é extremamente importante realizar estudos de biodistribuição de um novo radiofármaco. Estes estudos permitem prever sua eficácia e utilidade (Saha, 2010).

1.2.1.1 GÁLIO-67 E ÍNDIO-111

Os radiometais gálio-67 (^{67}Ga) e o índio-111 (^{111}In) são radioisótopos produzidos em ciclotron e emitem radiação gama por meio do decaimento por captura eletrônica (Thrall et al., 2003).

O ^{67}Ga pode ser produzido por várias reações nucleares tais como $^{66}\text{Zn} (d, n) ^{67}\text{Ga}$ e $^{68}\text{Zn} (p, 2n) ^{67}\text{Ga}$, onde o alvo de zinco natural ou enriquecido é irradiado com dêuterons de 8 MeV ou prótons de 20 MeV, respectivamente. Após a irradiação, o alvo é dissolvido em ácido clorídrico (HCl) e o ^{67}Ga é extraído em éter isopropílico. A fase orgânica é, então, evaporada e o resíduo é retomado em HCl para fornecimento de ^{67}Ga na forma de cloreto

(Saha, 2010). O ^{67}Ga possui meia-vida de 78 horas e seus fótons gama principais possuem energias de 93 (40%), 184 (24%), 300 (22%) e 393 (7%) keV (Mettler et al., 2006).

O ^{111}In é, em geral, produzido pela reação $^{111}\text{Cd} (p, n) ^{111}\text{In}$ na qual o alvo de cádmio é irradiado com prótons de 15 MeV. Após a irradiação, o alvo é dissolvido em HCl e purificado em resina de troca iônica para o fornecimento do ^{111}In na forma de cloreto (Saha, 2010). O ^{111}In possui meia-vida física de 67 horas, e seus fótons gama principais possuem energias de 171 (89%) e 245 (94%) keV (Mettler et al., 2006).

O ^{67}Ga e o ^{111}In possuem estado de oxidação +3 e apresentam química de coordenação semelhante. No entanto, existem algumas pequenas diferenças de eletronegatividade e raio iônico. Estes dois metais possuem, também, química semelhante à do ferro e, essa similaridade é importante no desenvolvimento de radiofármacos já que o ferro é um elemento essencial no corpo humano. Várias proteínas de ligação ao ferro, como a transferrina, que existem para transportar o ferro *in vivo*, transportam também os radiometais. Como resultado, átomos de ferro sempre competem com esses radiometais pela ligação específica às proteínas transportadoras (Vallabhajosula, 2009).

A solubilidade do ^{67}Ga e do ^{111}In é bastante limitada em pH fisiológico, portanto, atividades específicas altas são necessárias para mantê-los solúveis em meio aquoso. Uma prática comum é mantê-los em soluções contendo agentes quelantes, como citrato, acetato ou tartarato, para prevenir a precipitação em pH neutro (Saha, 2010).

A química de coordenação dos radiometais determina a geometria e estabilidade do complexo radiometal - quelante, que é a molécula que contém átomos doadores de elétrons como N, O e S, capazes de fazer ligações covalentes coordenadas com os radiometais. Tanto o ^{67}Ga quanto o ^{111}In são classificados como ácidos fortes e, portanto, reagem preferencialmente com bases fortes. Ambos formam complexos com coordenação 4, 5 e 6, sendo que os de coordenação 6 são os mais estáveis (Vallabhajosula, 2009).

1.3 TERAPIA ONCOLÓGICA

Nos últimos anos significativo progresso foi observado na Oncologia e no desenvolvimento de novas formas de terapia oncológica. No entanto, devido à crescente incidência do câncer, o manejo clínico dessa doença continua sendo um desafio no século 21

(Baskar et al., 2012).

As modalidades de terapia oncológica incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e hormonioterapia (Baskar et al., 2012). A escolha do tratamento ideal depende, principalmente, do tipo e estágio de desenvolvimento do tumor e do estado de saúde do paciente (Rang et al., 2012).

A cirurgia possui caráter curativo ou paliativo. O tratamento curativo é praticado nos casos iniciais da maioria dos tumores sólidos e promove a remoção do tumor primário com margem de segurança e, se necessário, a remoção da cadeia linfonodal próxima ao órgão de localização do tumor primário. O tratamento cirúrgico paliativo tem como objetivo reduzir o tamanho do tumor ou controlar sintomas que põem em risco a vida do paciente ou comprometem a sua qualidade de vida. Entre os tratamentos de caráter paliativo incluem a descompressão de estruturas vitais, o controle de hemorragias, a desobstrução de vias aéreas, digestivas e urinárias e o controle da dor (INCA, 2012). A extensão de uma ressecção é limitada pelos riscos de morbidade e mortalidade do paciente (Colli et al., 2001).

A radioterapia utiliza radiação ionizante para destruir as células tumorais. Esse tipo de radiação, ao interagir com os tecidos, é capaz de ionizar átomos e moléculas promovendo uma série de danos biológicos que culminam em morte celular. Aproximadamente 50% de todos os pacientes com câncer são submetidos à radioterapia (Begg et al., 2011), que contribui para 40% do tratamento curativo do câncer (Barnett et al., 2009). O progresso no campo da radioterapia é impulsionado, principalmente, pelos avanços das técnicas de imagem, pelos sistemas computadorizados de planejamento do tratamento, pelo desenvolvimento tecnológico dos equipamentos utilizados para este propósito e, também, pela melhor compreensão dos efeitos biológicos das radiações ionizantes (Bernier et al., 2004). Assim como o tratamento cirúrgico, a radioterapia pode ser prescrita com a intenção de cura ou palição e, frequentemente, é utilizada em combinação com as outras modalidades de tratamento. Quando utilizada previamente à cirurgia a radioterapia tem como objetivo reduzir o tumor e, quando utilizada após a cirurgia, tem como objetivo destruir as células tumorais microscópicas que não foram removidas (Baskar et al., 2012).

A radioterapia pode ser realizada aplicando a radiação externamente ao corpo do paciente, por meio da técnica de teleterapia, ou inserindo a fonte radioativa selada no interior do organismo, por meio da técnica de braquiterapia. Na teleterapia, a fonte de radiação fica a cerca de 1 metro de distância do paciente, pela qual são emitidos raios gama

(Cobalto-60 ou Césio-137) ou raios X de megavoltagem. Para tratamento de lesões superficiais é comum utilizar, também, elétrons provenientes de aceleradores lineares. Na braquiterapia fontes de emissores β^- ou γ encapsuladas são inseridas a poucos centímetros da massa tumoral (SBRT, 2006).

As radiações ionizantes também são empregadas para a terapia de câncer por meio do uso de radiofármacos emissores de partículas. Estes são administrados por via endovenosa ou aplicados em terapia local, dependendo do propósito. Assim como a radioterapia, a terapia com radiofármacos tem função curativa ou paliativa. Alguns exemplos de radiofármacos disponíveis no Brasil para terapia oncológica são: iodeto de sódio (iodo-131), para tumores tireoidianos; octreotato marcado com lutécio-177, para tumores neuroendócrinos; metaiodobenzilguanidina marcada com iodo-131, para neuroblastoma; ácido etileno-amino-tetrametileno fosfônico (EDTMP) marcado com samário-153, para tratamento paliativo de metástases ósseas e o lipiodol marcado com iodo-131, para hepatocarcinoma (IPEN, 2012).

O tratamento com radiação ionizante promove alguns efeitos tóxicos que variam principalmente de acordo com a localização do tumor, a energia utilizada, o volume do tecido irradiado, a dose total de irradiação e o estado geral de saúde do paciente. As reações comuns e que independem do local de aplicação são a fadiga, reações de pele e a inapetência (Hendry et al., 2006).

A quimioterapia antineoplásica consiste no uso de substâncias químicas para o tratamento de diversos tipos de cânceres (ACS, 2012). A aplicação dos agentes quimioterápicos pode ser regional, onde o agente é aplicado diretamente em uma artéria ou cavidade, atingindo altas concentrações regionais; local, onde a droga é injetada diretamente no local do tumor e, sistêmica que é o método mais utilizado e tem como objetivo tratar o organismo como um todo (McKnight, 2003).

A quimioterapia pode ser realizada com intenção curativa ou paliativa e, também, pode ser utilizada como adjuvante ou neoadjuvante às outras formas de terapia (INCA, 2012). A classificação dos quimioterápicos antineoplásicos é feita, em geral, baseada na estrutura química e função da droga ou de acordo com a sua atuação no ciclo celular. Em relação à estrutura química e função, eles podem ser:

- Alquilantes: possuem grupos alquil capazes de formar ligações covalentes com componentes celulares importantes como o DNA, RNA e proteínas (ex: nitrosouréias e

derivados de platina);

- Antimetabólitos: análogos estruturais dos metabólitos que ocorrem naturalmente envolvidos na síntese de DNA e RNA. Exercem sua atividade citotóxica por competição com os metabólitos naturais e, promovem a fragmentação do DNA e RNA ou inibem a sua síntese (ex: análogos do folato, análogos de purina, análogos de adenosina, análogos de pirimidina e derivados da uréia);

- Derivados de produtos naturais: fármacos que tiveram como protótipo produtos de origem natural, como componentes de plantas, fungos ou bactérias. Em geral inibem a mitose e a síntese de DNA (ex: antibióticos antitumorais, antraciclinas, alcalóides da vinca, taxanos, derivados de epidófilo-toxina e da camptotecina) (Page et al., 2008).

Em relação à atuação no ciclo celular, os agentes quimioterápicos podem ser: ciclo-específicos, eficazes em tumores de crescimento rápido, uma vez que atuam em células que estão no ciclo de divisão celular (neste caso podem ser também específicos ou não para cada fase do ciclo celular); ou ciclo inespecíficos, que possuem eficácia independente da célula estar em divisão ou em repouso (INCA, 2012).

Os agentes quimioterápicos atuam, em geral, indiscriminadamente em células cancerosas e em células normais de proliferação rápida, como naquelas presentes em mucosas e no sistema hematopoiético. Por este motivo, a quimioterapia tende a produzir, em maior ou menor grau, os seguintes efeitos tóxicos gerais: supressão da medula óssea, cicatrização ineficiente, alopecia, lesão do epitélio gastrointestinal, redução do crescimento em crianças, esterilidade e teratogenicidade (Workman et al., 2002).

A imunoterapia, conhecida também como terapia biológica ou bioterapia, é um tipo de tratamento que consiste em estimular o sistema imunológico do paciente a combater doenças como o câncer (ACS, 2012). Este tratamento pode ser realizado de duas maneiras distintas: ativa, por meio da utilização de substâncias que estimulam a função imunológica (ex: BCG, interleucina-2, levamisole, isoprinosina) ou por meio da utilização de vacinas obtidas de culturas de células tumorais do próprio paciente ou de paciente com neoplasia semelhante; e passiva por meio da administração de anticorpos antitumorais (INCA, 2012). Os crescentes estudos na área e a identificação de novos antígenos tumorais têm gerado bastante interesse no que se refere à imunoterapia. No entanto apesar de ter sido, inicialmente, defendida como uma terapia mais específica para câncer quando comparada às terapias convencionais, torna-se cada vez mais claro que muitas imunoterapias podem

produzir reações imunológicas em tecidos normais. A imunotoxicidade resultante pode variar de condições relativamente pequenas, tais como a despigmentação da pele, a toxicidades graves em órgãos essenciais como o fígado, pulmão e intestino (Amos et al., 2011).

A hormonioterapia é utilizada isolada ou em combinação com as outras formas de terapia, em pacientes que possuem neoplasia hormônio-sensível, como alguns tipos de cânceres de mama, próstata e endométrio. Este tipo de terapia, que tem finalidade curativa ou paliativa, consiste na administração de fármacos que irão reduzir a produção natural de hormônio estimulante do crescimento tumoral ou que irão competir pelo sítio de ligação hormonal. Alguns exemplos de hormonioterapia medicamentosa são: estrogênio e similares sintéticos, para câncer de próstata avançado; antiestrogênio, para carcinoma de mama; progestágenos e similares sintéticos, para adenocarcinoma de endométrio e antiandrogênios, para câncer de próstata. Além da hormonioterapia medicamentosa, a supressão hormonal também pode ser obtida por excisão cirúrgica da glândula produtora do hormônio. Devido à atuação sistêmica, a hormonioterapia pode promover diversos efeitos colaterais indesejáveis (INCA, 2012).

1.4 TIPOS DE MORTE CELULAR

A morte celular desempenha papel importante na manutenção da homeostase do organismo e pode ser classificada de acordo com seus aspectos morfológicos e funcionais (Gourlay et al., 2006). Os principais tipos de morte celular são: necrose, apoptose, autofagia e catástrofe mitótica (de Bruin et al., 2008). No entanto, existem também outros tipos de morte específicos para alguns tipos celulares e menos típicos como a cornificação, paraptose, piroptose, pironecrose e entose (Kroemer et al., 2009).

A necrose é um tipo de morte caracterizada, morfológicamente, pela perda da integridade da membrana celular, com conseqüente extravasamento de componentes intracelulares, e geração de resposta inflamatória (de Bruin et al., 2008). Dados recentes demonstraram o controle programado da execução desse tipo de morte que passou, então, a ser denominada necroptose (Ocker et al., 2012). A necroptose é, geralmente, induzida por estímulos externos, por meio da ativação de receptores de morte, em condições nas quais a

execução da morte apoptótica é impedida como, por exemplo, na presença de inibidores de caspases. Embora ocorra em condições reguladas, a necroptose apresenta as mesmas características morfológicas da morte necrótica não programada (Miao et al., 2009).

A apoptose é considerada um tipo clássico de morte celular programada. Ela possui características morfológicas específicas como: retração e redução de volume citoplasmático, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, formação de *blebs* (pequenas projeções em forma de bolhas) na membrana plasmática e formação de corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos, gerados durante a apoptose *in vivo*, são fagocitados por macrófagos a partir de um sinal exposto na superfície da membrana: a fosfatidilserina, que é externalizada durante esse processo de morte. A cascata apoptótica pode ser iniciada por meio de duas vias principais que envolvem a liberação de citocromo c da mitocôndria (via mitocondrial), ou a ativação de receptores de morte, em resposta a um ligante (via receptor de morte) (Elmore, 2007).

Na apoptose por via mitocondrial, sinais de estresse intracelulares, tais como retirada de fator de crescimento, danos no DNA e estresse oxidativo promovem a ativação de proteínas pró-apoptóticas, como Bax, e inibição de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2, o que leva à permeabilização da membrana mitocondrial e consequente liberação de citocromo c. Após liberação no citoplasma, o citocromo c se liga ao fator de ativação da apoptose (Apaf-1) e a pró-caspase 9 formando o complexo apoptossoma. Este ativa a caspase 9 que, então, ativa caspase 3 (Certo et al., 2006). As caspases são cisteinil proteínases que, em resposta a estímulos pró-apoptóticos, hidrolisam os substratos após um resíduo de aspartato e levam a célula à morte. Alguns dos substratos das caspases são: proteínas regulatórias do citoesqueleto, moléculas que mantêm estoques de ATP (PARP – Polimerase poli ADP-ribose), fator de fragmentação de DNA (DFF) e lâminas nucleares (Strasser et al., 2000).

Na apoptose por via receptor de morte, os sinais de dano celular são recebidos por receptores transmembrana, como o receptor Fas (FasR) e o receptor de fator de necrose tumoral (TNFR1). Quando os ligantes extracelulares, tais como os ligantes FasL e TNF α , se ligam aos seus respectivos receptores, proteínas adaptadoras são recrutadas ativando a pró-caspase 8. Esta pró-caspase é, então, clivada originando a caspase 8, que ativa a caspase 3 que, por sua vez, inicia o processo de morte celular (Fleischer et al., 2006).

A indução da apoptose é uma boa estratégia para o combate de células cancerosas (Hsu et al., 2004). No entanto, alguns tipos de cânceres possuem mutações que promovem a resistência à apoptose, como a mutação no gene supressor tumoral P53, que codifica a proteína p53. Uma vez que a proteína p53 pode promover apoptose por meio da ativação da transcrição de proteínas pró-apoptóticas, a presença da p53 não funcional pode estar diretamente relacionada à falha na indução da apoptose, após o estresse celular (Vousden et al., 2007). Além disso, alterações nas vias de receptores de morte podem, também, desempenhar papel importante na resistência à apoptose. Um exemplo é o fato da expressão do receptor Fas ser elevada em mucosa de cólon normal, mas reduzida ou mesmo perdida em carcinomas de cólon (Moller et al., 1994). A resistência à apoptose influencia diretamente na resposta das células tumorais à terapia, porém, ela é mais comumente observada em tumores de origem hematopoiética que em tumores sólidos (Brown et al., 2005). A radioterapia e o tratamento com quimioterápicos convencionais, como doxorrubicina, derivados da platina e 5-fluorouracil, demonstraram induzir a apoptose em tumores sólidos (Dewey et al., 1995; Wang et al., 2004; Chater et al., 2007; Garcia et al., 2011).

A autofagia é definida como um processo no qual proteínas e organelas celulares são degradadas por proteinases lisossomais, no interior de vesículas fundidas aos lisossomos denominadas autofagolisossomos. A formação dos autofagolisossomos é uma das principais características da autofagia (de Bruin et al., 2008). A autofagia foi originalmente descrita como uma resposta fisiológica celular à privação de nutrientes, sendo assim, é importante considerar que ela pode iniciar como uma resposta adaptativa com o intuito de aumentar a sobrevivência; no entanto, após certo limiar, ela resulta em morte celular (Klionsky et al., 2000). Alguns trabalhos demonstram que, assim como a apoptose, a autofagia também é induzida em células tumorais sob estresse gerado pela radiação ionizante e por agentes quimioterápicos (Ito et al., 2005; Ravikumar et al., 2006).

Bioquimicamente, a autofagia é executada sem a ativação de caspases. A formação dos vacúolos autofágicos envolve vários membros da família de genes relacionados à autofagia (ATG), a proteína Beclina-1 e fosfatidilinositol 3- cinase classe III (PI3K III). Estes recrutam a proteína LC3 que, por sua vez, atua na formação do autofagossomo. O autofagossomo, finalmente, funde-se ao lisossomo formando o autofagolisossomo onde o

ambiente ácido e as enzimas lisossomais promovem a digestão dos componentes celulares (He et al., 2009).

A autofagia pode ser regulada, positiva- ou negativamente, por vias de sinalização específicas. A proteína Bcl-2 e PI3K/Akt/mTOR atuam inibindo a autofagia, já a proteína p53 atua estimulando esse tipo de morte (Feng et al., 2005; Pattingre et al., 2005; Maiuri et al., 2007).

Tanto a apoptose quanto a autofagia possuem características distintas, porém, alguns trabalhos recentes demonstram que esses dois processos estão intimamente ligados por componentes comuns de suas vias de sinalização e, em alguns casos, podem ser regulados simultaneamente. A interação apoptose-autofagia pode se manifestar de várias maneiras, dependendo do contexto celular e estímulo. A autofagia pode preceder a apoptose, pode antagonizar ou retardar a apoptose promovendo sobrevivência celular, ou os dois processos podem ocorrer mutuamente promovendo a morte (FIG. 3) (Gozuacik et al., 2004).

Alguns autores sugerem que as mitocôndrias estão envolvidas na integração da morte celular por apoptose e autofagia. De acordo com o modelo proposto por Lemasters e colaboradores (1998), a autofagia pode bloquear a apoptose, prevenindo a liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais para o citoplasma, por meio da eliminação das mitocôndrias danificadas. O sinal transmitido a partir de mitocôndrias danificadas para estimular a autofagia pode envolver mTOR, já que fração desta proteína foi encontrada recentemente associada à membrana mitocondrial externa (Desai et al., 2002). Além disso, a autofagia induzida por dano mitocondrial pode ocorrer especialmente sob condições em que a apoptose via mitocondrial não é dominante ou é bloqueada por inibidores de caspases. Exemplos disso são dados experimentais demonstrando que quando neurônios são expostos a concentrações altas de inibidores de apoptossomos, as células morrem por autofagia e, quando essas concentrações são baixas, as células morrem por apoptose (Piacentini et al., 2003).

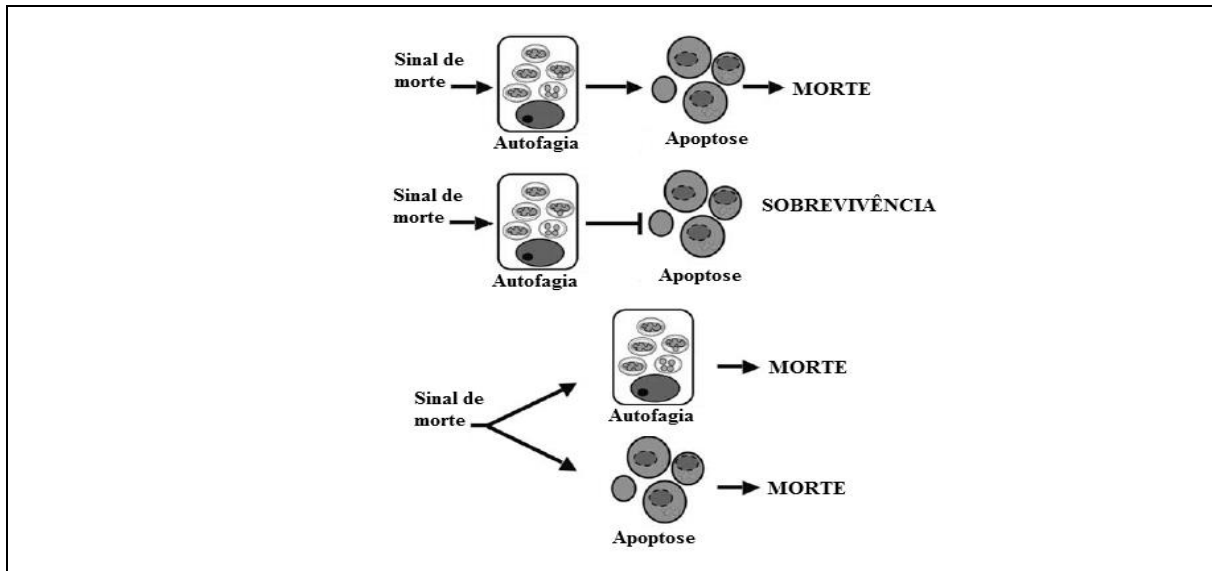


FIGURA 3: Conexão entre apoptose e autofagia. (A) autofagia precede a ocorrência de apoptose, (B) autofagia pode antagonizar ou retardar a apoptose e (C) autofagia e apoptose podem ocorrer independentemente uma da outra. A inibição da apoptose pode promover a autofagia e vice-versa (Gozuacik et al., 2004).

A catástrofe mitótica é definida como um tipo de morte celular causada por mitose defeituosa, capaz de gerar aberrações cromossômicas, divisões assimétricas, fragmentação nuclear, formação de micronúcleos, aneuploidia e/ou poliploidia (Castedo et al., 2004).

Em células de mamíferos, a catástrofe mitótica está associada, principalmente, com deficiências nos pontos de checagem do ciclo celular (Roninson et al., 2001). Uma vez que o ponto de checagem G2 / M é responsável pelo bloqueio da mitose na presença de danos no DNA, a expressão alterada de proteínas envolvidas neste ponto de checagem está, provavelmente, associada à catástrofe mitótica. Elevados níveis de expressão de proteínas que promovem a entrada da mitose, tais como Cdk1 e ciclina B, bem como a inibição de proteínas que previnem a mitose prematura, como ATR, ATM, Chk1, Chk2, podem induzir a catástrofe mitótica (Jin et al., 1998; Brown et al., 2000; Takai et al., 2000; Niida et al., 2005). Por outro lado, as proteínas p53 e p21, por atuarem como reguladores negativos do ciclo celular podem desempenhar papel importante na prevenção da catástrofe mitótica após a detecção de dano no DNA (Bunz et al., 1998). Deficiências no ponto de checagem do fuso também têm sido relacionadas à catástrofe mitótica (Bharadwaj et al., 2004).

Alguns estudos demonstraram que a catástrofe mitótica pode ser seguida pela morte por apoptose. Por este motivo, ainda está em discussão se catástrofe mitótica deve ser

considerada um processo de morte específica ou apenas um fator indutor da apoptose (Roninson et al., 2001; Castedo et al., 2004).

A FIG. 4 apresenta um desenho esquemático contendo as principais características morfológicas dos diferentes tipos de morte celular descritos.

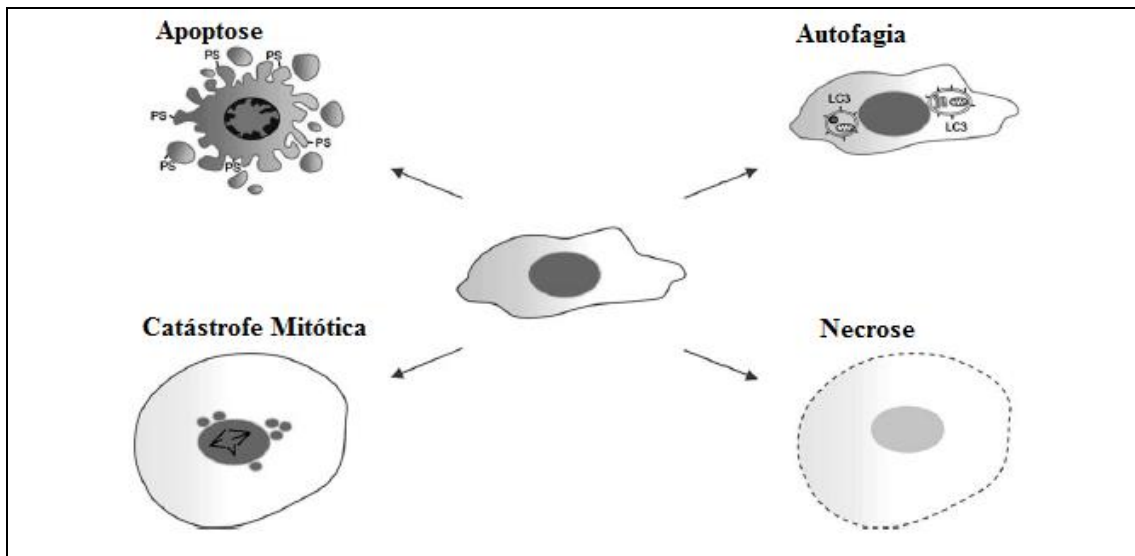


FIGURA 4: Características morfológicas específicas dos diferentes tipos de morte celular. Na necrose as células incham e perdem a integridade da membrana. Na apoptose é possível observar retração e redução de volume citoplasmático, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, formação de *blebs* na membrana plasmática, exposição de fosfatidilserina (FS) sobre a superfície das células e a formação de corpos apoptóticos. A morte por autofagia é caracterizada pela formação dos autofagolisossomos que está associada à proteína LC3. As células que morrem de catástrofe mitótica são geralmente grandes e contêm cromossomos não condensados. A principal característica da catástrofe mitótica é a formação de múltiplos micronúcleos (de Bruin et al., 2008).

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO E MORTE CELULAR

O estresse oxidativo é uma condição bioquímica caracterizada pelo desequilíbrio entre os níveis relativamente elevados de espécies reativas e os mecanismos de defesa antioxidante. As espécies reativas são moléculas orgânicas ou inorgânicas que possuem um número ímpar de elétrons e são produzidas, *in vivo*, por meio de reações de oxidação-redução (Ozben, 2007).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são geradas como subprodutos do metabolismo celular, principalmente na mitocôndria. Quando a produção celular de ROS supera sua capacidade antioxidante, danos a moléculas celulares, como lipídios, proteínas e

DNA, podem surgir. Esse estado de estresse oxidativo pode contribuir para a patogênese de várias doenças humanas, incluindo o câncer (Thannickal et al., 2000).

ROS incluem os radicais livres, tais como o radical hidroxil (OH^\bullet) e o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), e os não radicais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O $\text{O}_2^{\bullet-}$ é o radical livre primário, formado nas células a partir da redução do oxigênio molecular. Sob ação da enzima superóxido dismutase (SOD), esse radical é convertido em H_2O_2 que, na presença de ferro ou cobre, dá origem ao radical altamente tóxico OH^\bullet , por meio da reação de Fenton/Haber-Weiss (Finaud et al., 2006). A geração de ROS pode ser intensificada em situações de estresse geradas por agentes químicos, radiação, alta intensidade de luz, temperaturas extremas, toxinas, poluentes e metais (Scandalios, 2005).

A exposição às ROS provoca danos celulares muitas vezes irreparáveis. Esses danos ocorrem, em geral, em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos promovendo significativas alterações na fisiologia celular (Avery, 2011).

Com relação aos danos em lipídios, os mais comuns são aqueles que ocorrem quando as ROS reagem com um ácido graxo da membrana plasmática promovendo a sua peroxidação. Os efeitos da peroxidação são a redução da fluidez da membrana, redução da permeabilidade seletiva, dano às proteínas de membrana e inativação de enzimas e canais iônicos (Halliwell et al., 2007). O produto final do processo de peroxidação lipídica é a formação de malondialdeído (MDA) e 4 hidroxil-2-nonenal (HNE) que podem, ainda, reagir com o DNA celular promovendo genotoxicidade (Valko et al., 2006).

As proteínas também podem ser oxidadas pelas ROS promovendo danos nos resíduos de aminoácidos, alterações na estrutura terciária, fragmentação e degradação. Como consequências são observadas perda de atividade enzimática, alterações de funções celulares importantes como produção de ATP, interferência na criação de potencial de membrana, entre outras (Kohen et al., 2002).

As ROS também podem interagir com a molécula de DNA causando danos ou perdas das bases nitrogenadas, quebras simples ou duplas da fita de DNA, danos estruturais na desoxirribose, ligações cruzadas entre DNA e proteínas, além de danos no sistema de reparo celular (Kohen et al., 2002). Dependendo da extensão do dano causado, as lesões no DNA celular não podem ser reparadas resultando na indução de mutações e podendo, até mesmo, levar as células à morte (Halliwell et al., 2007).

O estresse oxidativo tem sido relacionado à ativação de fatores de transcrição e desencadeamento de apoptose (Mates et al., 2000). Estudos recentes demonstraram que o aumento da peroxidação lipídica, induzida por ROS, pode promover a liberação de citocromo c da mitocôndria e a externalização de FS, que são eventos críticos na indução da apoptose (Chiou et al., 2003; Fruehauf et al., 2007).

Alguns estudos também sugerem que as ROS podem induzir a autofagia e apontam esse tipo de morte como uma das primeiras linhas de defesa contra os danos do estresse oxidativo. Através dela é possível garantir a seletiva autodigestão lisossomal de componentes intracelulares e consequente manutenção da homeostase celular (Li et al., 2012).

A compreensão destes processos tem promovido o desenvolvimento de novos quimioterápicos capazes de alterar a homeostase redox em benefício terapêutico. Estes quimioterápicos, ao promoverem a geração de ROS, induzem o estresse oxidativo resultando na morte programada das células tumorais (Engel et al., 2006). Portanto, a modulação redox permite eliminar seletivamente as células cancerosas sem, no entanto, causar toxicidade significativa para células normais (Trachootham et al., 2009).

1.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A PESQUISA DE NOVOS FÁRMACOS

O processo de desenvolvimento de novos fármacos envolve uma série de etapas como: pesquisa básica para obtenção e otimização do protótipo; ensaios pré-clínicos com avaliação farmacológica, estudos farmacocinéticos e avaliação toxicológica; ensaios clínicos pré-comercialização – fase I, II e III; desenvolvimento do processo de produção e controle de qualidade; aquisição de autorização para comercialização do novo medicamento e ensaios clínicos pós-registro (Hefti, 2008; Orloff et al., 2009).

O planejamento estrutural do protótipo, baseado no mecanismo envolvido no processo fisiopatológico, representa importante estratégia para inovação no desenvolvimento de fármacos. Este processo inicia-se pela escolha correta do alvo terapêutico relacionado à patologia que se pretende tratar e posterior desenvolvimento de moléculas com níveis elevados de seletividade pelos alvos terapêuticos eleitos. Essas moléculas devem ser capazes de promover resposta biológica satisfatória, com a menor

toxicidade possível para órgãos e tecidos que não são objeto do tratamento (Barreiro et al., 2005).

Nos estudos pré-clínicos, os testes de eficácia e toxicológicos são realizados por meio de experimentos *in vitro* e em animais e, na fase clínica, em seres humanos. Estima-se que o período médio de desenvolvimento de uma nova droga varia entre 10 e 12 anos, nos quais cerca de 10 mil moléculas são testadas para que apenas 1 se torne um fármaco comercializável (INCA, 2012).

Em geral, as principais causas de reprovação dos fármacos durante os estudos clínicos são a baixa eficácia dos compostos em teste, limitações farmacocinéticas, biodisponibilidade reduzida e toxicidade elevada. Sendo assim, algumas estratégias podem ser utilizadas para aumentar as chances de sucesso do candidato a novo fármaco, como a obtenção de dados confiáveis a respeito do mecanismo de ação nos estágios iniciais da pesquisa; estabelecimento de ensaios de modulação de alvos moleculares definidos; análise criteriosa da toxicidade dos compostos em desenvolvimento, por meio do uso de protocolos recomendados pelas instituições de referência e uso de modelos animais adequados para avaliar a eficácia nos ensaios pré-clínicos (Kola et al., 2004).

1.7 TIOSSEMICARBAZONAS

Durante muito tempo, a pesquisa de novos fármacos concentrou-se principalmente no estudo de compostos orgânicos e produtos naturais. A avaliação do perfil farmacológico de produtos sintéticos só teve início em 1965, após a descoberta da atividade antitumoral da cisplatina (cis(diaminodicloro)platina) pelo físico Barnett Rosemberg (Rosenberg et al., 1965). Desde então, novas moléculas sintéticas vêm sendo amplamente estudadas.

As tiossemicarbazonas (TSC) constituem uma importante classe de compostos sintéticos bastante atrativos do ponto de vista científico, uma vez que apresentam diversas atividades biológicas tais como antiviral (Teitz et al., 1994), antibacteriana (Kasuga et al., 2003), antiprotozoária (Bharti et al., 2002) e antitumoral (Feun et al., 2002; Mendes et al., 2009).

As TSC apresentam a estrutura básica $C=N-NH-CS-NH_2$, aproximadamente planar, contendo átomo de enxofre na posição anti em relação ao átomo de hidrogênio da função

imina (FIG. 5). Este arranjo é favorecido por fatores eletrônicos e estéricos, porém, ele pode variar significativamente dependendo dos grupos substituintes inseridos na posição N-4. Estes compostos possuem baixo custo de síntese e são, geralmente, produzidos a partir da reação de condensação quimiosseletiva de tiossemicarbazidas com aldeídos ou cetonas. As TSC não necessitam de armazenamento especial, não são sensíveis à luz e não exigem alto grau de cuidado durante a manipulação. Elas se apresentam como sistemas com extrema deslocalização eletrônica e possuem excelentes propriedades para formarem complexos metálicos, comportando-se como agentes quelantes (Tenório et al., 2005).

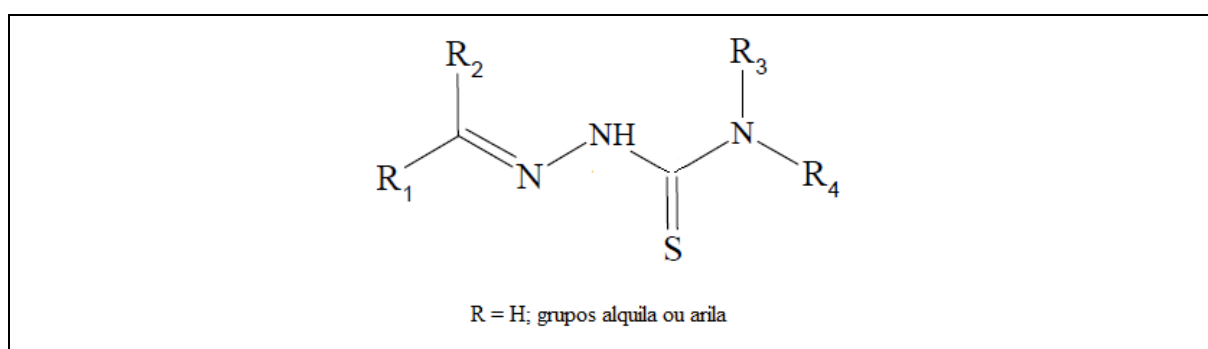


FIGURA 5: Estrutura química genérica das tiossemicarbazonas (Tenório et al., 2005).

As diversas atividades biológicas das TSC foram relacionadas, principalmente, à capacidade destes compostos atuarem como quelantes de metais endógenos, inibindo a ação fisiológica de algumas metaloenzimas celulares (French et al., 1966). Diversos autores já demonstraram que a inibição da enzima ribonucleotídeo redutase (RR) é um dos principais mecanismos envolvidos na ação antitumoral das TSC.

A RR possui a função de catalisar a síntese dos desoxirribonucleotídeos necessários para a síntese e reparo de DNA e, é formada por duas subunidades denominadas R₁ e R₂ (Yu et al., 2009). A subunidade R₂ contém um radical tirosila e um centro de ferro não-heme que são essenciais para a atividade catalítica da enzima (Finch et al., 1999). A atividade inibitória das TSC sobre a RR ocorre graças ao complexo formado entre elas e o átomo de ferro presente nesse sítio catalítico, o que resulta no bloqueio da biossíntese do DNA (Tenório et al., 2005).

Além de serem excelentes quelantes de ferro, as TSC também são capazes de quelar outros metais, como cobre e zinco. Essa habilidade de quelar metais é uma estratégia bastante atrativa para o desenvolvimento de drogas antitumorais, pois as células

neoplásicas, em geral, possuem alto requerimento desses metais, que são essenciais para seu crescimento e proliferação. Além disso, devido à maior necessidade de suprimento de ferro, as células tumorais possuem maior expressão de receptores de transferrina o que as torna mais susceptíveis e sensíveis às TSC, quando comparadas às células normais (Yu et al., 2009).

A tiossemicarbazona com atividade antitumoral mais extensivamente estudada é a Triapina (3-AP; 3-aminopiridina 2-carboxaldeído tiossemicarbazona) (FIG. 6). Estudos pré-clínicos realizados com essa TSC demonstraram que ela possui atividade antitumoral em concentrações até 1000 vezes menores do que aquelas utilizadas no tratamento com a hidroxiuréia, um antineoplásico inibidor de RR bastante utilizado na clínica médica (Shao et al., 2004; Wadler et al., 2004). Trabalhos recentes também demonstraram que, além de remover ferro de enzimas importantes para a fisiologia celular, a 3-AP, ao formar um complexo metálico, possui importante atividade redox, propriedade que também tem sido relacionada à sua potente atividade antitumoral (Shao et al., 2006). Graças ao sucesso dos estudos pré-clínicos com a 3-AP, ela já se encontra em estudos clínicos de fase II (Atieh et al., 2004).

Os primeiros testes para avaliação clínica da eficácia terapêutica da 3-AP, utilizada isoladamente ou em combinação com gencitabina, não apresentaram resultados satisfatórios (Nutting et al., 2009; Traynor et al., 2010). No entanto, em ensaios recentes, a combinação de 3-AP com fludarabina ou citarabina, em pacientes com leucemia, se mostrou bastante eficaz (Yee et al., 2006; Karp et al., 2008). Outros trabalhos também sugerem que o tratamento combinado da triapina com radioterapia ou cisplatina é mais eficaz para pacientes com estágio avançado câncer do colo do útero, quando comparado à terapia realizada com cada um dos agentes antineoplásicos separadamente (NCI, 2009).

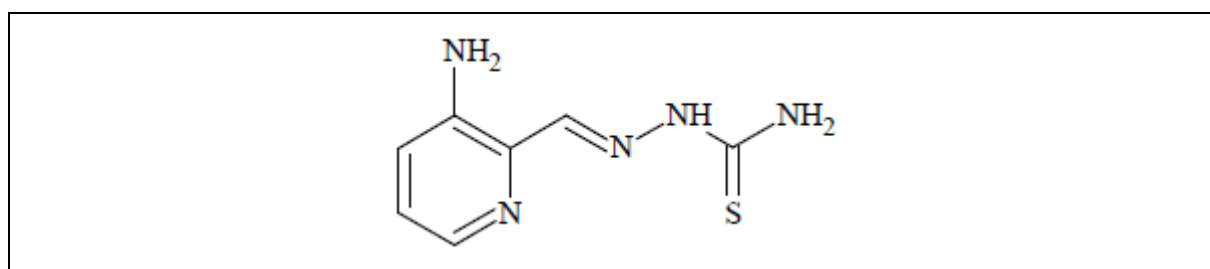


FIGURA 6: Estrutura química da Triapina (Yalowich et al., 2012).

Várias alterações químicas são frequentemente propostas por diversos autores a fim de intensificar o efeito antitumoral das TSC e, a inserção de halogênios na molécula pode ser uma boa estratégia para atingir esse propósito.

Em geral, a inserção de halogênios em moléculas com propriedades terapêuticas promove o aumento da permeabilidade à membrana plasmática e à barreira hematoencefálica. Além disso, a halogenação proporciona maior estabilidade à molécula e favorece as interações eletrostáticas com proteínas aumentando, assim, a possibilidade de maior afinidade de ligação do candidato a fármaco. Estima-se que, aproximadamente, 25% dos artigos científicos e patentes relacionados à química medicinal envolve a inserção de halogênios durante a síntese final dos compostos. A maioria das drogas halogenadas são fluorinadas seguidas daquelas que contém cloreto. Drogas contendo brometo e iodeto são menos frequentes (FIG. 7) (Hernandes et al., 2010).

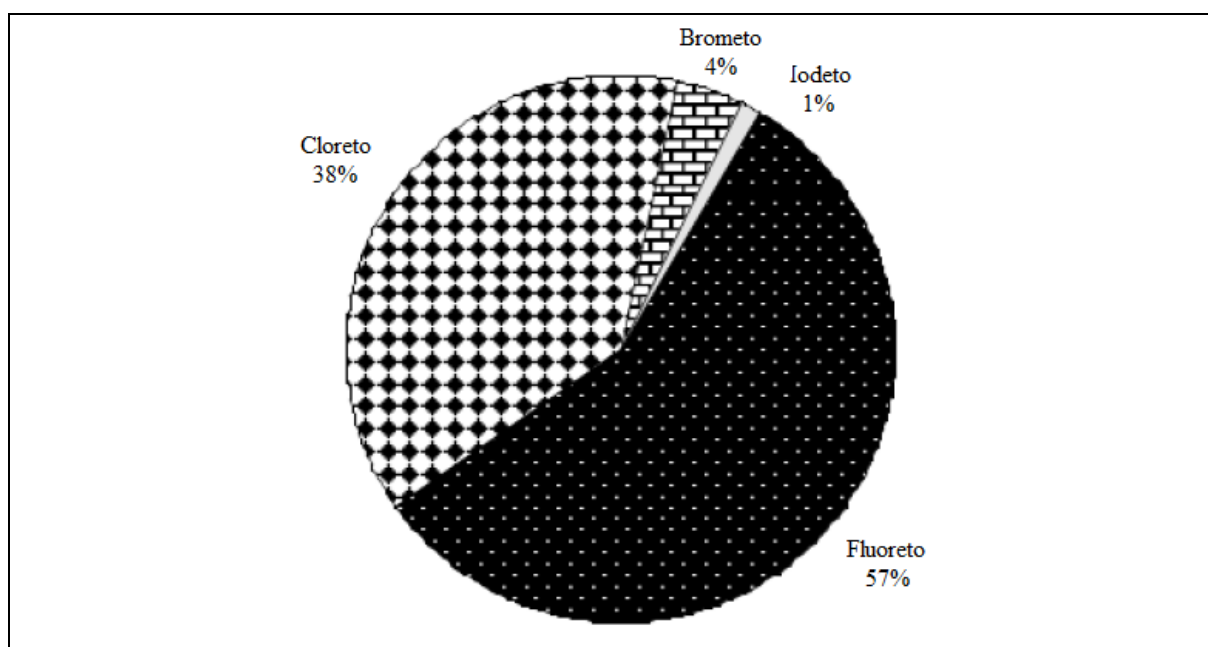


FIGURA 7: Estimativa das drogas halogenadas aprovadas pelo FDA no período entre 1988 a 2006 (Hernandes et al., 2010).

A síntese de complexos metálicos derivados de TSC também tem sido amplamente explorada. Diversos autores já demonstraram que a complexação de TSC com metais possibilitou o desenvolvimento de drogas com um efeito citotóxico ainda maior para as células tumorais. O efeito antineoplásico da bis(tiossemicarbazona) CuKTS, por exemplo, se mostrou essencialmente dependente da presença de cobre (Crim et al., 1967). Além disso,

algumas TSC apresentaram maior atividade antitumoral, quando complexadas ao gálio, ouro, zinco, níquel e paládio (Hall et al., 2000; Kovala-Demertzi et al., 2006; Ferraz et al., 2009; Mendes et al., 2009; Lessa et al., 2011; Ramachandran et al., 2012). Complexos de tiossemicarbazonas com platina também apresentaram bom índice terapêutico para células tumorais resistentes à cisplatina, sendo capazes de induzir apoptose nessas células quando utilizados em doses abaixo daquelas tóxicas para células normais (Quiroga et al., 1998; Quiroga et al., 1999).

Os complexos metálicos de TSC também apresentam grande potencial na área da Medicina Nuclear. Isto porque, como citado anteriormente, existe uma série de radiometais com propriedades físicas adequadas para utilização no diagnóstico por imagem e que podem ser complexados às TSC.

A radiomarcagem de TSC tem sido bastante explorada nas últimas décadas, com particular interesse na utilização de emissores de pósitrons para PET. O complexo ^{64}Cu -Azabiciclo[3.2.2]nonano (EPH- ^{64}Cu) TSC se mostrou eficiente na detecção de tumores com alta expressão de topoisomerase II (Wei et al., 2006), e investigações utilizando a piruvaldeído bis(N4-metil tiossemicarbazona) marcada com cobre-64 (PTSM- ^{64}Cu) demonstraram que ela possui importante captação miocárdica e cerebral.

Outro exemplo é a diacetil bis(N4-metil tiossemicarbazona) também marcada com cobre-64 (ATSM- ^{64}Cu) que demonstrou ter significativa seletividade por tecidos hipóxicos. Graças aos bons resultados obtidos nos estudos pré-clínicos, a ATSM- ^{64}Cu foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) para estudos piloto de imagem de câncer de colo de útero (Dehdashti et al., 2003; Vavere et al., 2007; Arrowsmith et al., 2011). Além dessas aplicações, o ligante H_2ATSM está sendo bastante explorado como quelante bifuncional, graças à facilidade de radiomarcagem com ^{64}Cu em condições ambiente e à possibilidade de ligação à peptídeos receptores-específicos, como a bombesina (Paterson et al., 2010) e o octreotídeo (Cowley et al., 2007).

2

JUSTIFICATIVA

Apesar do grande número de agentes antineoplásicos disponíveis, a resistência de alguns tipos de câncer e a toxicidade para as células normais têm sido apontadas como as principais causas da falha terapêutica e perda de vidas. Além da ausência de tratamentos efetivamente eficazes, a falta de diagnóstico precoce e preciso também é responsável pela redução da sobrevida dos pacientes com câncer. Neste contexto, o desenvolvimento de substâncias com baixa toxicidade e com potencial terapêutico e/ou diagnóstico, torna-se a principal ferramenta na tentativa de aumentar a sobrevida dos pacientes e garantir a segurança e eficácia do tratamento.

As TSC constituem uma classe de compostos sintéticos que apresentam diversas atividades biológicas, incluindo a atividade antitumoral. Apesar de vários estudos demonstrarem o grande potencial das TSC como agentes terapêuticos e/ou diagnósticos, diferentes modificações químicas realizadas em moléculas pertencentes a essa classe indicam novas possibilidades para aplicações e ainda necessitam de estudos aprofundados.

A justificativa deste trabalho consiste na importância da exploração de novos compostos derivados de TSC como drogas alternativas para a terapia e diagnóstico do câncer.

3

OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a potencial aplicação de derivados de 2-acetilpiridina N-4 fenil tiossemicarbazonas em terapia e diagnóstico oncológico.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito antitumoral *in vitro* de derivados de 2-acetilpiridinas N-4 fenil TSC sobre células de tumores humanos cerebrais e de mama, e identificar aquelas mais potentes;
- Identificar o tipo de morte induzido pelas TSC em células de tumores cerebrais e de mama;
- Avaliar a atividade redox de uma das TSC mais potentes;
- Avaliar a tolerância, em animais saudáveis, ao tratamento com uma das TSC mais potentes;
- Avaliar o efeito antitumoral *in vivo* de uma das TSC mais potentes, utilizando modelo animal de tumor cerebral;
- Sintetizar sondas radioativas de uma das TSC mais potentes usando gálio-67 e índio-111;
- Realizar o controle de qualidade radioquímico dos produtos radiomarcados;
- Avaliar o perfil de biodistribuição e caracterizar a farmacocinética dos produtos radiomarcados em camundongos saudáveis;
- Estudar a biodistribuição dos produtos radiomarcados em modelo animal c 49 cerebral e avaliar a potencial aplicação para diagnóstico de tumores.
- Avaliar a potencial aplicação da TSC radiomarcada em terapia local de glioblastoma multiforme.

4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A parte experimental deste trabalho foi dividida em duas etapas distintas: a primeira, na qual se avaliou a aplicação das TSC para terapia de câncer e, a segunda, na qual se avaliou a aplicação das TSC para diagnóstico oncológico.

Na primeira etapa, 13 diferentes derivados de 2-acetilpiridina TSC foram testados. A principal diferença estrutural dessas TSC é a presença de halogênio (F, Cl e I) ou nitro (NO₂) no grupo fenila das moléculas. Inicialmente, o objetivo desta etapa foi determinar se essas diferenças estruturais promoviam aumento do efeito antitumoral dessa classe de TSC. Para isso, a citotoxicidade dos derivados foi avaliada em linhagens de células de tumores de mama e cerebral. A citotoxicidade das TSC também foi avaliada em eritrócitos, com o intuito de estimar a toxicidade destes compostos para células normais. Posteriormente, foram feitos testes específicos para identificar o tipo de morte induzido pelas TSC e, a partir desses resultados, a TSC mais potente foi selecionada. A influência da atividade redox no efeito antitumoral das TSC também foi avaliada *in vitro*. Finalmente, a atividade antitumoral da TSC mais potente foi avaliada *in vivo*, em modelo animal de tumor cerebral, utilizando o protocolo de análise de tolerância realizado em camundongos saudáveis.

O esquema da realização dos experimentos, nessa primeira etapa, está apresentado na FIG. 8.

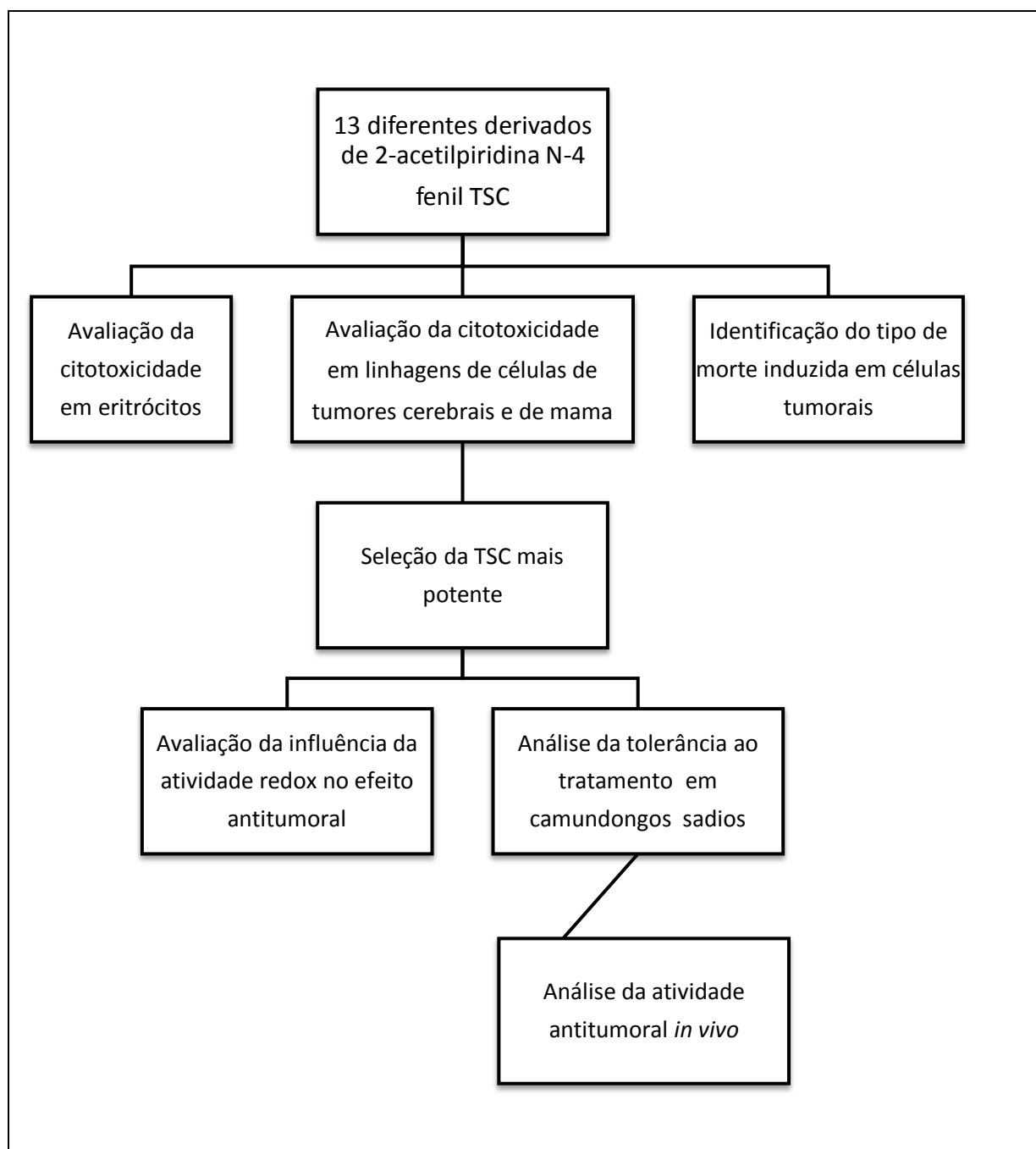


FIGURA 8: Esquema do planejamento experimental na primeira etapa do trabalho.

Como o intuito de avaliar a aplicação das TSC para diagnóstico oncológico, na segunda etapa deste trabalho foi realizada a radiomarcagem da TSC mais potente, utilizando gálio-67 e índio-111 como radiotraçadores. O controle de qualidade radioquímico e a análise da estabilidade foram realizados, assim como os testes de biodistribuição, imagem e a caracterização da farmacocinética *in vivo*. Posteriormente, estudos cintilográficos foram realizados, em modelo animal de tumor cerebral, e a TSC mais adequada para o propósito

deste trabalho foi selecionada. Para melhor caracterizar a TSC selecionada, a determinação experimental do coeficiente de partição, os estudos de internalização e a determinação do comportamento em soro humano *in vitro* foram realizados. Também foram feitas a análise comparativa das imagens obtidas a partir da TSC radiomarcada e do isótopo livre, e os estudos cintilográficos em modelo animal de tumor cerebral em tempos tardios (24 e 48 h). Por fim, a TSC radiomarcada foi injetada por via intratumoral, para avaliação da sua difusão e retenção no sítio tumoral.

O esquema da realização dos experimentos, nessa segunda etapa do trabalho, está apresentado na FIG. 9.

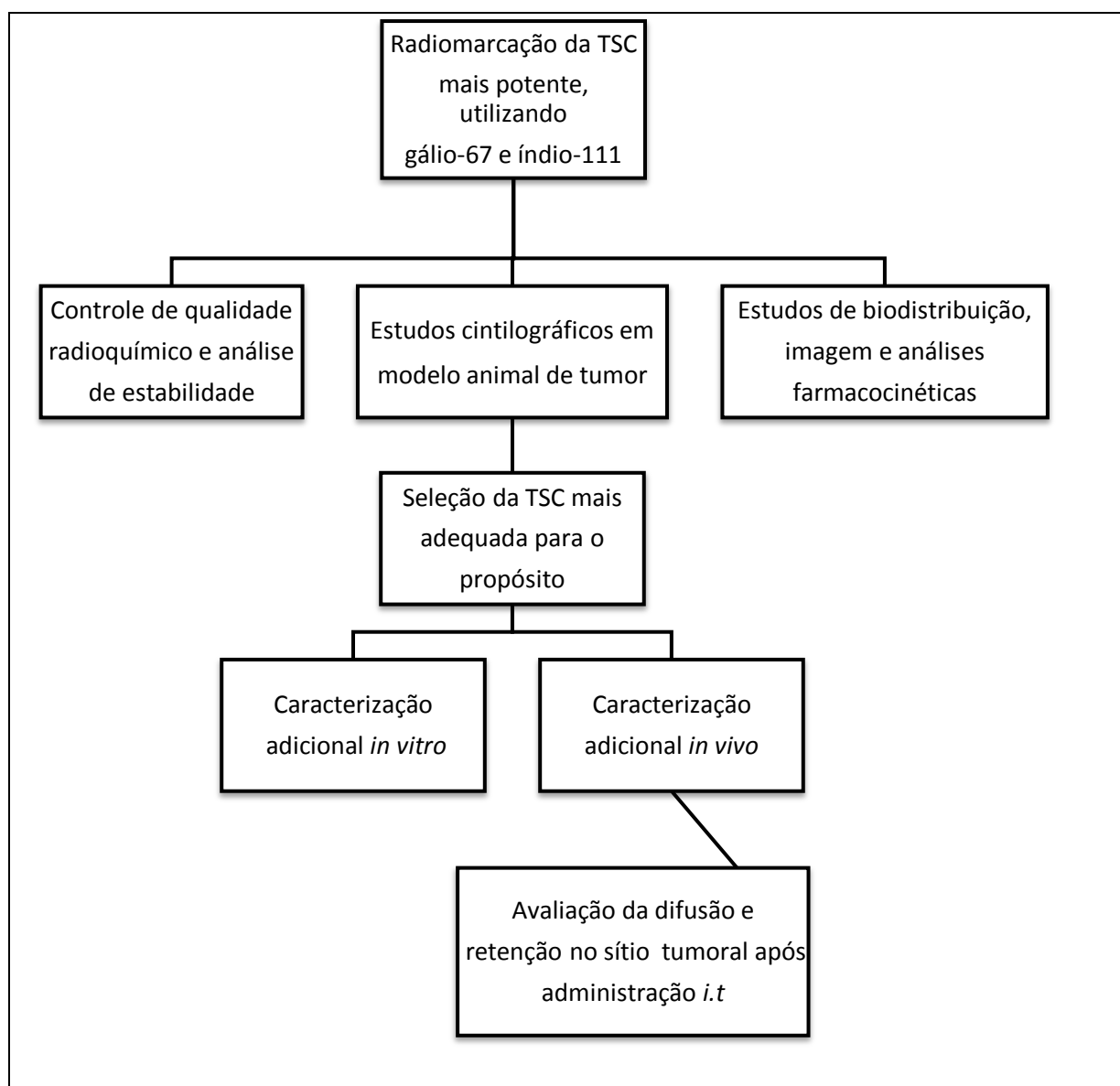


FIGURA 9: Esquema do planejamento experimental na segunda etapa do trabalho.

4.2 MATERIAIS

4.2.1 REAGENTES

- ✓ acetonitrila para CLAE (Merck);
- ✓ ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Merck);
- ✓ ácido clorídrico ultrapuro (Merck);
- ✓ ácido trifluoroacético para CLAE (Sigma – Chemical Co.);
- ✓ água purificada por equipamento de osmose reversa (Purificador Milli-RX 45 Millipore);
- ✓ anexina V – iodeto de propídeo (Sigma – Chemical Co.);
- ✓ azul de tripan (Gibco);
- ✓ brometo de etídio (Sigma – Chemical Co.);
- ✓ cloreto de índio-111 (Nordion);
- ✓ cloreto de gálio-67 (Nordion);
- ✓ DAPI (diidrocloreto de 4, 6- diamidino- 2- fenindole - Sigma – Chemical Co.);
- ✓ DCFH-DA (2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato - Sigma – Chemical Co.);
- ✓ DMSO (dimetilsulfóxido – Sigma);
- ✓ etanol (Merck);
- ✓ laranja de acridina (Sigma – Chemical Co.);
- ✓ matrigel (BD-Biosciences);
- ✓ meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's - Cultilab);
- ✓ metanol (Sigma – Chemical Co.);
- ✓ MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-tetrazolium – Gibco);
- ✓ n-octanol (Sigma – Chemical Co.);
- ✓ penicilina:estreptomicina (Cultilab);
- ✓ soro fetal bovino (Cultilab);
- ✓ tripsina (Cultilab);
- ✓ uretana (Sigma – Chemical Co.).

4.2.2 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

- ✓ agitador/aquecedor Thermomixer comfort 1,5 mL (Eppendorf);

- ✓ calibrador de atividade (CRMTM-35R – Capintec);
- ✓ câmara de Neubauer;
- ✓ câmera fotográfica (Nikon - Coolpix 4500).
- ✓ coluna de fase reversa C₁₈ para cromatografia líquida de alta eficiência (0,46 x 25 cm – Supelco);
- ✓ contador automático tipo poço com cristal NaI(Tl) D5002 cobra II (Packard-Canberra);
- ✓ cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu) acoplado ao detector radioativo Shell Jr. 1000/2000 (câmara de cintilação – NaI) (Shell-usa);
- ✓ cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent Technologies 1200);
- ✓ espectrofotômetro (Shimadzu – UV 1601);
- ✓ frascos para cultivo de células (Costar, EUA);
- ✓ gama câmara Nucline TH/22, com colimador paralelo de baixa energia e alta resolução, e matriz 512 x 512. Software Mediso Interview XP v1.05.014 (Mediso Imaging System, Hungria);
- ✓ jaleco, luvas, dosímetro e óculos de proteção, blindagem, detector Geiger-Müller;
- ✓ leitor de microplaca UV-visível (Biotek – ELX 808);
- ✓ medidor de pH (Tecnopon, Brasil);
- ✓ material plástico descartável em geral, tais como ponteiras, seringas, tubos tipo eppendorf, tubos cônicos tipo Falcon e criotubos;
- ✓ microscópio óptico invertido (Nikon – Eclipse TS100);
- ✓ microscópio de fluorescência invertido (Nikon – Eclipse TS100 – CSHG 385-410nm);
- ✓ pipetas automáticas (Gilson, Brand, Socorex);
- ✓ tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA - Vacuette);
- ✓ ultracentrífuga MIKRO 220R (Hettich);
- ✓ vidraria em geral, tais como béqueres, erlemeyers, balões volumétricos, provetas e pipetas.

4.2.3 TAMPÕES E SOLUÇÕES

- ✓ ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 % (v/v) em acetonitrila (CH₃CN);
- ✓ ácido trifluoroacético 0,1 % (v/v) em água (H₂O);

- ✓ ácido tricloroacético (TCA) 10% (v/v) em H₂O;
- ✓ solução fosfato-salina (PBS) pH 7,4;
- ✓ solução de NaCl 0,9 % (p/v) em água;
- ✓ solução de NaOH 1 M em H₂O;
- ✓ PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 9,1 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4).
- ✓ tampão glicina 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 2,8;
- ✓ tampão de lise (PBS 50 mM, pH 7,0 contendo EDTA 1 mM e PMSF 1 mM).

4.3 CULTIVO CELULAR

As linhagens de células tumorais de glioblastoma (U-87MG e T98-G) e de mama (MCF-7) foram obtidas da ATCC (American Type Cell Collection) e cultivadas em uma atmosfera úmida/5% CO₂ a 37° C, em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina. Ao atingirem a fase logarítmica, as células foram tripsinizadas e a viabilidade celular foi avaliada por meio do teste de exclusão do azul de tripan. Este teste consiste em incubar as células por 1 minuto (min) com o azul de tripan e quantificá-las com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Células vivas que apresentam membrana íntegra (membrana impermeável) permanecem incolores e células mortas ou com a permeabilidade de membrana aumentada são visualizadas em azul. As células viáveis (incolores) foram utilizadas nos experimentos (faixa de passagem das células: 5 - 20).

A tabela abaixo (TAB. 2) apresenta as características das células tumorais utilizadas nos experimentos:

TABELA 2: Linhagens de células tumorais utilizadas nos experimentos

Linhagem celular	Características			
	Doença	Origem	Órgão	Status P53
U-87MG	Glioblastoma	Humana	Cérebro	Selvagem
T98-G	Glioblastoma	Humana	Cérebro	Mutante
MCF-7	Adenocarcinoma	Humana	Mama	Selvagem

4.4 TIOSSEMICARBAZONAS

As TSC testadas foram sintetizadas e quimicamente caracterizadas pela doutoranda Josane A. Lessa (membro do grupo de pesquisa da colaboradora professora Dra. Heloísa Beraldo, do Laboratório de Química da Universidade Federal de Minas Gerais). As TSC estão listadas na TAB. 3 e quimicamente representadas na FIG. 10.

TABELA 3: Tiossemicarbazonas utilizadas nos experimentos.

Tiossemicarbazona	Características	
	Fórmula molecular	Massa molar (g.mol ⁻¹)
H2Ac4Ph	C ₁₄ H ₁₄ N ₄ S	270,35
H2Ac4oClPh	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₄ S	304,79
H2Ac4mClPh	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₄ S	304,79
H2Ac4pClFPh	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₄ S	304,79
H2Ac4oFPh	C ₁₄ H ₁₃ FN ₄ S	288,34
H2Ac4mFPh	C ₁₄ H ₁₃ FN ₄ S	288,34
H2Ac4pFPh	C ₁₄ H ₁₃ FN ₄ S	288,34
H2Ac4oIPh	C ₁₄ H ₁₃ IN ₄ S	396,25
H2Ac4mIPh	C ₁₄ H ₁₃ IN ₄ S	396,25
H2Ac4pIPh	C ₁₄ H ₁₃ IN ₄ S	396,25
H2Ac4oNO ₂ Ph	C ₁₄ H ₁₄ NO ₂ N ₄ S	316,50
H2Ac4mNO ₂ Ph	C ₁₄ H ₁₃ NO ₂ N ₄ S	316,50
H2Ac4pNO ₂ FPh	C ₁₄ H ₁₃ NO ₂ N ₄ S	316,50

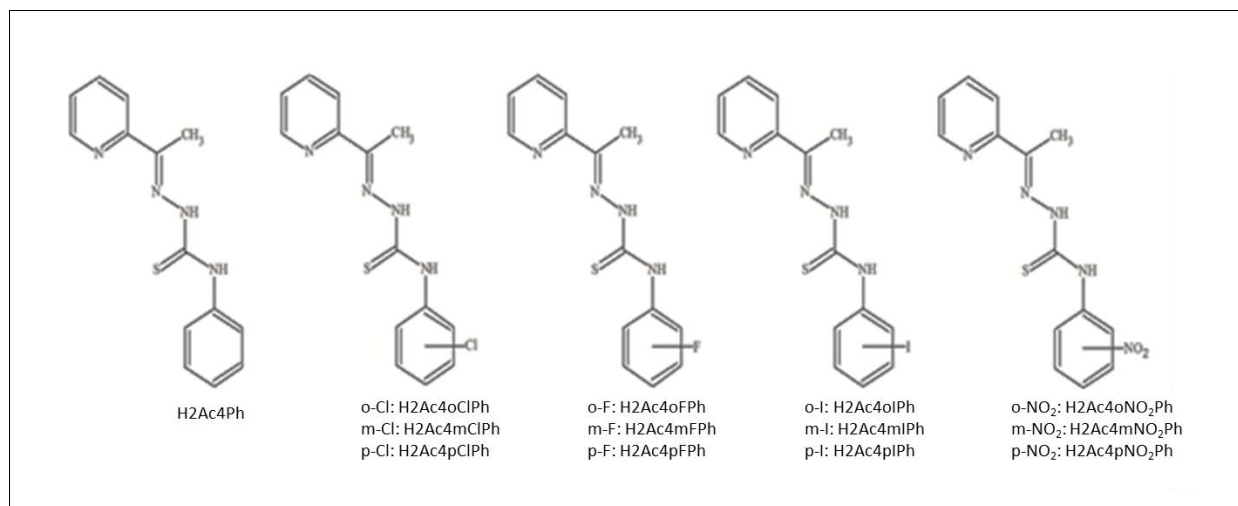


FIGURA 10: Estrutura química das tiossemicarbazonas utilizadas nos experimentos.

Para atestar a pureza química das tiossemicarbazonas, foi realizada a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As análises foram feitas em um cromatógrafo operando com vazão constante de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, equipado com um detector UV-visível (314 nm) e uma coluna de fase reversa Supelco C18 (0,46 x 25 cm). A temperatura da coluna, igual a 25°C , foi mantida constante, e a fase móvel utilizada foi metanol P.A. (método A).

Devido à natureza hidrofóbica das TSC, elas foram dissolvidas, no momento do uso, em DMSO. A concentração final de DMSO nas soluções de TSC foi de, no máximo, 0,4%, após a diluição em meio de cultura. Essa concentração demonstrou ser atóxica para as células.

4.5 ANIMAIS

Todos os experimentos com animais foram feitos de acordo com o Guia de Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório da NRC (National Research Council, Institucional Animal Care and Use Committee Guidebook, 1996) utilizando o protocolo previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (processo nº107/2008).

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, pesando de 25 a 30 g, obtidos no Centro de Bioterismo do ICB/UFMG ou no Centro de Bioterismo do Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares (IPEN/CNEN) e camundongos *Nude* machos, pesando aproximadamente 20 g, obtidos Centro de Bioterismo do IPEN/CNEN. Para os testes de

biodistribuição e imagem, foram utilizados 3 animais em cada grupo experimental. Para o teste de tolerância e avaliação da atividade antitumoral da TSC mais potente, foram utilizados 5 animais em cada grupo experimental. O anestésico utilizado para a obtenção das imagens cintilográficas foi uretana ($1,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e o método de eutanásia foi deslocamento cervical.

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO

A avaliação do efeito citotóxico das diferentes TSC, em células tumorais, foi feita pela medida da taxa de sobrevivência das células tratadas, por meio do teste do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-tetrazolium) (Plumb et al., 1989).

Células U-87MG, T98-G e MCF-7 foram semeadas em placas de 96 poços e, após 24 horas (h), foram expostas a diferentes concentrações das TSC (1×10^{-5} – 1×10^{-12} M). Após 48 h de tratamento, as células foram incubadas com o MTT ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 4 h, ao abrigo da luz. Posteriormente, o sobrenadante contendo MTT foi retirado e $100 \mu\text{L}$ de DMSO foram colocados em cada poço para solubilizar os cristais de formazan. As amostras foram medidas por espectrofotometria em um leitor de microplaca UV-visível a 570 nm. A fração de sobrevivência foi calculada como porcentagem do controle (absorbância do controle = 100% de sobrevivência).

A partir da curva de sobrevivência projetada, o IC_{50} (concentração citotóxica para 50% das células) foi determinado por meio do *software* GraphPad Prism 5, e utilizado para comparar a potência das diferentes TSC.

A citotoxicidade das TSC também foi avaliada em eritrócitos por meio do teste de hemólise (Fischer et al., 2003). Sangue humano foi coletado em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e centrifugado a $800\times g$ durante 10 min. O sedimento foi lavado três vezes com tampão fosfato (PBS), por centrifugação, e ressuspenso no mesmo tampão. Soluções de diferentes concentrações de cada TSC foram adicionadas à solução de eritrócitos (10%) e incubadas por 1 h a 37°C . Após o tempo de incubação, as células foram novamente lavadas e ressuspenso em PBS. A liberação de hemoglobina foi determinada por análise espectrofotométrica a 540 nm. A hemólise promovida pelas TSC foi calculada

como porcentagem do controle positivo (hemácias incubadas com solução 5% de triton X-100 = 100% de hemólise).

4.7 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Para a análise das alterações morfológicas induzidas pelas TSC, células U-87MG, T98-G e MCF-7 foram semeadas em placas de 96 poços e, após 24 h, foram tratadas com as TSC (1×10^{-6} M). Após 48 h de tratamento, as células foram visualizadas ao microscópio óptico invertido e fotografadas.

4.8 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO DNA CROMOSSOMAL

Para análise das alterações do DNA cromossomal, células U-87MG, T98-G e MCF-7 foram semeadas em placas de 96 poços e, após 24 h, foram tratadas com as TSC (1×10^{-6} M). Após 48 h de tratamento, as células foram lavadas 1x com PBS e fixadas em metanol (gelado), por 20 minutos. Após fixação, as células foram lavadas novamente 1x com PBS e incubadas por 30 minutos com DAPI (400 ng.mL^{-1}), diluído em PBS. Após o período de incubação, o sobrenadante contendo DAPI foi retirado e as células foram lavadas 5x com PBS (Jang et al., 2003; Kubota et al., 2000). Núcleos das células corados com DAPI foram visualizados em microscópio de fluorescência invertido e fotografados.

4.9 DETERMINAÇÃO DO TIPO DE MORTE INDUZIDA

Para determinar o tipo de morte induzido pelas TSC, células U-87MG, T98-G e MCF-7 foram semeadas em placas de 96 poços e, após 24 h, foram tratadas com as TSC (1×10^{-6} M). Após 48 h de tratamento, as células foram lavadas 1x com PBS e incubadas, durante 15 min, em meio de cultura sem soro fetal bovino (SFB) contendo $1 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de laranja de acridina e $1 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de brometo de etídio. Após o tempo de incubação, o meio de cultura foi removido e as micrografias fluorescentes foram obtidas utilizando um microscópio de fluorescência invertido e câmera fotográfica. Células viáveis apresentaram núcleo verde brilhante

uniforme; células apoptóticas (que possuem membrana intacta e não se coram com o brometo de etídio) apresentaram núcleo verde com pontos visíveis de condensação da cromatina; e células necróticas apresentaram núcleo uniformemente laranja-avermelhado (Baskic et al., 2006).

O tipo de morte induzido pela H2Ac4oFPh também foi avaliado pela coloração dupla com anexina V – iodeto de propídeo (IP). Células U-87MG foram semeadas em placas de 96 poços e, após 24 h, foram tratadas com H2Ac4oFPh (1 e 10 x 10⁻⁶ M). Após diferentes intervalos de tempo (1, 3 h), as células foram lavadas 2x com PBS e coradas de acordo com protocolo do kit para detecção de apoptose anexina V – FITC (Sigma – Chemical Co.). Após a coloração, as micrografias fluorescentes foram obtidas utilizando um microscópio de fluorescência invertido e câmera fotográfica. Células viáveis foram negativas tanto para a anexina V quanto para o IP; células apoptóticas foram positivas para a anexina V e negativas para o IP; células necróticas ou em apoptose tardia foram positivas tanto para a anexina V quanto para o IP (Bossy-Wetzel et al., 2000).

4.10 AVALIAÇÃO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Para avaliar a geração de ROS, induzida pela H2Ac4oFPh, células U-87MG foram semeadas em placas de 96 poços e, após 24 h, foram tratadas com H2Ac4oFPh (1 x 10⁻⁶ M). Após 24 h de tratamento, as células foram lavadas 2x com PBS e incubadas com 50 µM de 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) em PBS, por 30 minutos. A DCFH-DA é uma molécula que, após atravessar a membrana celular por difusão passiva e entrar em contato com espécies reativas de oxigênio (ROS), é oxidada formando diclorofluoreceína (DCF) fluorescente, que pode ser detectada em microscópio de fluorescência (Rhee et al., 2010). Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS, visualizadas em microscópio de fluorescência invertido e fotografadas.

4.11 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A avaliação da peroxidação lipídica, induzida pelo tratamento com H2Ac4oFPh, foi realizada por meio da quantificação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

(Esterbauer et al., 1991; Linden et al., 2008). Células U-87MG foram semeadas em placas de petri e, após 24 h, foram tratadas com H2Ac4oFPh (1×10^{-6} M). Após 24 h de tratamento, as células foram lavadas 2x com PBS, tripsinizadas e incubadas com tampão de lise (PBS 50 mM, pH 7,0 contendo EDTA 1 mM e PMSF 1mM) por 5 min. Posteriormente, o lisado foi centrifugado por 5 minutos a 15000xg e uma alíquota do sobrenadante foi retirada para quantificação do conteúdo protéico (Lowry et al., 1951).

Posteriormente, o sobrenadante foi incubado por 30 min, no gelo, com uma solução de ácido tricloroacético (TCA, concentração final 10%) e, em seguida, com uma solução de TBA (0,5%). A amostra foi, então, aquecida a 100° C por 60 min e, após atingir a temperatura ambiente, analisada em espectrofotômetro (532 nm). O cálculo do MDA, resultante da peroxidação de lipídios nas amostras controle e tratadas, foi feito a partir de uma curva padrão de MDA. O índice de peroxidação lipídica foi expresso em picomoles de MDA.mg de proteína⁻¹.mL⁻¹.

4.12 TRATAMENTO *IN VIVO*

Para determinação do protocolo para tratamento *in vivo* com H2Ac4oFPh, trabalhos publicados por pesquisadores do Instituto Nacional de Câncer (NCI) Norte Americano foram utilizados como referência. Estes trabalhos preconizam que, para testes pré-clínicos *in vivo*, a dose do composto a ser utilizada deve ser a “máxima dose tolerada” que é definida como: “máxima quantidade do agente teste não letal e que não promove redução maior do que 20% da massa corporal dos animais (Plowman et al., 1998). Seguindo esse princípio, a dose 5 mg.kg⁻¹ de H2Ac4oFPh foi escolhida para análise de tolerância em camundongos *Swiss* sadios. Essa escolha foi baseada na solubilidade máxima dessa TSC em solução veículo amplamente utilizada em estudos pré-clínicos com compostos lipossolúveis: 10% de DMSO e 0,05% de tween 80 em cloreto de sódio (NaCl) 0,9% (p/v) (Johnson et al., 2001; Hancock et al., 2011). Com o intuito de potencializar o efeito antitumoral sem, no entanto, promover efeitos tóxicos elevados, o tratamento foi realizado durante quatro dias consecutivos totalizando 20 mg.kg⁻¹ de TSC por animal. A via de administração utilizada foi a subcutânea (s.c.) na região cervical dorsal dos animais, com o propósito de simular o tratamento local do tumor. Após o tratamento com H2Ac4oFPh, os animais foram mantidos sob observação

diária, por 31 dias, para avaliação de possíveis alterações comportamentais, perda de massa corporal e morte.

Para o tratamento *in vivo*, o modelo animal de tumor cerebral foi desenvolvido em camundongos *Nude* machos, de acordo com metodologia descrita por Kievit e colaboradores (2010), com modificações. Células U-87MG (5×10^6) foram ressuspensas em matrigel alta concentração : salina 0,9% (1 : 2), e injetadas, por via subcutânea, na região cervical dorsal dos camundongos *Nude*.

O tratamento *in vivo* com H2Ac4oFPh foi realizado de acordo com dois protocolos distintos: tratamento iniciado 6 dias após o implante, quando não havia massa tumoral mensurável (protocolo 1), e 10 dias após o implante, quando já era possível identificar massa tumoral em crescimento ($\sim 50 \text{ mm}^3$) (protocolo 2). Antes do início de cada tratamento, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos de cinco animais.

Para o tratamento, 5 mg.kg^{-1} de H2Ac4oFPh foram injetados nos animais, no local da inoculação do tumor (protocolo 1) ou por via intratumoral (protocolo 2), durante 4 dias consecutivos. Animais do grupo controle foram inoculados com o veículo, pela mesma via de administração dos grupos tratados. O volume tumoral foi monitorado com o auxílio de um paquímetro. Ao final do experimento, 19 dias após o implante do tumor, os animais foram eutanasiados e os tumores foram dissecados e pesados. Os principais órgãos vitais dos animais foram removidos e enviados, juntamente com os tumores, para avaliação histopatológica. O laudo histopatológico foi emitido pelo especialista em Patologia Animal e Comparada, Prof. MSc. Juneo Freitas Silva, professor substituto da escola de veterinária da UFMG.

4.13 SÍNTESE DE SONDA RADIOATIVA DA H2Ac4oFPH

Todos os experimentos utilizando material radioativo foram feitos tomando-se os devidos cuidados de radioproteção, de acordo com a norma CNEN 3.01. As bancadas foram devidamente forradas, os equipamentos de proteção individual (jaleco, luvas, dosímetro e óculos de proteção) foram utilizados, os descartes de rejeitos foram etiquetados com as informações pertinentes (identificação do radioisótopo, tipo de emissão, o tipo de rejeito), a blindagem adequada foi utilizada e o monitoramento das possíveis contaminações de

superfície foi feito com o detector Geiger-Müller.

Com o objetivo de avaliar a interação da H2Ac4oFPh com o sítio tumoral *in vivo*, sondas radioativas deste composto foram sintetizadas, utilizando os radioisótopos gálio-67 e índio-111 como radiotraçadores. As sínteses das sondas radioativas foram feitas de acordo com método descrito por Jalilian e colaboradores (2009), com modificações. Foram utilizados 10 µg de cada TSC, dissolvidas em metanol, e 1 – 2 mCi (37 – 74 MBq) de ¹¹¹InCl₃ ou ⁶⁷GaCl₃ em HCl, que foi previamente evaporado à 99° C. A reação foi realizada em 100 µL de metanol, durante 30 min, à temperatura ambiente e a 90 °C, sob agitação constante (800xg). Após o tempo de incubação, a reação química foi interrompida pela adição de 400 µL de NaCl (0,9%). A radiomarcagem da H2Ac4Ph também foi realizada nas mesmas condições, para avaliar possíveis alterações na eficiência da marcação promovidas pela presença do flúor no grupo fenila da molécula.

4.14 DETERMINAÇÃO DA PUREZA RADIOQUÍMICA DOS COMPOSTOS RADIOMARCADOS

A pureza radioquímica dos compostos radiomarcados foi determinada por CLAE. As análises foram feitas em um cromatógrafo operando com vazão constante de 1 mL.min⁻¹, equipado com um detector de radiação gama e uma coluna de fase reversa Supelco C18 (0,46 x 25 cm). A temperatura da coluna, igual a 25° C, foi mantida constante. Como fase móvel, foi utilizado um gradiente linear de 10 - 80% (v/v) de acetonitrila (CH₃CN) em água (H₂O) contendo TFA 0,1% (v/v) nos primeiros 5 minutos de eluição. Posteriormente, a concentração de CH₃CN foi mantida em 80% (v/v) por 10 minutos e, com o intuito de estabilizar o sistema, retornou-se a condição inicial de 10% (v/v) de CH₃CN durante 5 minutos (método B). Este sistema cromatográfico foi previamente padronizado utilizando as TSC frias como padrão não radioativo e amostras de ¹¹¹InCl₃ e ⁶⁷GaCl₃ como padrões radioativos.

4.15 ANÁLISE DA ESTABILIDADE DOS COMPOSTOS RADIOMARCADOS

A estabilidade dos compostos radiomarcados foi analisada, após incubação a 2-8° C, por 24 h. Após o tempo de incubação, uma alíquota dos compostos foi retirada e analisada

por CLAE, de acordo com metodologia descrita no item 4.14.

4.16 AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO DA H₂Ac₄oFPh-¹¹¹In E H₂Ac₄oFPh-⁶⁷Ga

A biodistribuição da H₂Ac₄oFPh-¹¹¹In e H₂Ac₄oFPh-⁶⁷Ga foi realizada em camundongos *Swiss* machos, por meio da injeção, intravenosa (*i.v.*) caudal, de 10 µCi (0,37 MBq) dos compostos radiomarcados diluídos em NaCl 0,9%. Em diferentes tempos após administração (1, 3, 24 e 48 h), os animais foram eutanasiados e tiveram seus principais órgãos vitais removidos para avaliação do perfil de biodistribuição. A radioatividade em cada órgão foi determinada em aparelho de espectrometria gama tipo poço. Os resultados foram expressos como fração percentual da atividade total injetada por grama do órgão (% Al.g⁻¹).

4.17 AVALIAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA DA H₂Ac₄oFPh-¹¹¹In E H₂Ac₄oFPh-⁶⁷Ga

Para avaliar a farmacocinética da H₂Ac₄oFPh-¹¹¹In e H₂Ac₄oFPh-⁶⁷Ga, 10 µCi (0,37 MBq) de cada composto diluído em NaCl 0,9% (p/v) foram injetados, por via intravenosa (*i.v.*) caudal, em camundongos *Swiss* machos. Em diferentes tempos após administração (2,5 min a 48 h), 50 µL de sangue foram retirados pelo plexo orbital dos camundongos, com o auxílio de um tubo capilar heparinizado, e a radioatividade no sangue foi determinada em aparelho de espectrometria gama tipo poço. Os resultados foram expressos como fração percentual da atividade total injetada por mL de sangue (%Al.mL⁻¹). Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados no GraphPad Prism 5, (GraphPad Software, Inc.), para um modelo de distribuição em dois compartimentos, caracterizado por duas exponenciais: uma de decaimento rápido e outra de decaimento lento.

A depuração (DP) foi calculada pela equação (EQ. 1):

$$DP = \frac{\text{Atividade total administrada}}{ASC} \quad \text{EQ. 1}$$

Onde:

ASC = área sob a curva

O volume de distribuição (Vd) foi calculado pela equação (EQ. 2):

$$Vd = \frac{DP}{\beta} \quad \text{EQ. 2}$$

Onde:

β = constante de eliminação

4.18 ESTUDOS CINTILOGRÁFICOS DA H2Ac4oFPh-¹¹¹In E H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga

Os estudos cintilográficos da H2Ac4oFPh-¹¹¹In e H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga foram realizados em camundongos *Swiss* sadios. Os compostos radiomarcados (50 μ Ci - 1,85 MBq), diluídos em NaCl 0,9%, foram injetados por via intravenosa caudal e as imagens cintilográficas estáticas dos camundongos foram realizadas 30 min, 1, 3 e 24 h após a administração. Para a aquisição das imagens, os animais foram previamente anestesiados. As imagens foram adquiridas em gama câmara, até atingir 200.000 contagens. Estudos cintilográficos do ¹¹¹InCl₃ também foram realizados, nas mesmas condições, com o intuito de avaliar se as imagens obtidas a partir da biodistribuição da H2Ac4oFPh-¹¹¹In se distinguia daquelas obtidas a partir da biodistribuição do radioisótopo livre.

Este protocolo também foi utilizado em estudos cintilográficos da H2Ac4oFPh-¹¹¹In e H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga em modelo animal de tumor cerebral (descrito no item 4.12), 15 dias após o implante das células tumorais. Após os estudos cintilográficos, os animais foram eutanasiados e o tumor, o sangue, e os principais órgãos foram dissecados para quantificação da radioatividade. Os resultados foram expressos como % AI. g⁻¹.

Para avaliar a retenção da H2Ac4oFPh-¹¹¹In no tumor cerebral (U-87MG) *in vivo*, obtendo assim uma estimativa da sua potencialidade para uso em terapia local complexada a emissores de partículas, a TSC radiomarcada foi injetada em modelo animal de tumor, por via intratumoral (*i.t.*), para posterior aquisição de imagens cintilográficas. Após estudos cintilográficos, os animais foram eutanasiados e o tumor, o sangue, e os principais órgãos foram dissecados para quantificação da radioatividade (% AI.g⁻¹).

4.19 CARACTERIZAÇÃO ADICIONAL DA H2Ac4oFPh-¹¹¹In

4.19.1 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

Para avaliar a lipossolubilidade da H2Ac4oFPh-¹¹¹In, seu coeficiente de partição foi determinado (Prata et al., 2000). A molécula marcada foi adicionada (100 µCi - 3,7MBq) em um tubo contendo 1 mL de n-octanol (fase orgânica) e 1 mL de solução salina 0,9% (fase aquosa), pré-saturados por 24 h. O tubo foi submetido à agitação, por uma hora à temperatura ambiente e, após a separação das fases aquosa e orgânica, uma alíquota de cada fase foi coletada para análise em um aparelho de espectrometria gama tipo poço. O coeficiente de partição ($\rho = \log P$) foi determinado pela equação (EQ. 3):

$$\rho = \log_{10} \frac{\text{cpm na fase orgânica}}{\text{cpm na fase aquosa}} \quad \text{EQ. 3}$$

4.19.2 DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO EM SORO HUMANO *IN VITRO*

Para determinar o comportamento da H2Ac4oFPh-¹¹¹In em soro humano, 100 µCi (3,7 MBq) do composto foram incubados em 1 mL de soro humano, a 37 °C, sob agitação de 400 xg, por 10 e 30 min, 1, 3 e 24 h. Após o tempo de incubação, 1 mL de etanol foi adicionado à mistura, para precipitação de proteínas. A mistura foi, então, centrifugada a 10000xg durante 10 minutos, e a radioatividade presente no sobrenadante e no precipitado foi determinada em um aparelho de espectrometria gama tipo poço. A porcentagem da H2Ac4oFPh-¹¹¹In ligada às proteínas séricas (LP) foi determinada pela equação (EQ. 4):

$$LP (\%) = \frac{\text{cpm no precipitado}}{\text{cpm no sobrenadante} + \text{cpm no precipitado}} \times 100 \quad \text{EQ. 4}$$

Após quantificação da radioatividade, o sobrenadante foi filtrado em membrana 0,22 µm e analisado por CLAE, de acordo com metodologia descrita em 4.14.

4.19.3 ESTUDO DE INTERNALIZAÇÃO *IN VITRO*

Ensaio de internalização, *in vitro*, são comumente utilizados com o intuito de prever a eficácia de um novo radiofármaco, pois permitem quantificar a sua retenção em uma célula alvo (Naqvi et al., 2011). Para avaliar a capacidade de internalização da H2Ac4oFPh-¹¹¹In em células tumorais *in vitro*, células U-87MG foram semeadas em placas de seis poços ($2,5 \times 10^5$ células por poço) e cultivadas, de acordo com metodologia descrita no item 4.3, por 48 h. Posteriormente, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com meio de internalização (DMEM sem SFB). Após a lavagem, 1 mL de meio de internalização foi adicionado em cada poço, seguido da adição, de 100 μ Ci (3,7 Mbq) de H2Ac4oFPh-¹¹¹In (ligação total) ou 100 μ Ci (3,7 Mbq) de H2Ac4oFPh-¹¹¹In e um excesso molar (100x) de H2Ac4oFPh fria (ligação não-específica). As células foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 10 e 30 min, 1, 2 ou 4 h. Ao final de cada tempo, as células foram lavadas duas vezes com meio de internalização, e incubadas com 1 mL de tampão glicina 50 mM / NaCl 0,1 M, pH 2,8 por 5 minutos, seguido de lavagem rápida com a mesma solução. Para análise da internalização, as células foram lisadas, com 1 mL de NaOH 1 M, para quantificação da radioatividade e determinação fração internalizada. A radioatividade presente foi quantificada em aparelho de espectrometria gama tipo poço. A porcentagem de internalização foi calculada em função do total de radioatividade adicionado em cada ponto experimental.

4.20 ANÁLISE DOS DADOS

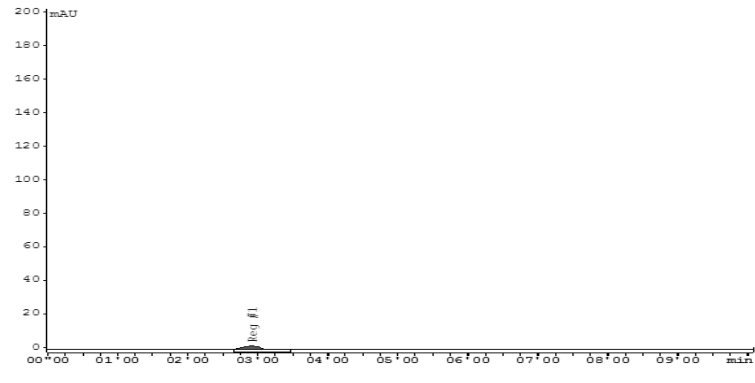
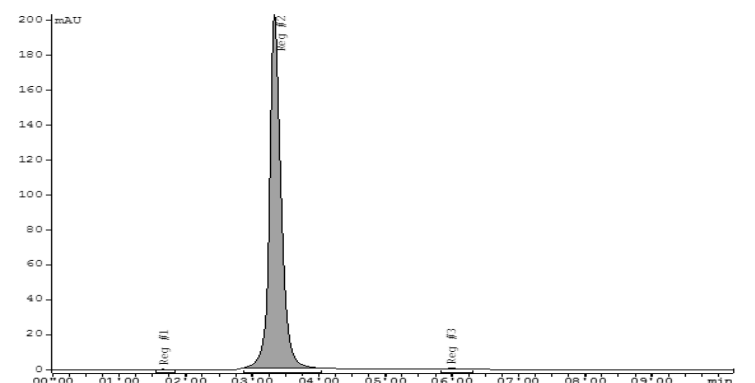
Os testes *in vitro* foram realizados em três experimentos independentes, em triplicatas, inclusive os respectivos grupos controle. Os dados obtidos, *in vitro* ou *in vivo*, foram analisados pelo teste t de Student ou ANOVA, de acordo com cada experimento. Foram considerados significativos aqueles dados com $p < 0,05$.

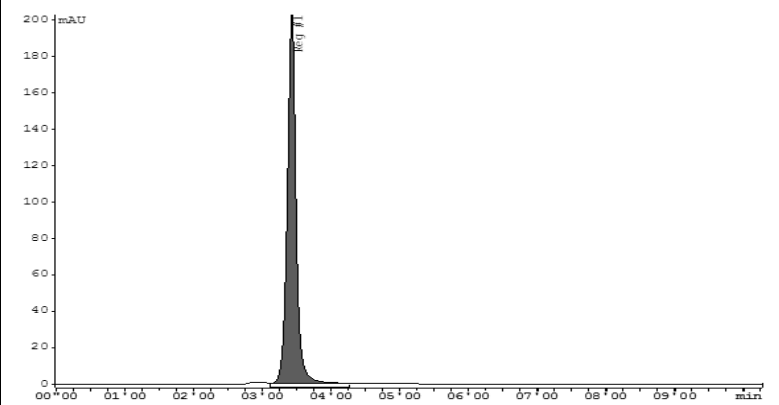
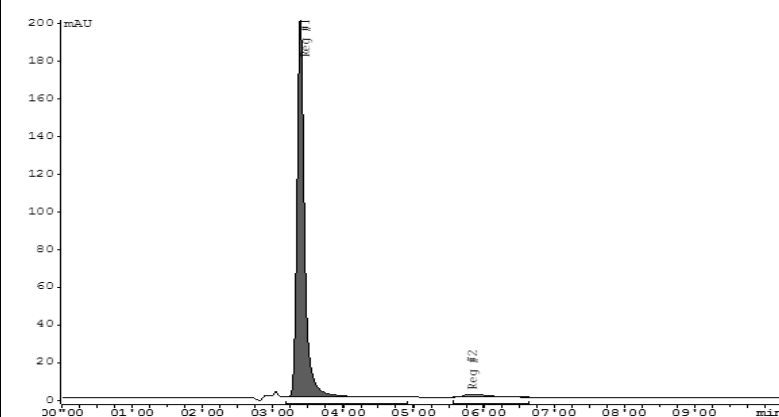
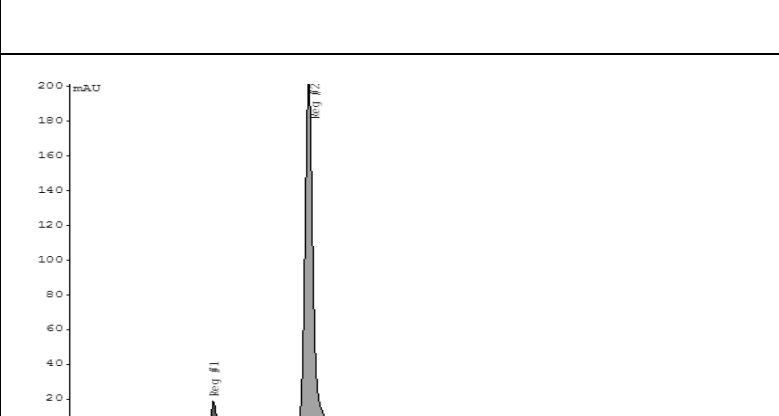
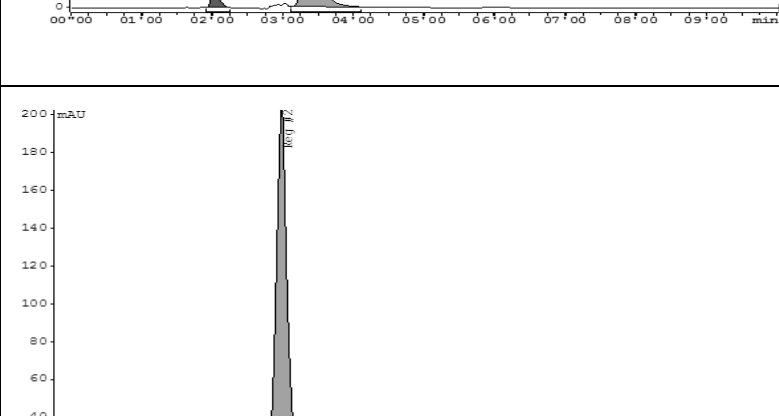
5

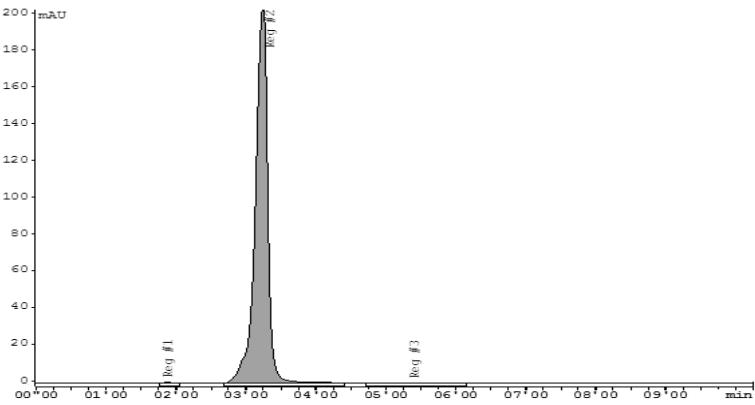
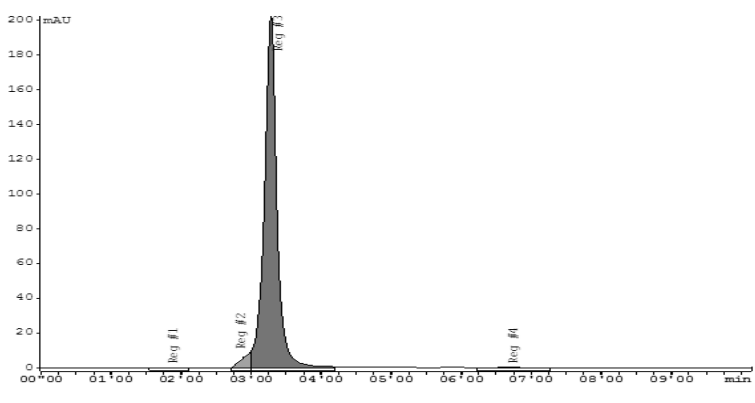
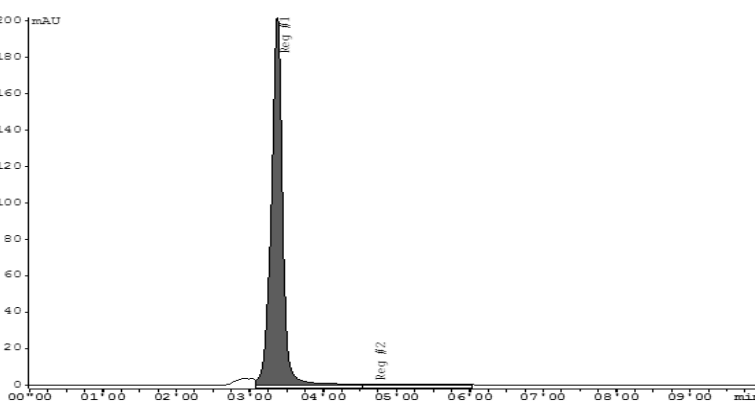
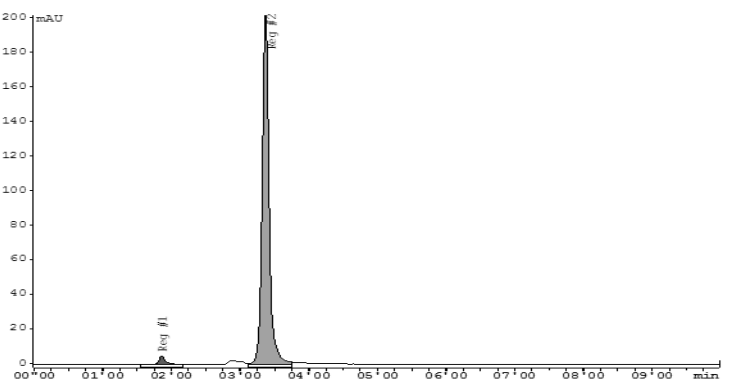
RESULTADOS

5.1 TIOSSEMICARBAZONAS

Para atestar a pureza química dos derivados de 2-acetilpiridina N-4 fenil TSC, foi realizada a análise de cada uma delas por CLAE. Os resultados obtidos demonstraram que todas as TSC apresentaram pureza química (PQ) maior que 90% (FIG. 11).

 <p>The chromatogram displays a single, very sharp peak at a retention time of 3'55". The y-axis represents intensity in mAU, ranging from 0 to 200. The x-axis represents time in minutes, ranging from 00'00" to 09'00". The peak is labeled 'Ret. #1'.</p>	<p>Composto: Solvente Tempo de retenção (TR): 2'55''</p>
 <p>The chromatogram shows a major peak at 3'20" and two minor peaks at 02'00" and 06'00". The y-axis is mAU (0-200) and the x-axis is minutes (00'00"-09'00"). The main peak is labeled 'Ret. #2', the first minor peak is 'Ret. #1', and the second is 'Ret. #3'.</p>	<p>Composto: H2Ac4Ph TR: 3'20'' PQ (%): 99,67%</p>

	Composto: H2Ac4oClPh TR: 3'20'' PQ (%): 99,67%
	Composto: H2Ac4mClPh TR: 3'24'' PQ (%): 97,37%
	Composto: H2Ac4pClPh TR: 3'22'' PQ (%): 94,08%
	Composto: H2Ac4oFPh TR: 3'16'' PQ (%): 96,73%

 <p>Chromatogram showing a single sharp peak at 3'14" (Retention Time) with a purity of 99,85%. The y-axis is labeled mAU (0 to 200) and the x-axis is labeled min (00'00 to 09'00).</p>	<p>Composto: H2Ac4mFPh TR: 3'14" PQ (%): 99,85%</p>
 <p>Chromatogram showing a single sharp peak at 3'17" (Retention Time) with a purity of 96,75%. The y-axis is labeled mAU (0 to 200) and the x-axis is labeled min (00'00 to 09'00).</p>	<p>Composto: H2Ac4pFPh TR: 3'17" PQ (%): 96,75%</p>
 <p>Chromatogram showing a single sharp peak at 3'23" (Retention Time) with a purity of 98,33%. The y-axis is labeled mAU (0 to 200) and the x-axis is labeled min (00'00 to 09'00).</p>	<p>Composto: H2Ac4oIPh TR: 3'23" PQ (%): 98,33%</p>
 <p>Chromatogram showing a single sharp peak at 3'22" (Retention Time) with a purity of 97,84%. The y-axis is labeled mAU (0 to 200) and the x-axis is labeled min (00'00 to 09'00).</p>	<p>Composto: H2Ac4mIPh TR: 3'22" PQ (%): 97,84%</p>

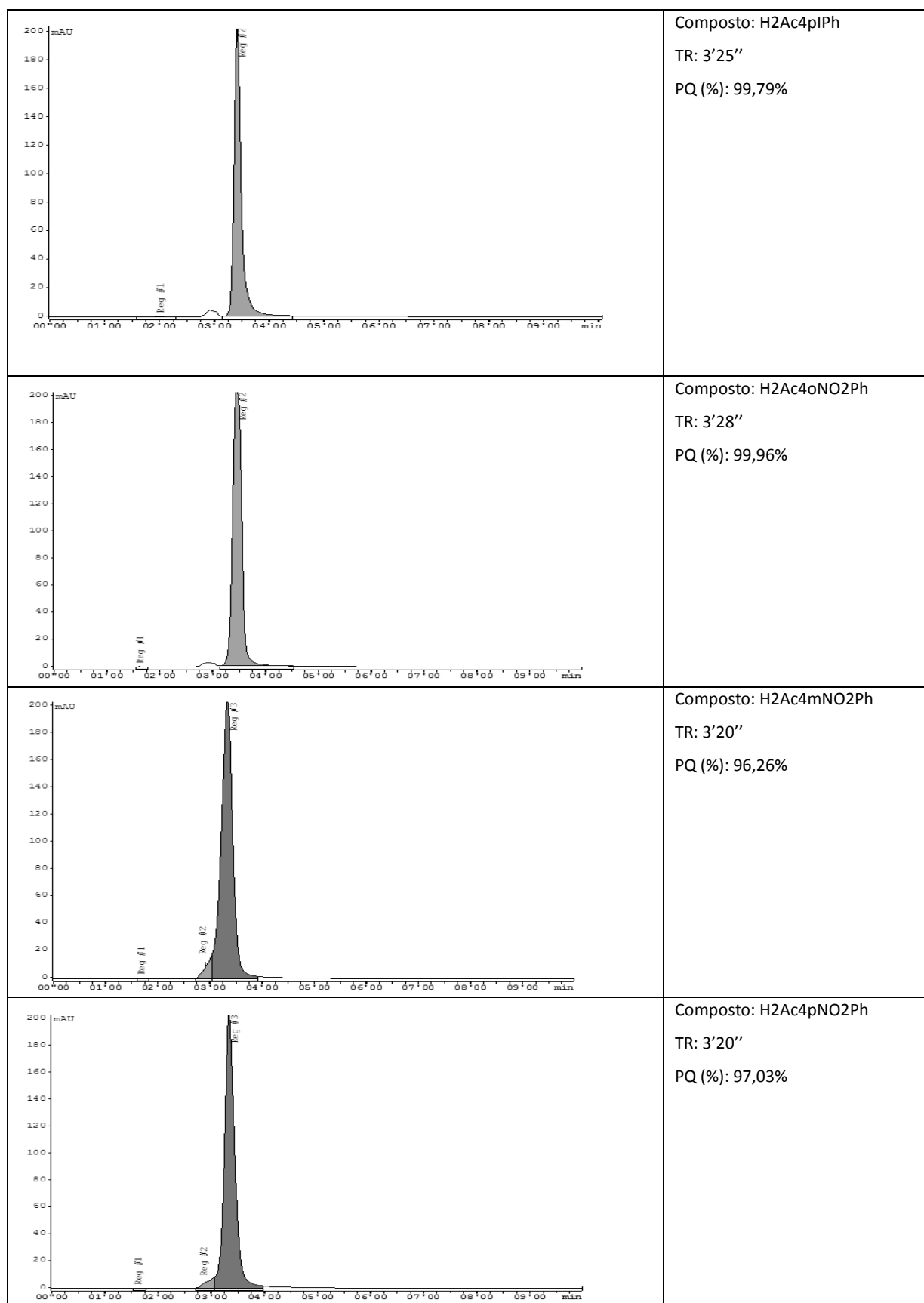


FIGURA 11: Análise da pureza química dos derivados de 2-acetilpiridina N-4 fenil TSC por CLAE (UV-Vis- método A).

5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO

A avaliação do efeito citotóxico das TSC em células tumorais foi feita pela medida da sobrevivência das células tratadas, por meio do teste MTT. Os resultados obtidos evidenciaram que todas as TSC testadas foram citotóxicas de forma dose-dependente para as três linhagens de células tumorais utilizadas (FIG. 12). As concentrações, de cada composto, capazes de inibir em 50% a sobrevivência celular (IC_{50}) estão representadas na TAB. 4 e demonstraram que as TSC mais potentes apresentam IC_{50} na ordem de nanomolar. Além disso, todas as TSC foram significativamente mais potentes do que o etoposídeo, um antineoplásico inibidor da enzima topoisomerase II bastante utilizado na clínica médica.

A linhagem de tumor de mama apresentou maior sensibilidade à grande maioria dos compostos, quando comparada com as duas linhagens de glioblastoma. No entanto, não foi observada diferença significativa na taxa de sobrevivência das células U-87MG e T98-G tratadas.

Apesar de, na maioria dos casos, a inserção dos halogênios ou do nitro no grupo fenila da TSC não ter contribuído para o aumento da citotoxicidade do composto não substituído (H2Ac4Ph), em alguns casos, a inserção do halogênio na posição orto do grupo fenila promoveu citotoxicidade significativamente maior àquela induzida pela H2Ac4Ph. Tal fato pode ser comprovado observando os valores de IC_{50} da H2Ac4oClPh e H2Ac4oFPh em células T98-G, e sugere que a adição de cloro ou flúor na posição orto do grupo fenila é uma boa estratégia para aumentar a citotoxicidade de H2Ac4Ph. Para as demais linhagens de células tumorais, H2Ac4oClPh e H2Ac4oFPh foram tão eficientes quanto H2Ac4Ph.

Quando comparadas apenas as TSC com grupos substituídos (com halogênio ou nitro no grupo fenila) foi possível concluir que, em geral, os compostos que possuem o halogênio na posição orto foram mais potentes do que seus respectivos isômeros com halogênio na posição meta ou para do grupo fenila. O composto que possui o nitro na posição para foi o menos potente dentre todos os compostos testados.

A citotoxicidade das TSC também foi avaliada em eritrócitos, por meio do teste de hemólise. Os resultados obtidos demonstraram que as TSC não induziram hemólise em concentrações menores que 10000 nM.

TABELA 4: Análise comparativa do efeito citotóxico das diferentes TSC. IC₅₀ sobre células U-87MG, T98-G e MCF-7 e avaliação da atividade hemolítica.

Composto	IC ₅₀ (nM) ^a			Atividade Hemolítica ^b
	U-87MG	T98-G	MCF-7	
H2Ac4Ph	1,40 ± 0,39	6,80 ± 0,83	0,18 ± 0,06	> 10000
H2Ac4oCIPh	2,60 ± 2,10	1,10 ± 0,96	0,16 ± 0,14	> 10000
H2Ac4mCIPh	31,00 ± 9,60	1,00 ± 0,40	24,00 ± 1,50	> 10000
H2Ac4pCIPh	1,70 ± 0,82	5,90 ± 0,76	8,50 ± 0,40	> 10000
H2Ac4oFPh	5,00 ± 0,47	3,10 ± 2,20	0,39 ± 0,20	> 10000
H2Ac4mFPh	18,00 ± 1,70	12,00 ± 5,40	9,00 ± 2,00	> 10000
H2Ac4pFPh	10,00 ± 10,00	17,00 ± 1,90	1,20 ± 0,73	> 10000
H2Ac4oIPh	6,10 ± 2,10	8,10 ± 4,20	4,10 ± 1,90	> 10000
H2Ac4mIPh	84,00 ± 10,00	61,00 ± 25,00	45,00 ± 37,00	> 10000
H2Ac4pIPh	59,00 ± 37,00	64,00 ± 36,00	6,60 ± 3,20	> 10000
H2Ac4oNO ₂ Ph	4,30 ± 0,82	6,60 ± 3,30	5,70 ± 0,19	> 10000
H2Ac4mNO ₂ Ph	69,00 ± 7,10	140,00 ± 110,00	38,00 ± 32,00	> 10000
H2Ac4pNO ₂ Ph	160,00 ± 56,00	140,00 ± 11,00	52,00 ± 21,00	> 10000
Etoposideo	620,00 ± 150,00	460,00 ± 25,00	480,00 ± 70,00	-

^aDeterminado pelo teste do MTT

^bDeterminado pelo teste de hemólise

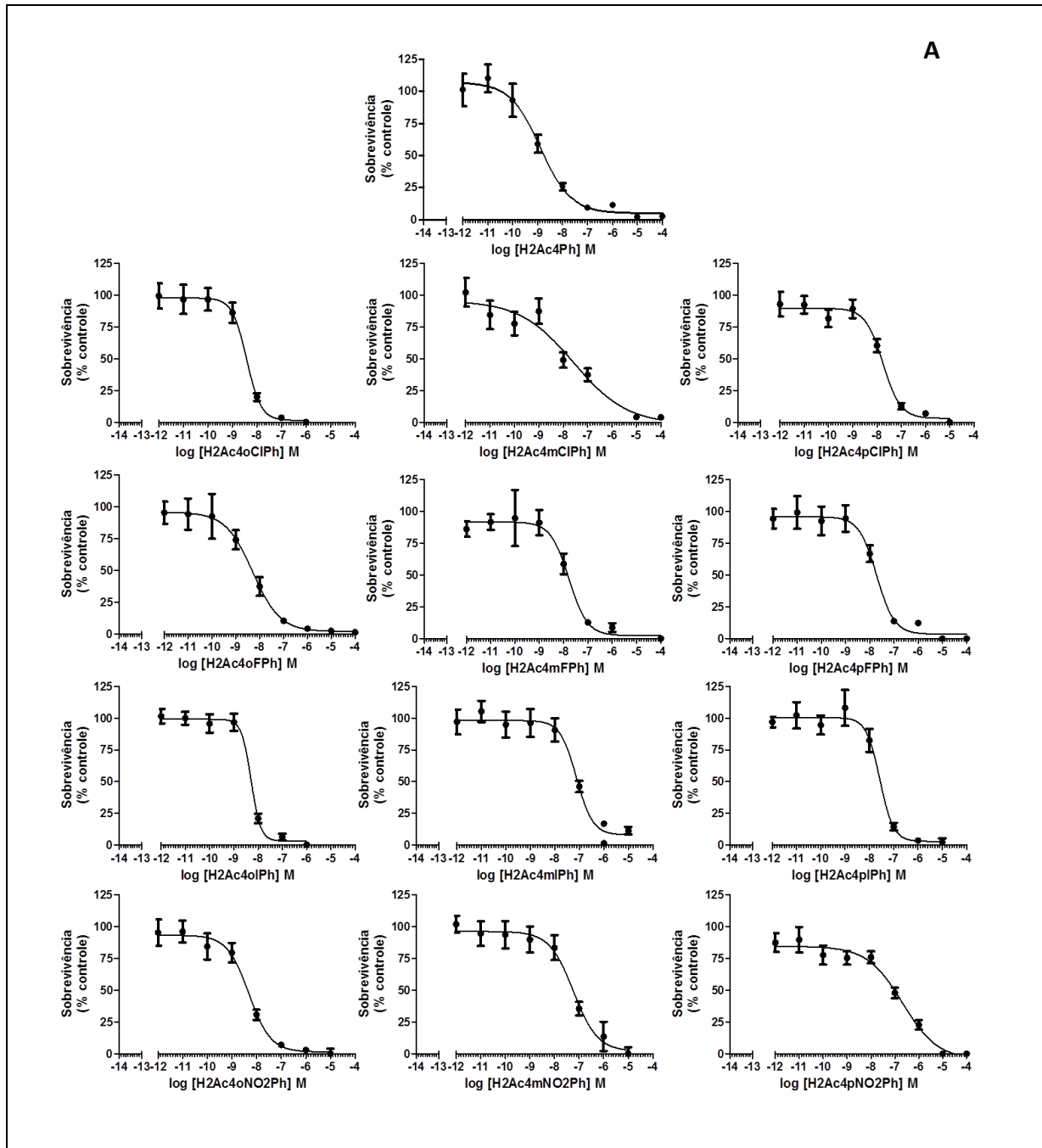


FIGURA 12: Efeito citotóxico das diferentes TSC sobre células U-87MG (A), T98-G (B) e MCF-7 (C). Células tumorais foram tratadas com diferentes concentrações das TSC. A citotoxicidade foi avaliada, após 48 horas, pela medida da taxa de sobrevivência das células tratadas, por meio do teste do MTT.

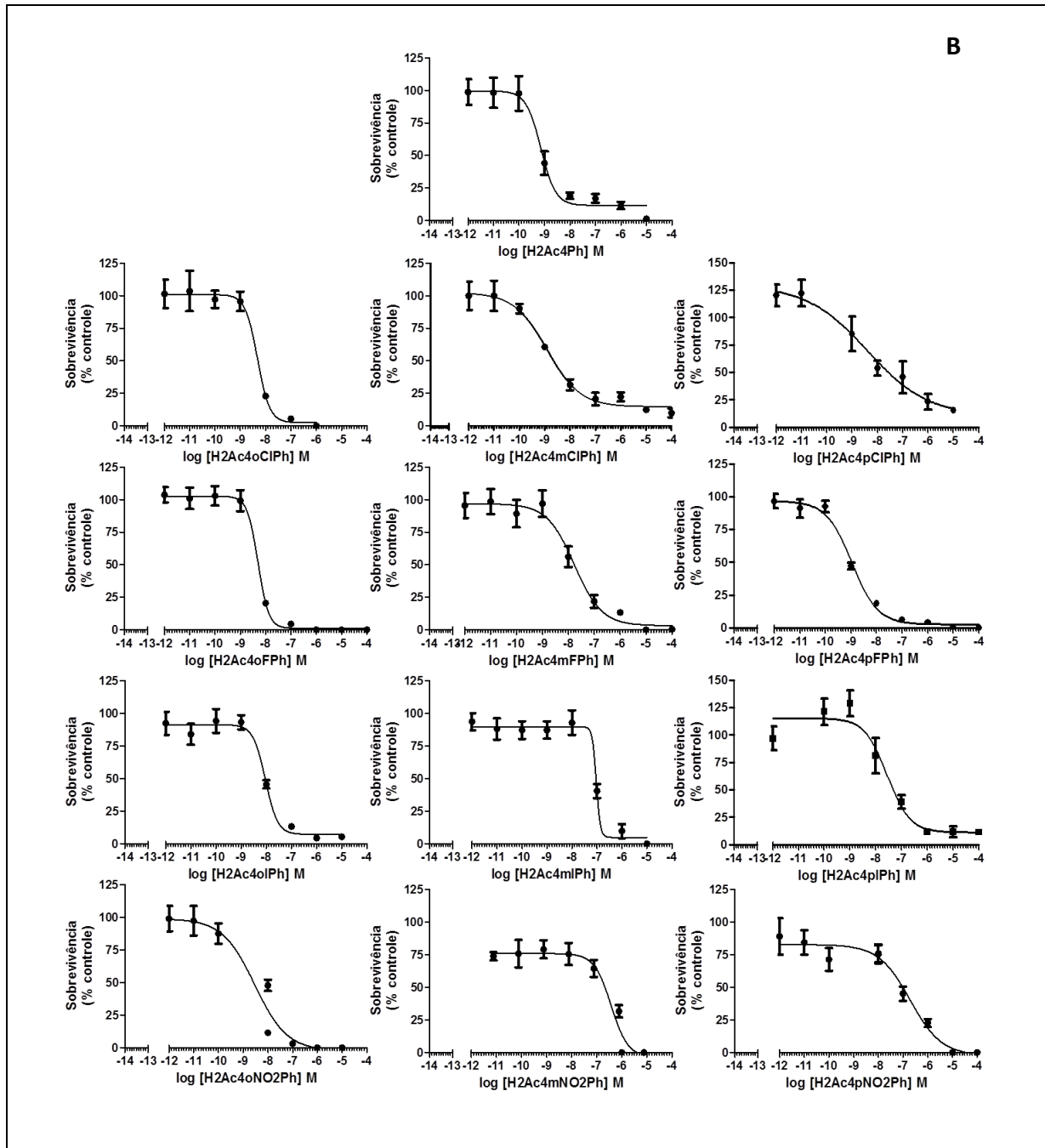


FIGURA 12: continuação.

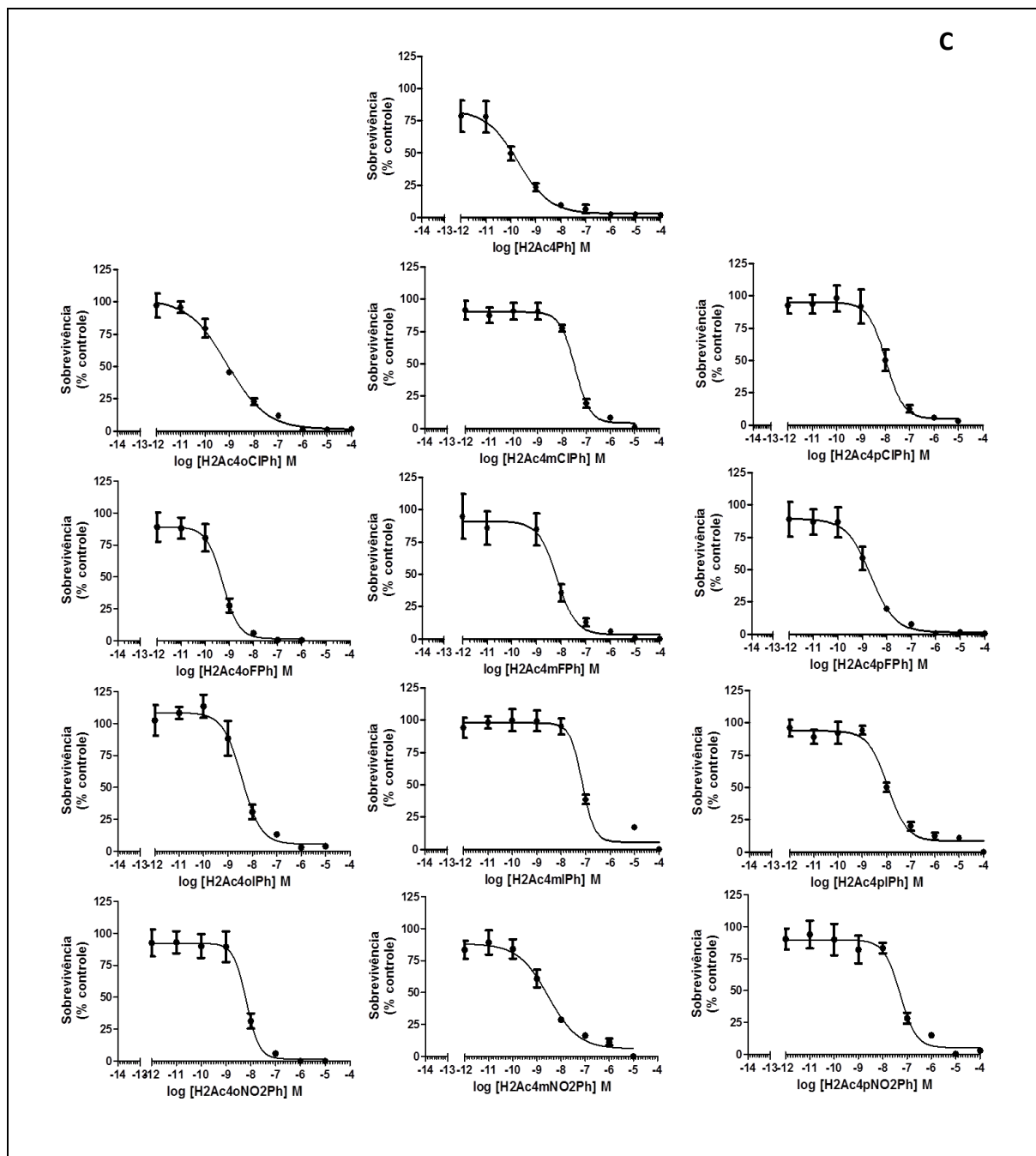


FIGURA 12: continuação.

5.3 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Todas as linhagens celulares tratadas com TSC apresentaram alterações morfológicas bastante visíveis tais como: irregularidades na membrana plasmática, redução do volume citoplasmático e formação de *blebs*, todas características de apoptose (FIG. 13). Este resultado é indicativo de que a redução do número de células vivas, após o tratamento com TSC, ocorreu por meio da indução da apoptose, que poderá ser confirmada pelas análises das alterações morfológicas no DNA cromossomal, da coloração dupla com laranja de acridina/brometo de etídio e da coloração dupla com anexina V e iodeto de propídeo.

5.4 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO DNA CROMOSSOMAL

A análise do DNA cromossomal das células tumorais tratadas demonstrou que as TSC também promoveram alterações morfológicas no DNA cromossomal características de apoptose como: condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos (FIG. 14).

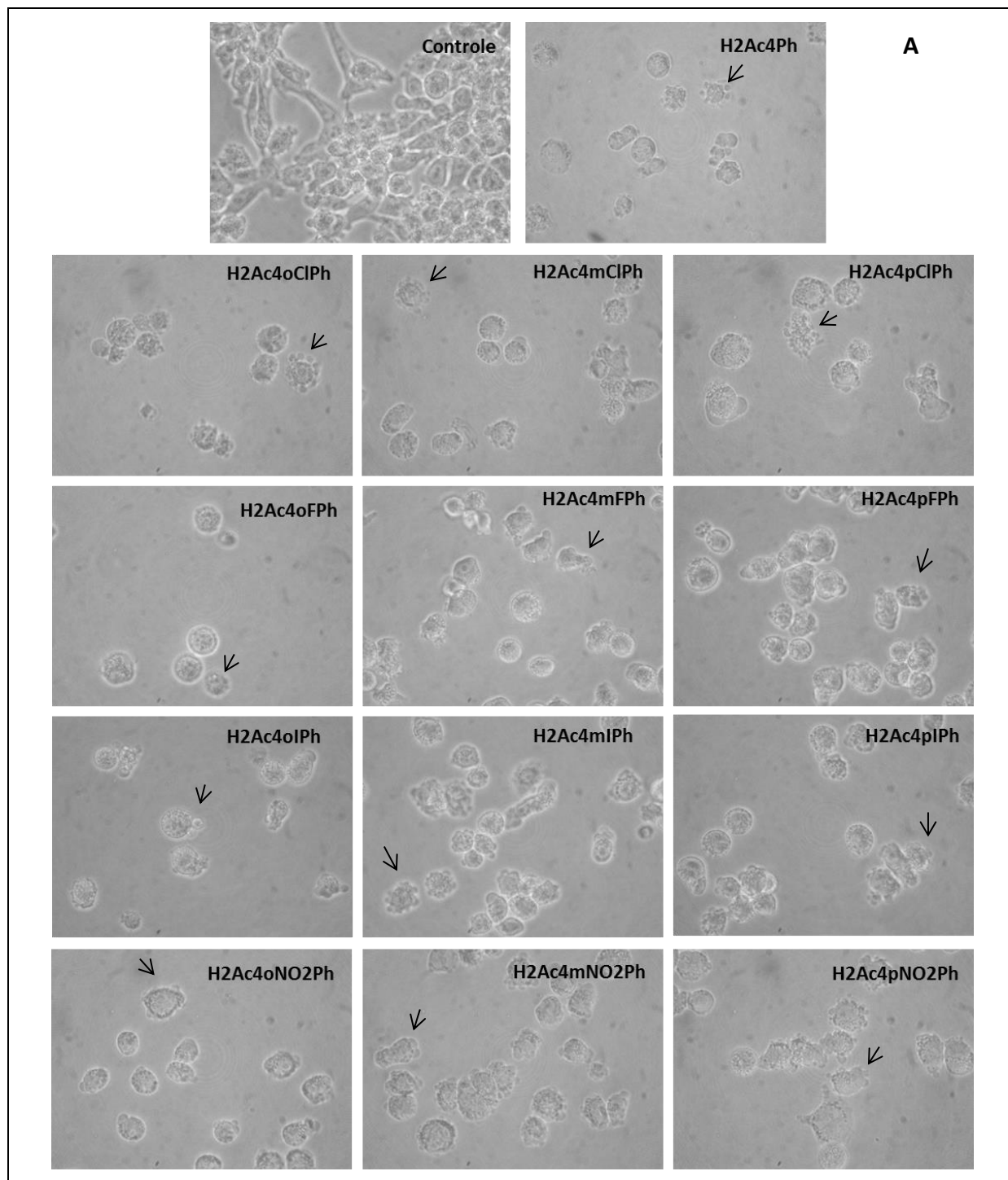


FIGURA 13: Análise morfológica das células U-87MG (A), T98-G (B) e MCF-7 (C) controles e tratadas com TSC. Células tumorais foram tratadas, por 48 h, com as TSC (1 μ M). Imagens foram adquiridas em câmera fotográfica acoplada ao M.O. (aumento de 200x). Setas indicam irregularidades na membrana plasmática, redução do volume citoplasmático ou formação de *blebs*.

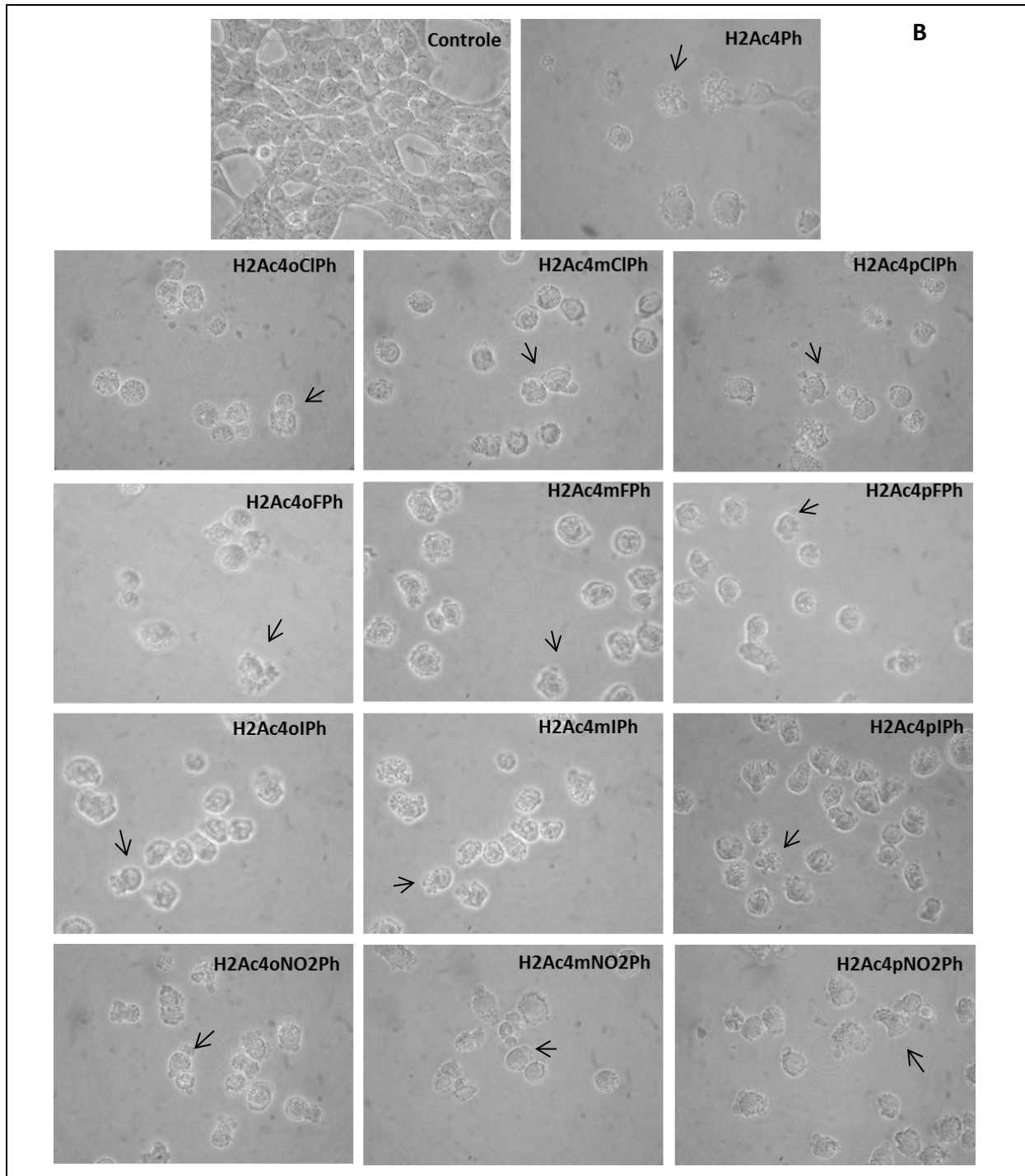


FIGURA 13: continuação.

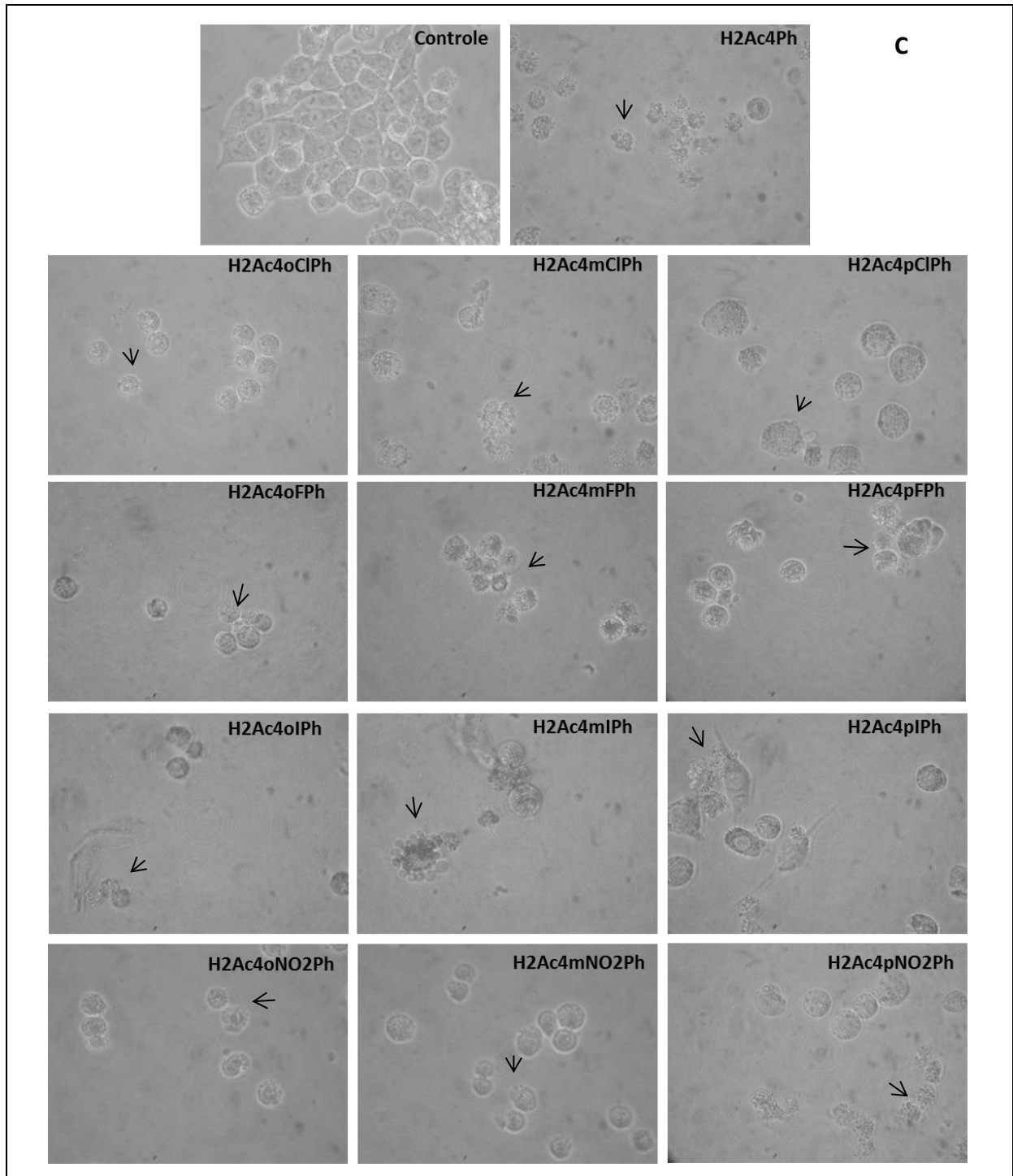


FIGURA 13: continuação.

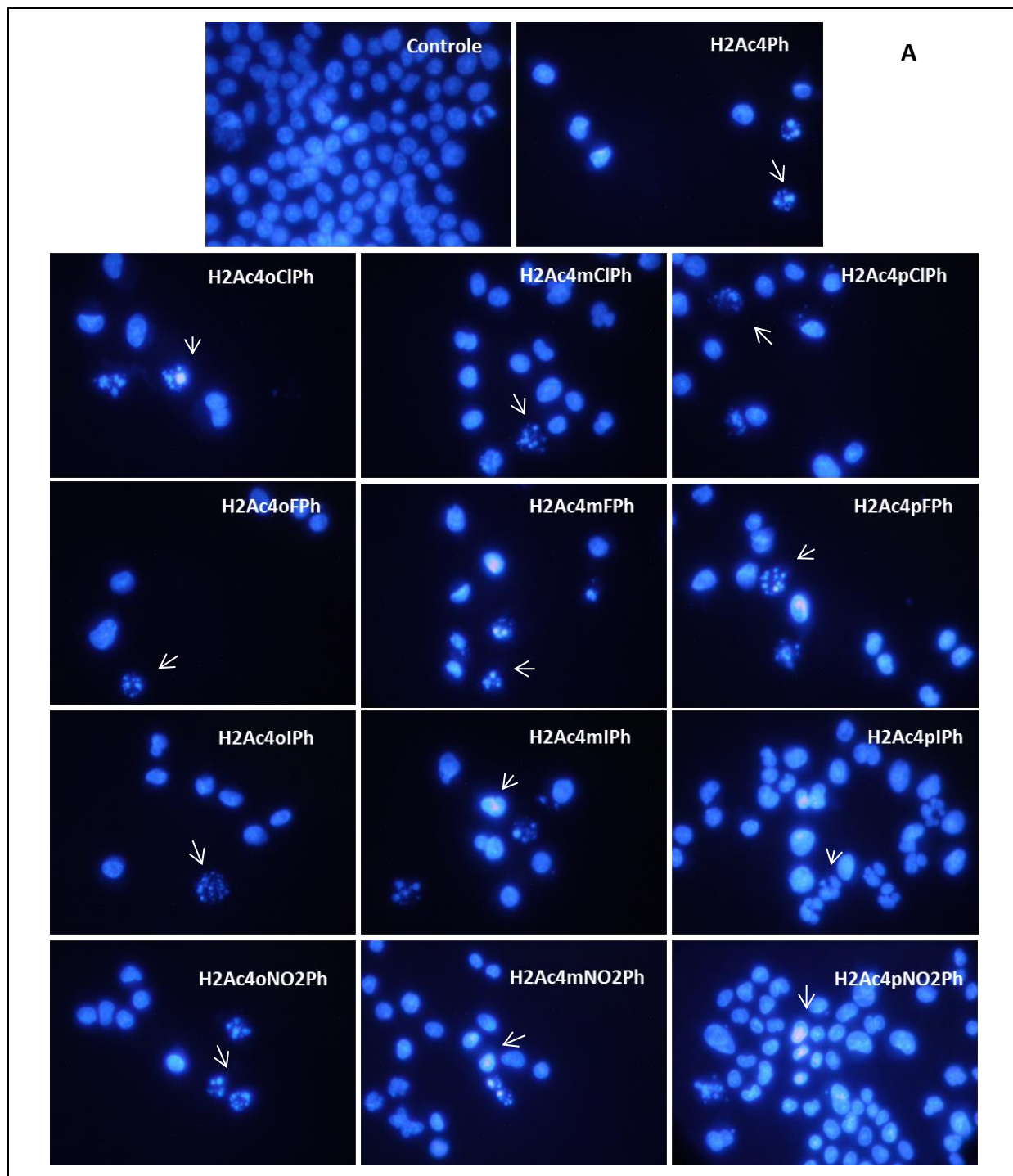


FIGURA 14: Análise do DNA cromossomal das células U-87MG (A), T98-G (B) e MCF-7 (C) controles e tratadas com TSC. Células tumorais foram tratadas, por 48 h, com as TSC (1 μ M) e coradas com DAPI. Imagens foram adquiridas em câmera fotográfica acoplada ao M.F. (385 – 410 nm - aumento de 400x). Setas indicam condensação da cromatina, fragmentação do DNA ou formação de corpos apoptóticos.

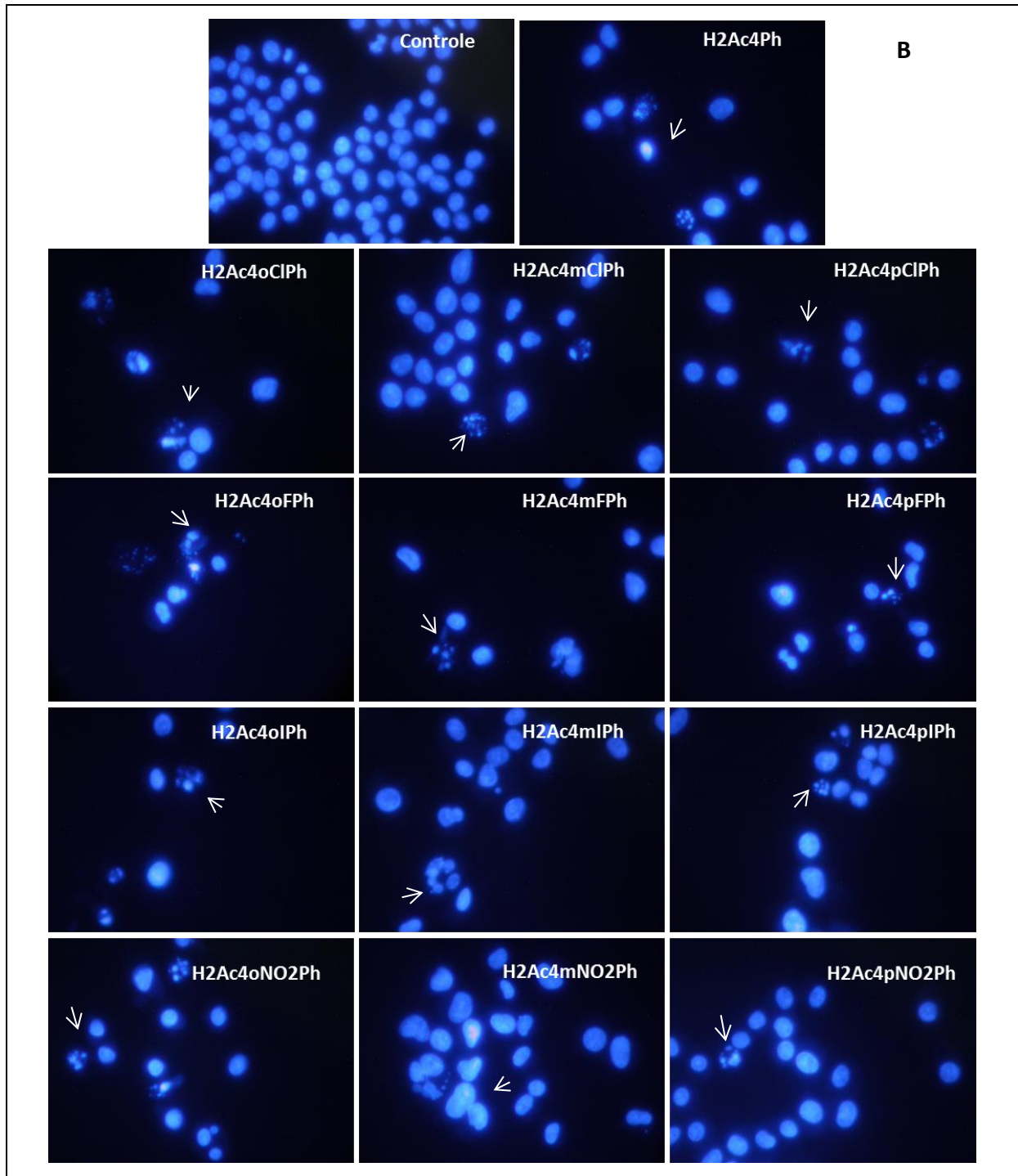


FIGURA 14: continuação.

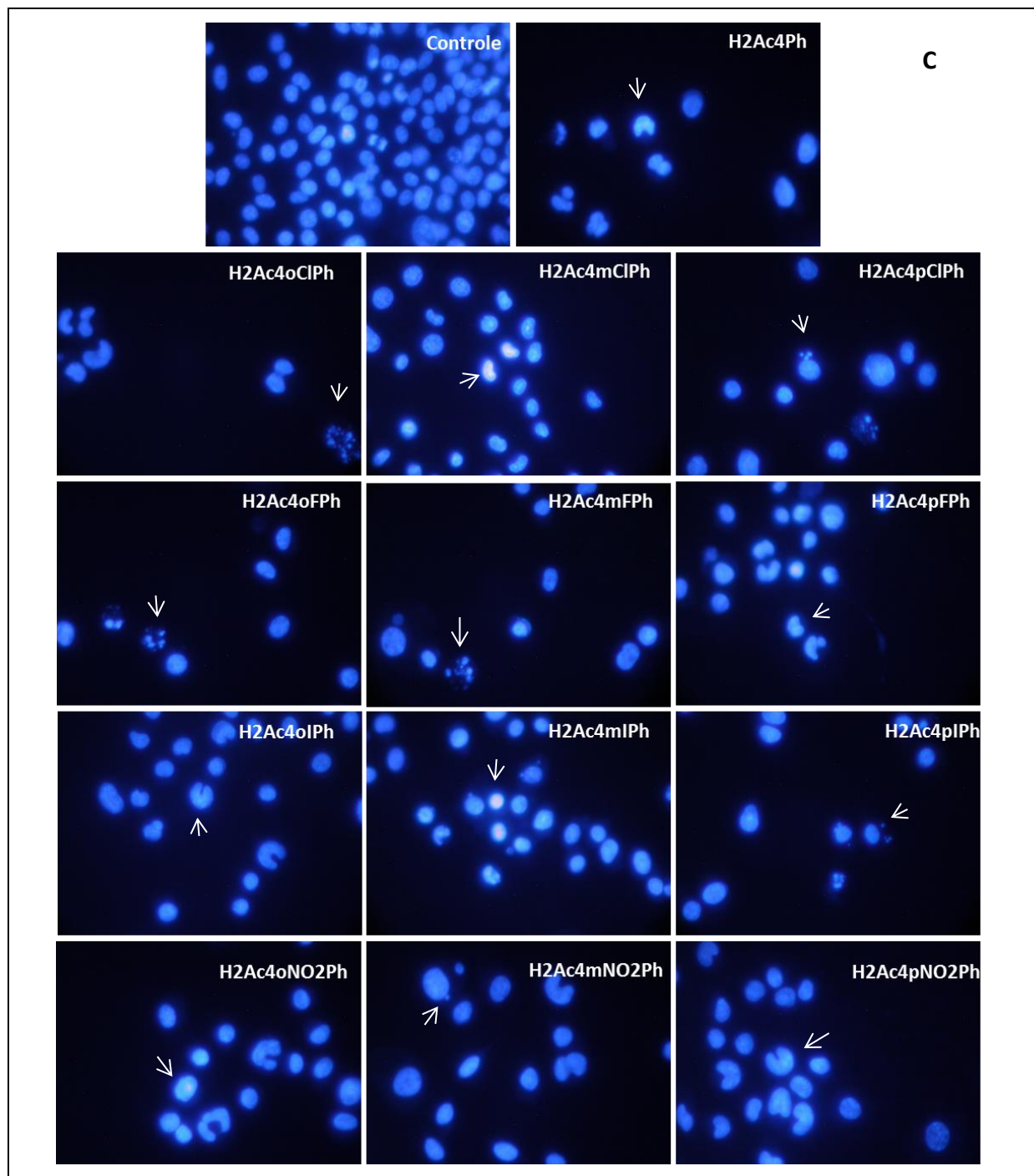


FIGURA 14: continuação.

5.5 DETERMINAÇÃO DO TIPO DE MORTE INDUZIDA

A coloração dupla com laranja de acridina e brometo de etídio (LA/BE) foi utilizada, nas células tumorais controle e tratadas com TSC, para diferenciar células vivas de células apoptóticas e necróticas. Células tumorais controle, coradas com LA/BE, apresentaram

núcleo com coloração verde homogênea e mínima coloração vermelho-alaranjada, indicando a presença de células saudáveis e sem alterações morfológicas. Por outro lado, as células tumorais tratadas com TSC apresentaram núcleo fragmentado, com pontos verdes brilhantes, indicativos de condensação da cromatina, e não apresentaram coloração positiva para o BE indicando que elas permaneceram com a membrana íntegra. Estas alterações são características da fase inicial da apoptose e estão de acordo com os resultados obtidos na análise da morfologia e do DNA cromossomal das células tratadas, indicando que as TSC induzem morte apoptótica das células tumorais.

Foi possível observar também, que as células tratadas com TSC apresentaram compartimentos citoplasmáticos ácidos (corados em laranja) indicando a presença de autofagolisossomos, organelas encontradas no citoplasma celular durante o processo de morte autofágica (FIG. 15).

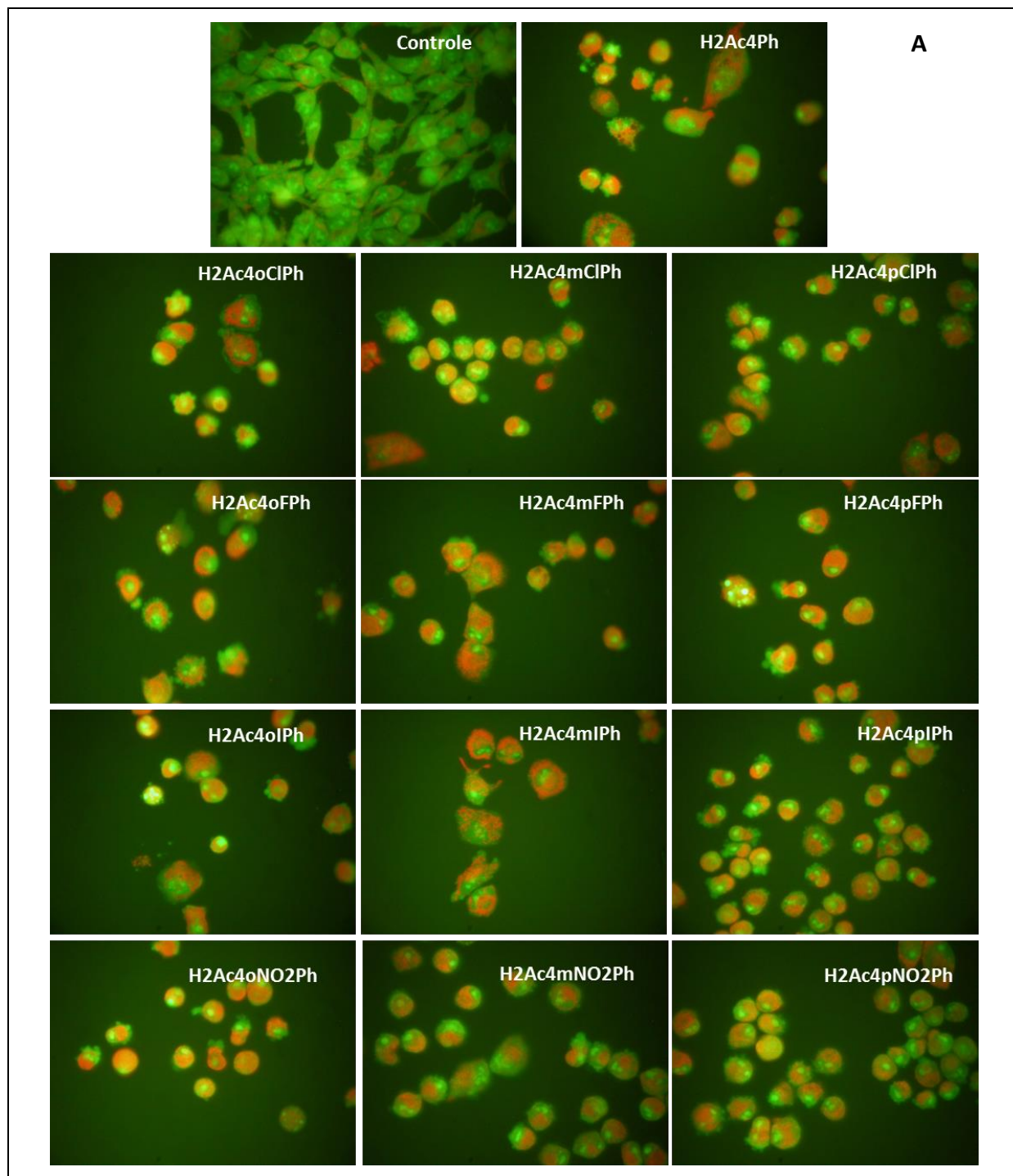


FIGURA 15: Determinação do tipo de morte induzida pelas TSC em células U-87MG (A), T98-G (B) e MCF-7 (C), utilizando LA/BE. Células tumorais foram tratadas, por 48h, com as TSC (1 μ M) e coradas com LA/BE. Imagens foram adquiridas em câmera fotográfica acoplada ao M.F. (530 - 650 nm - aumento de 200x).

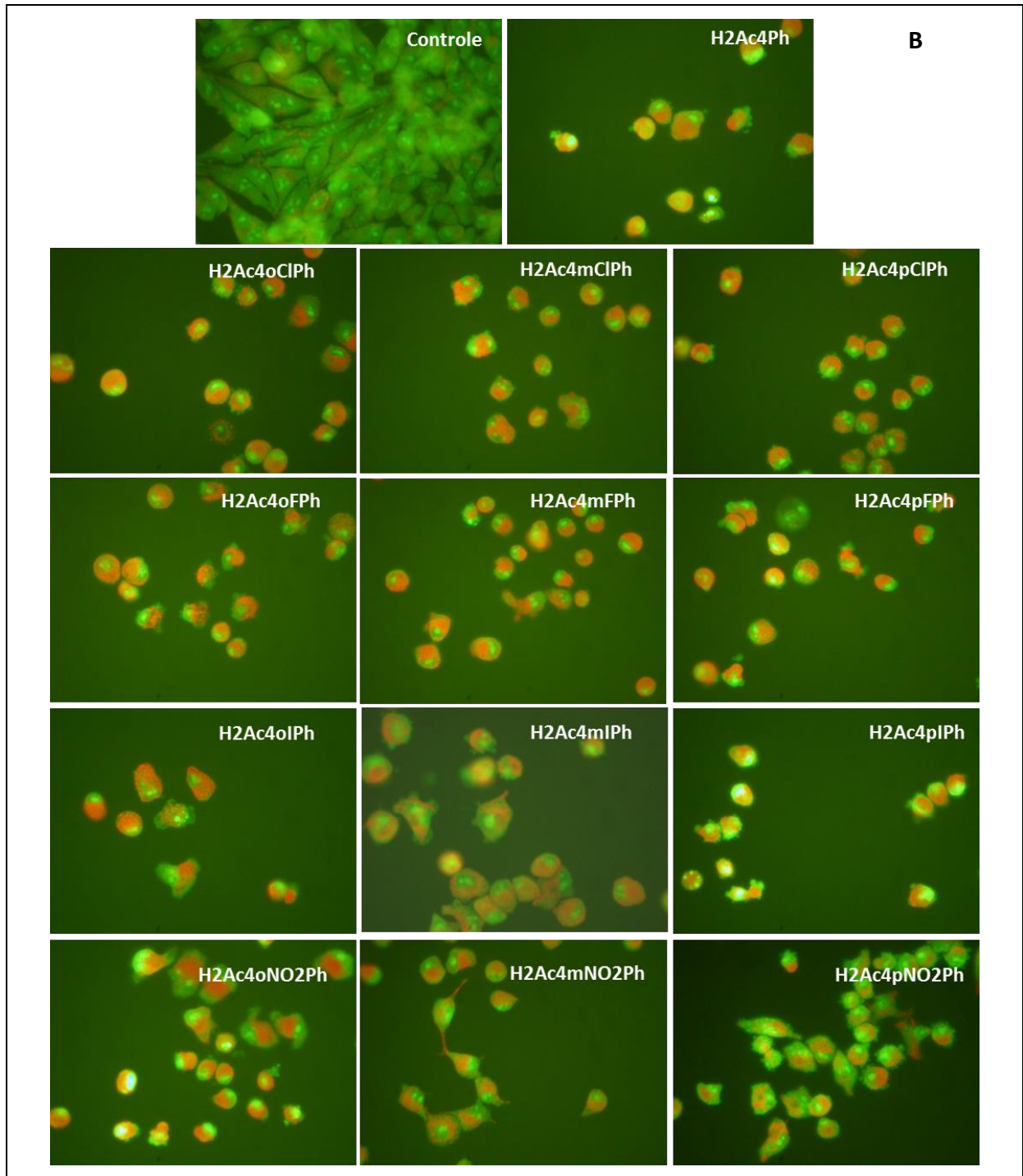


FIGURA 15: continuação.

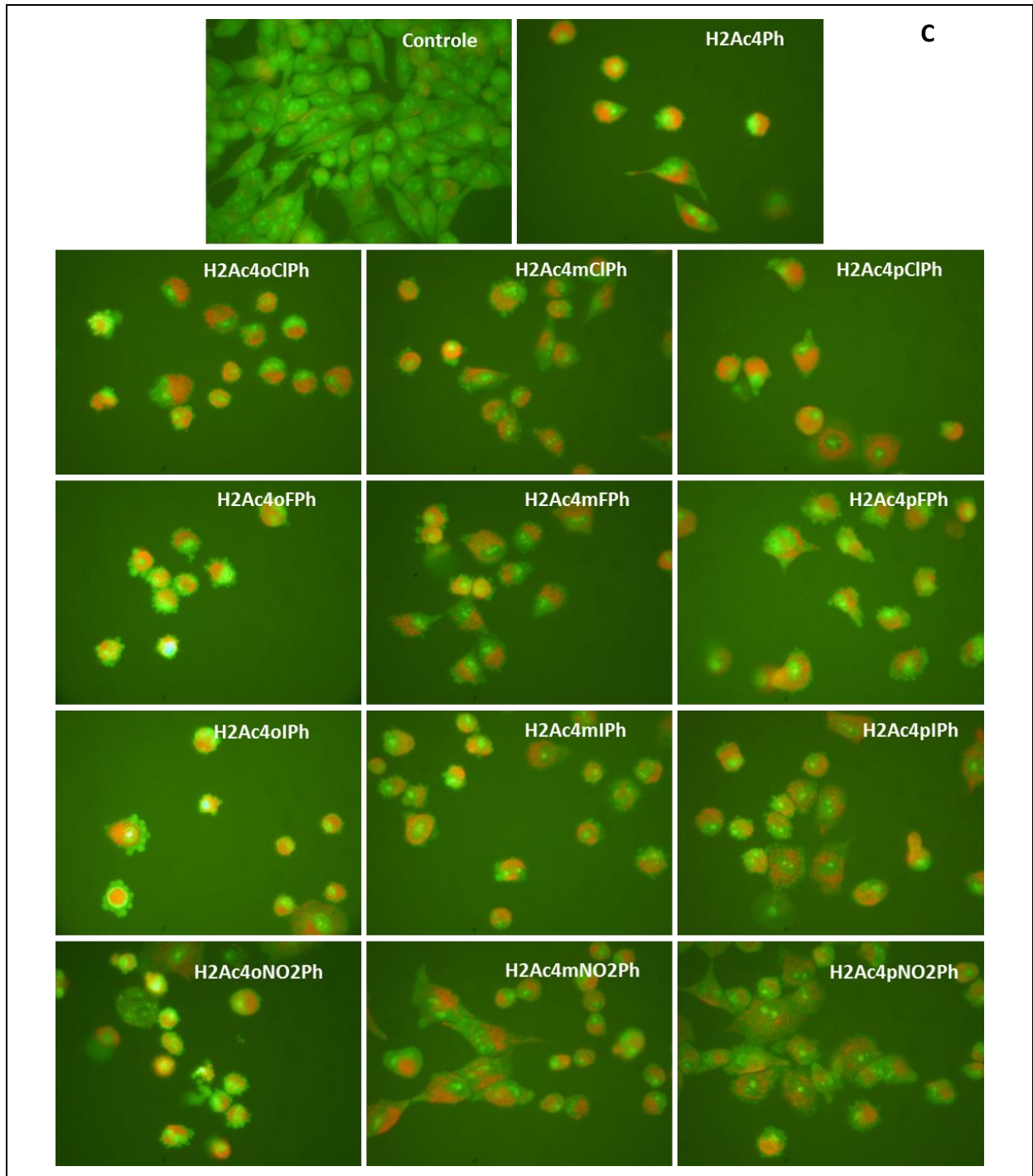


FIGURA 15: continuação.

A coloração com anexina V e iodeto de propídeo também foi realizado em células U-87MG, para confirmar a indução de morte apoptótica. Células U-87MG controle apresentaram coloração negativa tanto para a anexina V quanto para o IP, indicando a presença de células viáveis. No entanto, em células U-87MG tratadas com 1 μ M de H2Ac4oFPh, foi possível detectar grande número de células em apoptose inicial e número reduzido de células em apoptose tardia, após 3 h de tratamento. Quando a concentração de H2Ac4oFPh foi aumentada para 10 μ M, foram detectadas, já após 1 hora de tratamento, células em apoptose inicial e em apoptose tardia e, após 3h de tratamento, a maioria das células já se encontrava em apoptose tardia (FIG. 16).

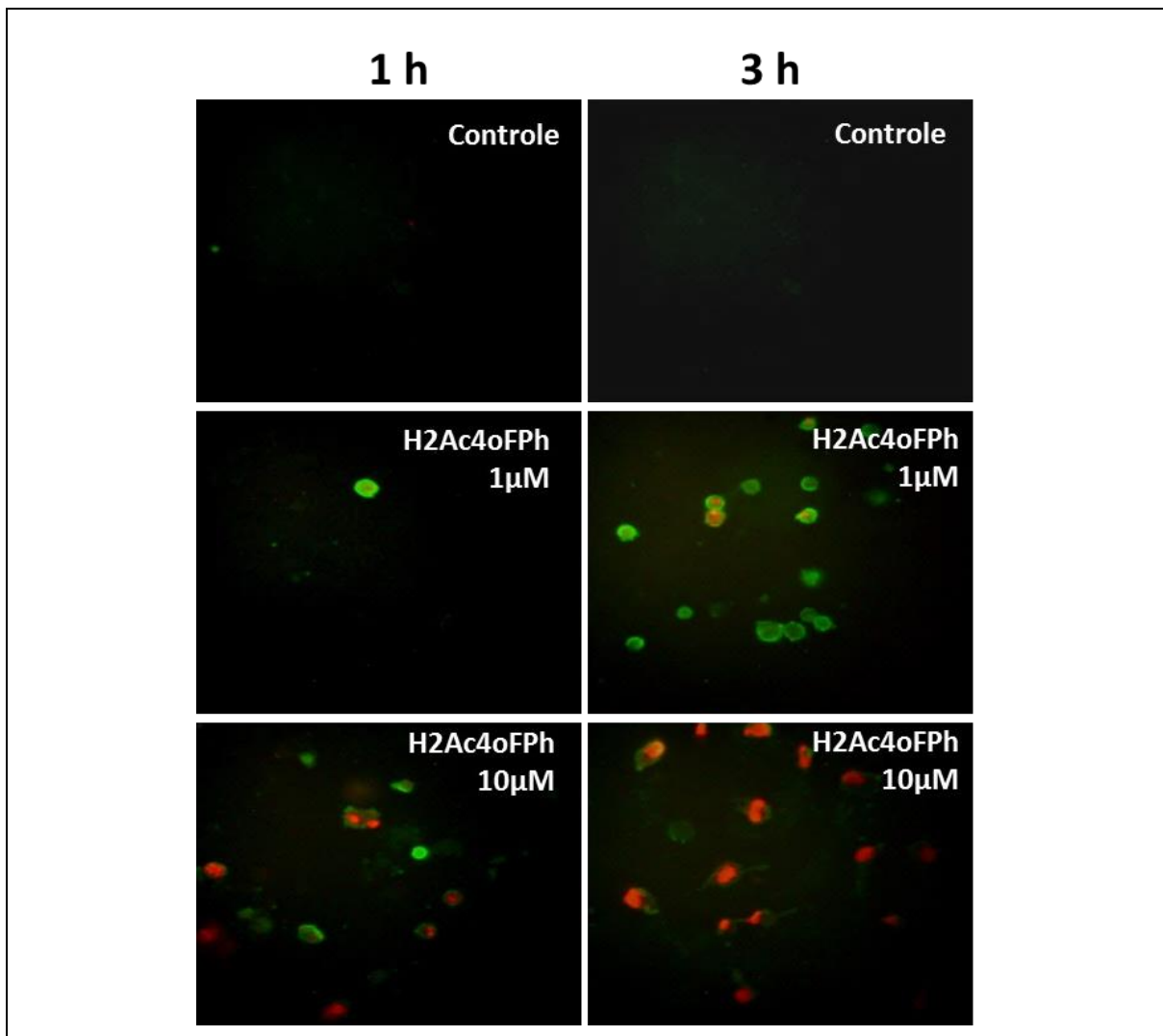


FIGURA 16: Determinação do tipo de morte induzida pela H2Ac4oFPh em células U-87MG, utilizando anexina V/IP. Células U-87MG foram tratadas, por 1 e 3 h, com H2Ac4oFPh (1 e 10 μ M) e coradas com anexina V/IP. Imagens foram adquiridas em câmera fotográfica acoplada ao M.F. (530 - 650 nm – aumento de 200x).

Estes resultados corroboram aqueles obtidos na análise das alterações morfológicas celulares e do DNA cromossomal, e na coloração dupla com LA/BE, indicando que o mecanismo de morte induzido pela H2Ac4oFPh é a apoptose.

5.6 SELEÇÃO DA TSC MAIS POTENTE

A triagem das TSC antitumorais revelou que todos os 12 derivados da H2Ac4Ph testados apresentaram atividade antitumoral significativa e induziram alterações morfológicas características de apoptose nas células tumorais. No entanto, H2Ac4oClPh e H2Ac4oFPh demonstraram ser as mais potentes e, por este motivo, as mais indicadas para realização dos demais testes propostos no projeto.

Como apenas uma das moléculas deveria ser escolhida, sob pena de inviabilizar os estudos em animais, um levantamento bibliográfico foi realizado a fim de identificar a TSC mais adequada sob o ponto de vista científico. Este levantamento demonstrou que a H2Ac4oClPh havia sido estudada por 4 diferentes grupos de pesquisa, que estudaram sua complexação ao cobre (West et al., 1996), a citotoxicidade dos seus complexos de cobre (Miller et al., 1998), sua atividade antimalárica (Klaymann et al., 1979) e sua potencial aplicação para tratamento de carcinoma de pulmão de não pequenas células (Robbins et al., 2007). Por outro lado, a H2Ac4oFPh havia sido estudada por apenas 1 grupo de pesquisa que identificou sua atividade antimalárica (Klaymann et al., 1979). A atividade antitumoral deste composto não havia sido demonstrada, o que tornou essa molécula ainda mais atrativa e justificou a sua seleção para a continuidade dos estudos.

5.7 AVALIAÇÃO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A FIG. 17 apresenta células U-87MG controles e tratadas com H2Ac4oFPh, coradas com DCF-DA, corante utilizado para a determinação de ROS. A oxidação da DCF-DA pelas ROS gera uma espécie verde fluorescente que pode ser visualizada ao microscópio de fluorescência. Foi possível observar que o tratamento com a TSC aumentou a geração ROS nas células de glioblastoma sugerindo que o estresse oxidativo induzido pela TSC é responsável, ao menos em parte, pela apoptose induzida por H2Ac4oFPh.

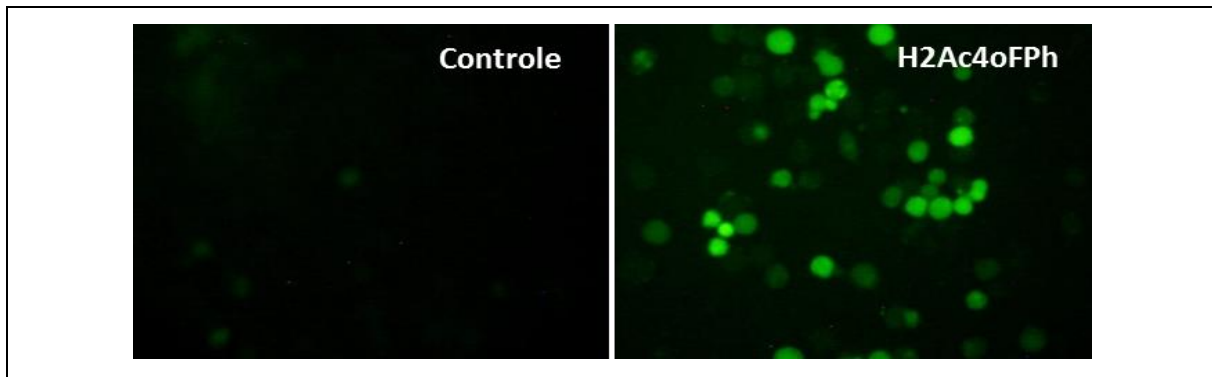


FIGURA 17: Geração de espécies reativas de oxigênio em células U-87MG tratadas com H2Ac4oFPh. Células U-87MG foram tratadas, por 24h, com H2Ac4oFPh (1 μ M) e coradas com DCF-DA. Imagens foram adquiridas em câmera fotográfica acoplada ao M.F. (530 - 650 nm – aumento de 200x).

5.8 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A FIG. 18 apresenta os resultados, obtidos por meio da avaliação da peroxidação lipídica, que demonstram que a H2Ac4oFPh promoveu a peroxidação dos lipídios de membrana das células tratadas. Os níveis de MDA foram aproximadamente 3 vezes maiores nas células tratadas do que nas células controle, corroborando os resultados obtidos pela coloração com DCF e indicando que a apoptose induzida por esta TSC pode ser desencadeada pela geração de ROS e posterior peroxidação lipídica.

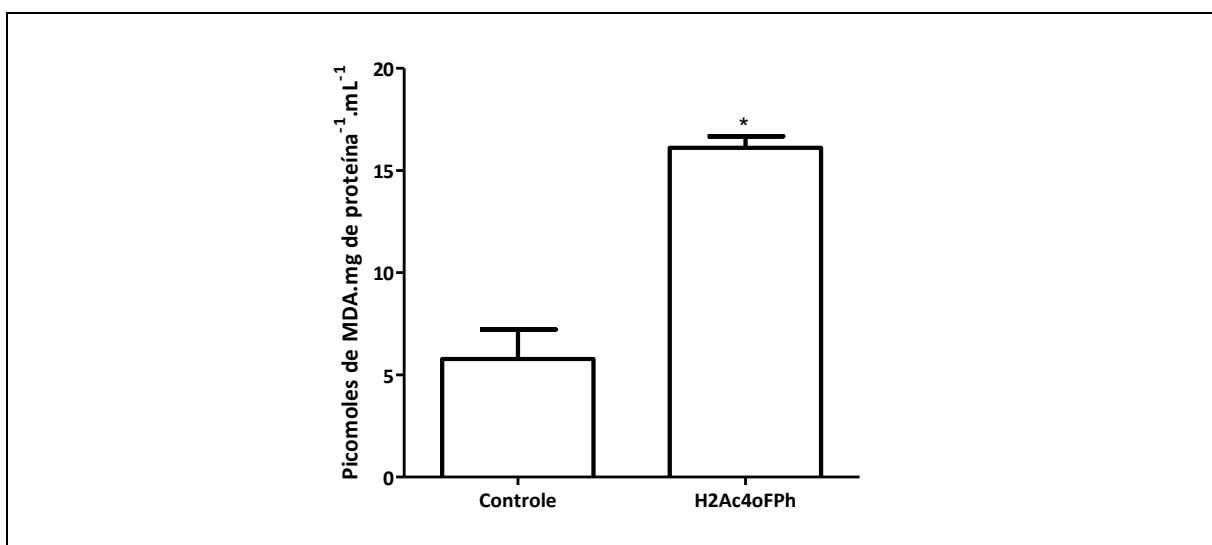


FIGURA 18: Peroxidação lipídica em células U-87MG tratadas com H2Ac4oFPh. Células U-87MG foram tratadas, por 24h, com H2Ac4oFPh (1 μ M) e a peroxidação lipídica foi avaliada pelo método TBARS, * $p \leq 0,05$.

5.9 TRATAMENTO *IN VIVO*

Antes de avaliar o efeito antitumoral da H2Ac4oFPh *in vivo*, a tolerância ao tratamento foi determinada pela administração da sua máxima concentração solúvel em solução veículo (DMSO 10%, tween 80 0,05% em NaCl 0,9%), como descrito na metodologia. Observou-se que durante todo o tempo no qual os animais foram avaliados, não houve registro de alterações comportamentais ou morte dos animais tratados. Além disso, não foi observada perda de massa corporal, superior a 20% da massa inicial, durante ou após o tratamento (FIG. 19), indicando que o tratamento poderia ser utilizado, com segurança, nos testes para avaliação do seu efeito antitumoral *in vivo*.

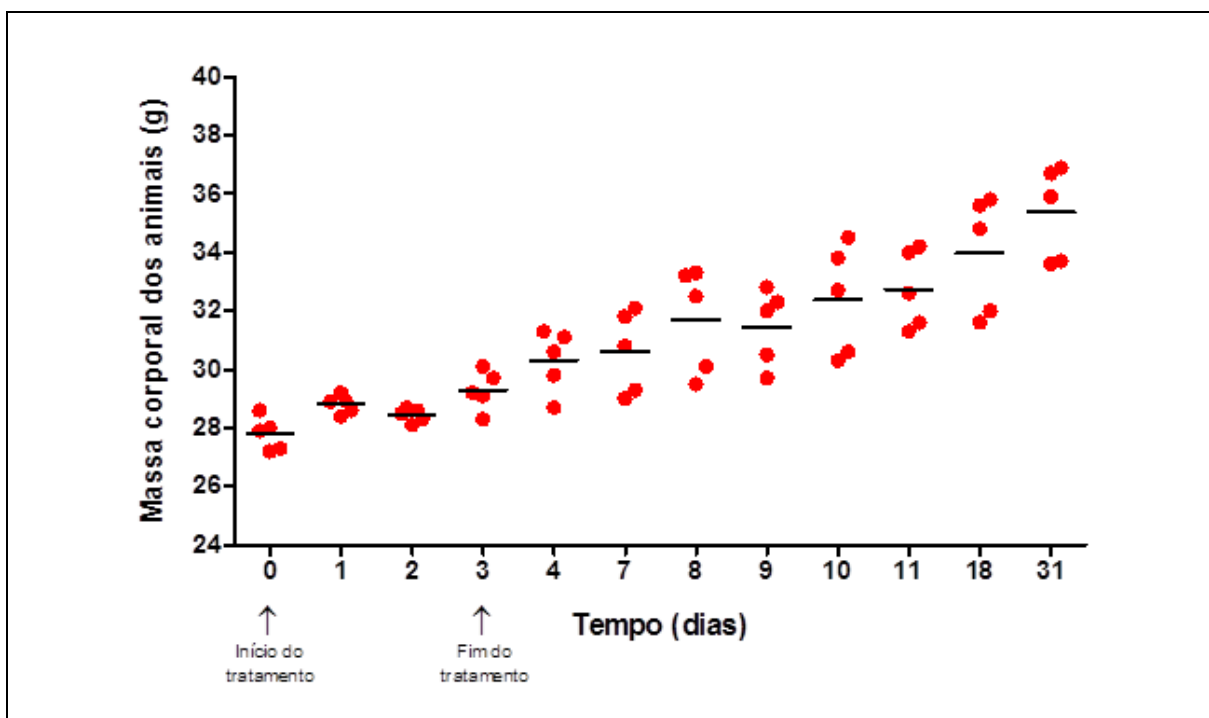


FIGURA 19: Variação de massa de animais Swiss sadios tratados com H2Ac4oFPh. A TSC ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) foi administrada s.c. nos animais, durante 4 dias consecutivos.

O efeito antitumoral da H2Ac4oFPh foi avaliado, em modelo animal de tumor cerebral, por meio de dois protocolos distintos: tratamento iniciado 6 dias após o implante, quando não havia massa tumoral mensurável (protocolo 1), e 10 dias após o implante, quando já era possível identificar massa tumoral em crescimento ($\sim 50 \text{ mm}^3$) (protocolo 2).

Os resultados obtidos, utilizando o protocolo 1, estão apresentados na FIG. 20. Eles demonstraram que, após o fim do tratamento, os tumores dos animais tratados com

H2Ac4oFPh apresentaram redução significativa da taxa de crescimento, quando comparados aos tumores dos animais do grupo controle. Essa redução foi observada por até 6 dias após o fim do tratamento. No entanto, ao final do experimento (19 dias após o implante do tumor), não foi observada diferença estatística entre o volume tumoral dos animais controle e tratados com a TSC.

A FIG. 21 apresenta a massa dos tumores dos grupos de animais controle e tratados com H2Ac4oFPh, utilizando o protocolo 1. A média da massa tumoral nos animais tratados foi cerca de 20% menor que aquela observada nos animais controle, no entanto, essa diferença não foi significativa ($p \geq 0,05$).

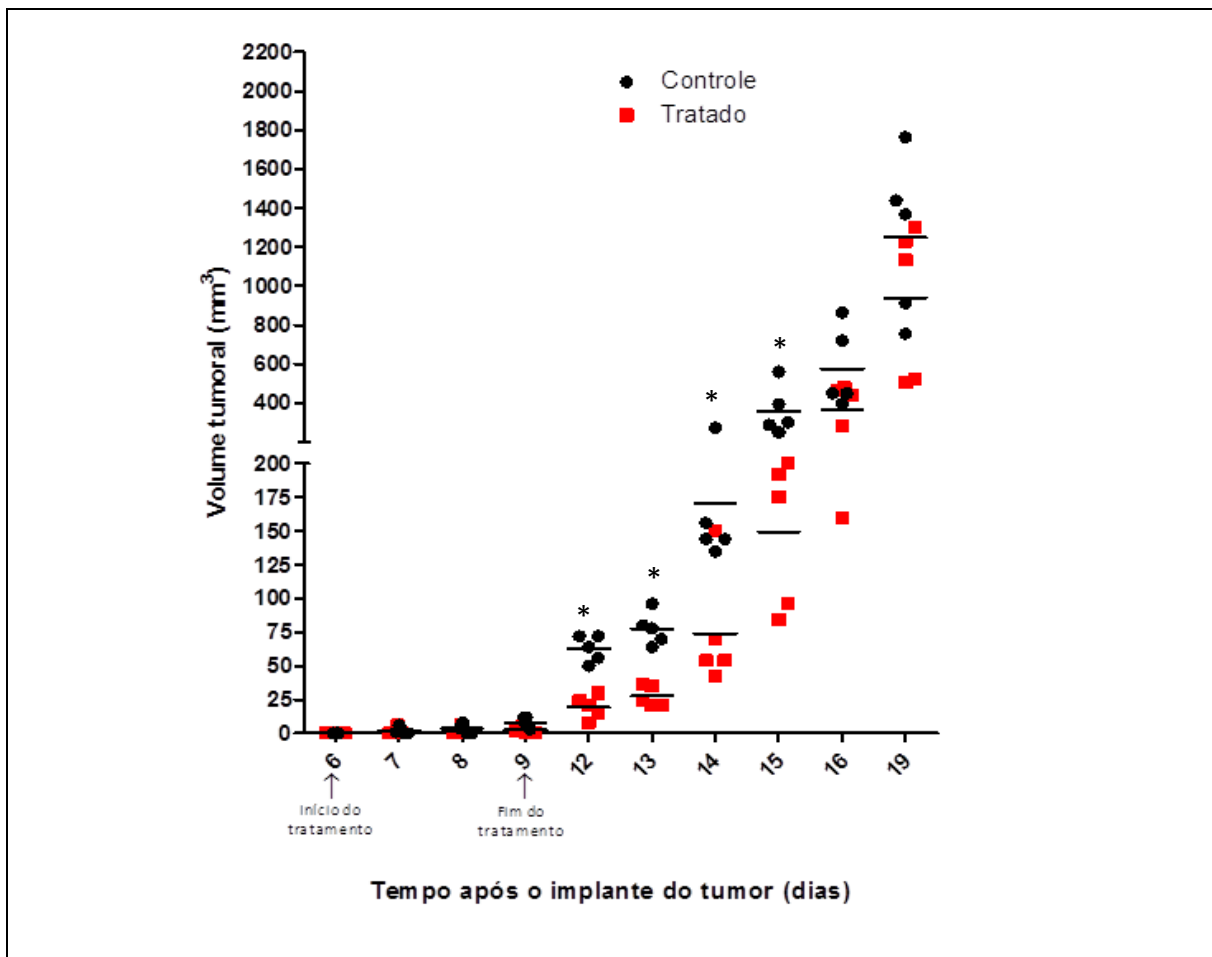


FIGURA 20: Efeito antitumoral da H2Ac4oFPh em modelo animal de tumor cerebral. Animais foram tratados com $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ da TSC (tratado) ou veículo (controle), durante 4 dias consecutivos, de acordo com o protocolo 1 (tratamento iniciado quando não havia massa tumoral mensurável), $*p \leq 0,05$.

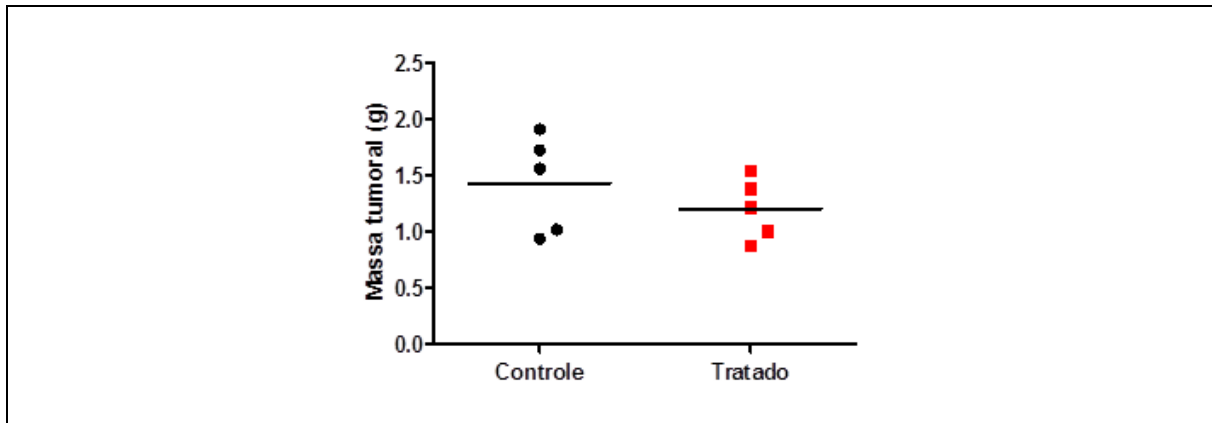


FIGURA 21: Massa tumoral dos animais controle e tratados com H2Ac4oFPh de acordo com protocolo 1, tratamento iniciado quando não havia massa tumoral mensurável.

Os resultados obtidos, utilizando o protocolo 2, estão apresentados na FIG. 22. A tendência à redução da taxa de crescimento tumoral também foi observada nos animais tratados com a TSC, principalmente 4, 5 e 6 dias após o término do tratamento; porém, essa redução foi menos relevante do que aquela observada nos animais que tiveram o tratamento iniciado antes que houvesse a formação de um tumor visível (protocolo 1). Assim como no protocolo 1, não houve diferença estatística entre o volume tumoral dos animais controle e tratados com a H2Ac4oFPh, ao final do experimento. A massa tumoral dos animais dos grupos controle e tratados com H2Ac4oFPh, utilizando o protocolo 2, está apresentado na FIG. 23. A tendência à redução da massa tumoral quando os animais foram tratados com a TSC ainda foi bastante visível. A média da massa tumoral dos animais tratados foi cerca de 40% menor que aquela observada nos animais controle. Essa diferença, no entanto, não foi significativa.

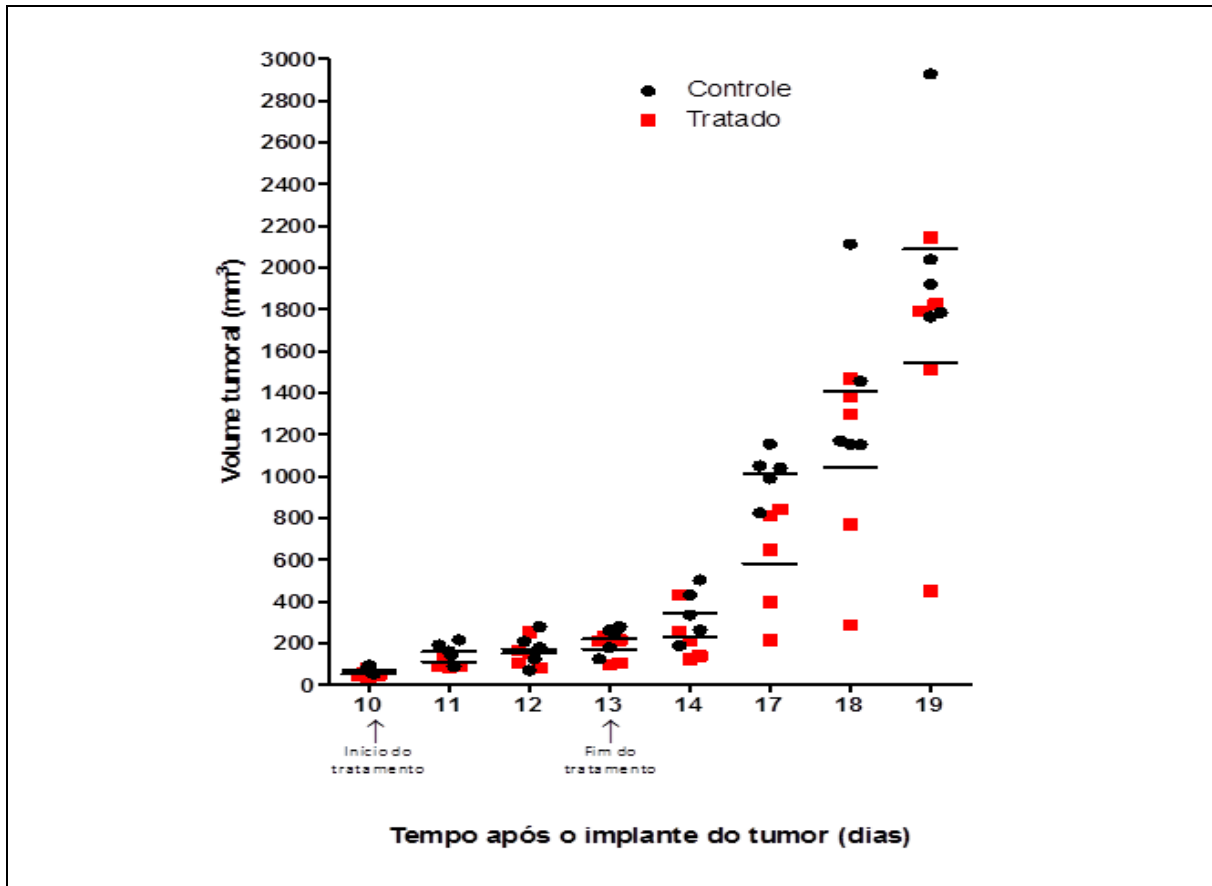


FIGURA 22: Efeito antitumoral da H2Ac4oFPh em modelo animal de tumor cerebral. Animais foram tratados com 5 mg.kg^{-1} da TSC (tratado) ou veículo (controle), durante 4 dias consecutivos, de acordo com o protocolo 2 (tratamento iniciado quando já era possível identificar massa tumoral em crescimento).

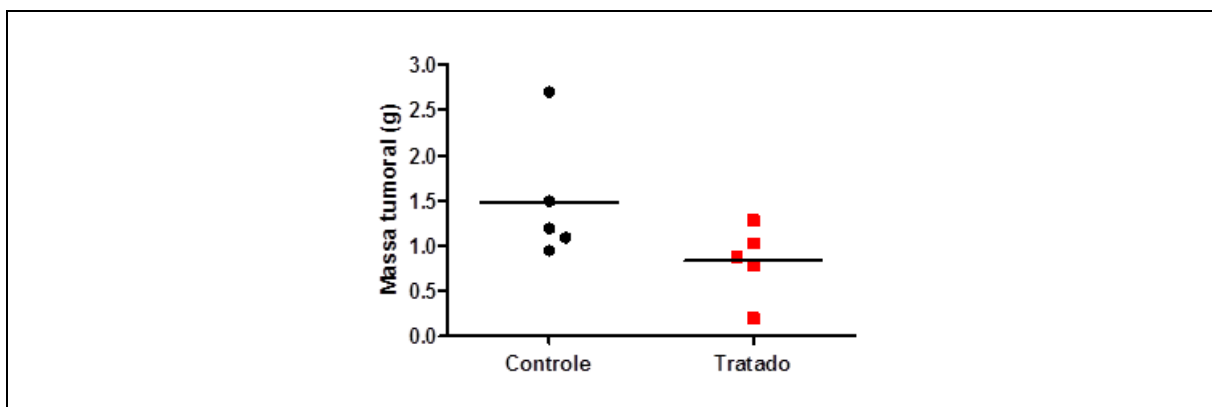


FIGURA 23: Massa tumoral dos animais controle e tratados com H2Ac4oFPh, de acordo com protocolo 2 (tratamento iniciado quando já era possível identificar massa tumoral em crescimento).

Ao final dos experimentos, os órgãos e o tumor dos animais controles e tratados foram enviados para análise histopatológica, com o intuito de verificar se os tratamentos com a H2Ac4oFPh induziram lesões tissulares em órgãos vitais e alterações morfológicas nas

células tumorais. As fotomicrografias representativas dessas análises estão apresentadas nas FIG. 24 e 25.

Por meio do laudo técnico, foi possível concluir que os animais controle e tratados apresentaram padrão histológico semelhante, sugerindo que o tratamento com H2Ac4oFPh não promoveu alterações histopatológicas dignas de nota no coração, pulmões, fígado, rins e baço dos animais.

Os tumores dos animais tratados também não apresentaram diferenças histológicas, quando comparados aos tumores do grupo controle. Em ambos os grupos, os tumores apresentaram pleomorfismo celular, intensa hemorragia superficial, poucos vasos sanguíneos na área central do tumor e grande quantidade de células necróticas.

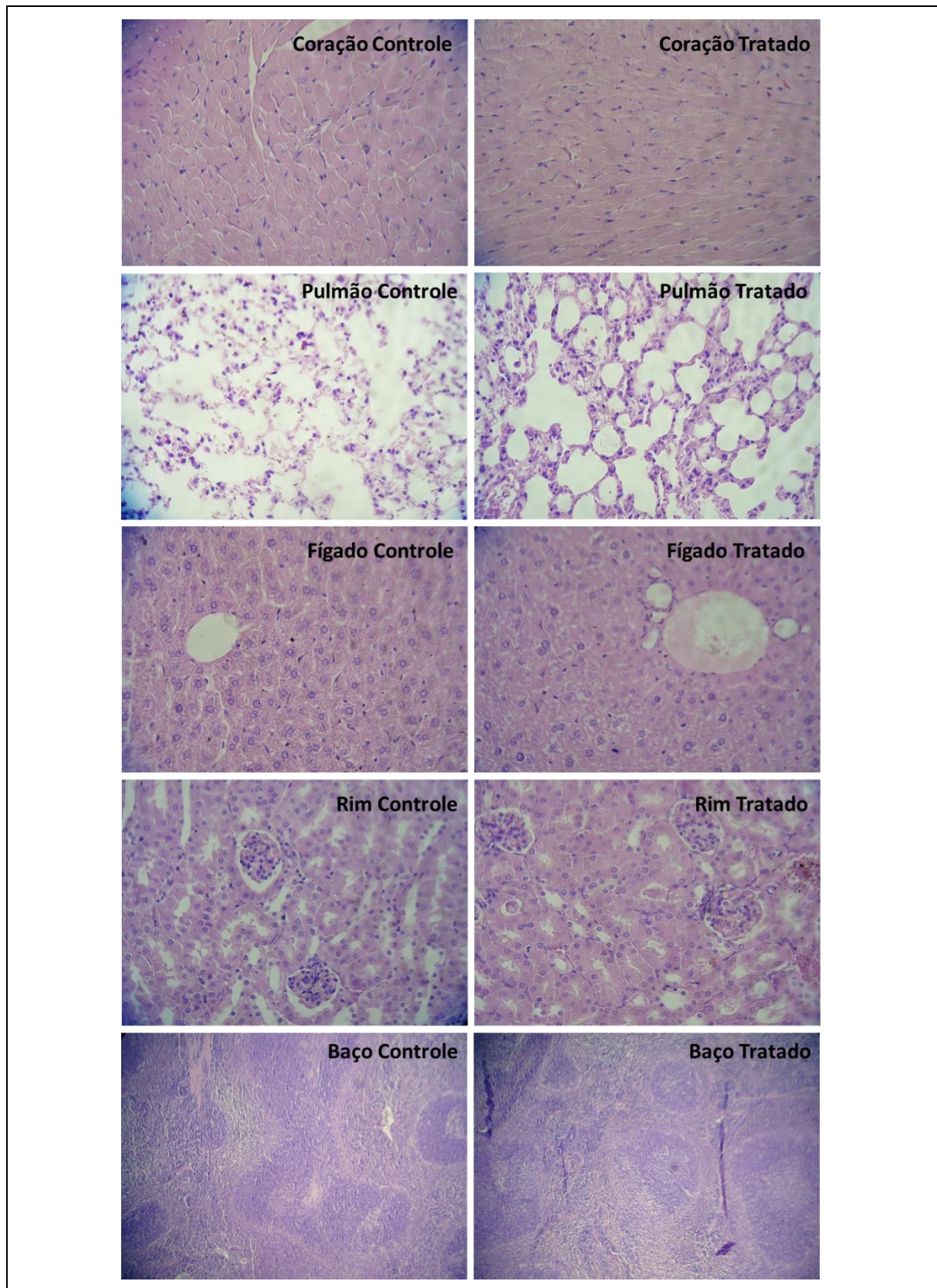


FIGURA 24: Fotomicrografias histológicas representativas do coração, pulmões, fígado, rim e baço, após coloração com hematoxilina/eosina, dos animais controle e tratados com H2Ac4oFPh. Imagens foram adquiridas em câmera fotográfica acoplada ao M.O. (aumento de 400x).

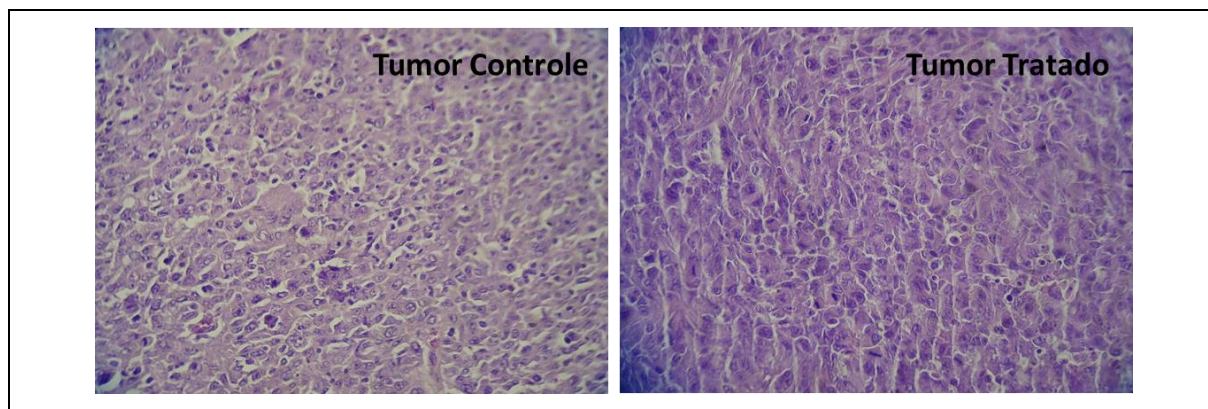


FIGURA 25: Fotomicrografias histológicas representativas da massa tumoral dos animais controle e tratados com H2Ac4oFPh, após coloração com hematoxilina/eosina. Imagens foram adquiridas em câmera fotográfica acoplada ao M.O. (aumento de 400x).

5.10 SÍNTESE DE SONDA RADIOATIVA DA H2Ac4oFPH

Com o objetivo de avaliar a interação da H2Ac4oFPh com as células tumorais, sondas radioativas deste composto foram sintetizadas utilizando os radioisótopos ^{111}In e ^{67}Ga como radiotraçadores. A radiomarcagem da H2Ac4Ph também foi realizada, nas mesmas condições, para avaliar possíveis alterações na eficiência da marcação promovidas pela presença do flúor no grupo fenila da molécula.

Nas condições testadas, as 4 moléculas foram sintetizadas com sucesso: H2Ac4oFPh- ^{111}In , H2Ac4oFPh- ^{67}Ga , H2Ac4Ph- ^{111}In , H2Ac4Ph- ^{67}Ga . Estas moléculas apresentaram atividades específicas de: 2,13; 1,07; 2,00 e 1,00 TBq.mmol $^{-1}$, respectivamente. A pureza radioquímica de cada composto foi determinada por CLAE, e está apresentada no item 5.11.

5.11 DETERMINAÇÃO DA PUREZA RADIOQUÍMICA DOS COMPOSTOS RADIOMARCADOS

A FIG. 26 apresenta o perfil cromatográfico, em CLAE, representativo da H2Ac4Ph e H2Ac4oFPh na condição de eluição escolhida para determinação da pureza radioquímica dos compostos radiomarcados. Nessa condição, as moléculas frias e radiomarcadas apresentaram tempo de retenção de aproximadamente 10 min, o que permitiu boa distinção entre as mesmas e os radioisótopos livres, que apresentaram tempo de retenção aproximado de 4 min.

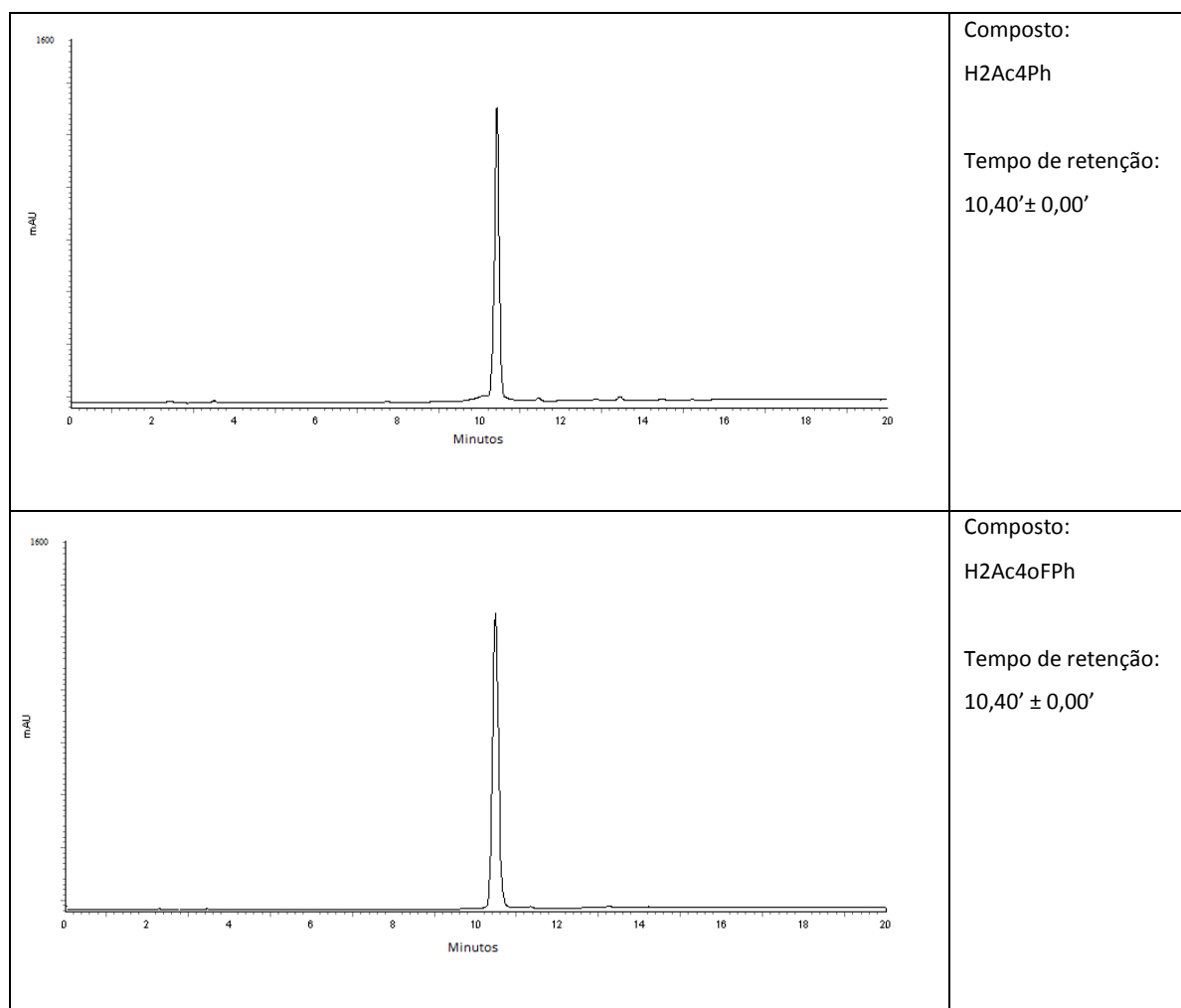


FIGURA 26: Perfis de CLAE (UV-Vis; método B) representativos da H2Ac4Ph e H2Ac4oFPh.

A síntese da H2Ac4oFPh-¹¹¹In e da H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga foi realizada com pureza radioquímica satisfatória, após 30 min de reação entre os compostos e os radiometais, em temperatura ambiente (TAB. 5). Nessa condição, H2Ac4oFPh-¹¹¹In e H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga apresentaram pureza de 86,4 ± 0,5% e 97,5 ± 0,6%, respectivamente. Apesar da H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga ter apresentado maior pureza radioquímica, o que garante presença de quantidade extremamente reduzida de ⁶⁷Ga livre, foi observada a formação de dois complexos de H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga com lipofilicidades distintas (FIG. 27). A formação desses dois complexos sugere que a reação da TSC com o radiometal ocorreu na proporção 2:1 e 1:1 (H2Ac4oFPh: ⁶⁷Ga).

A tentativa de purificação de ambos os compostos foi realizada, para separação dos diferentes complexos e dos radiometais livres, em coluna Sep-Pack C₁₈ aplicando-se diferentes concentrações de acetonitrila ou metanol (10 - 100%). No entanto, essa tentativa

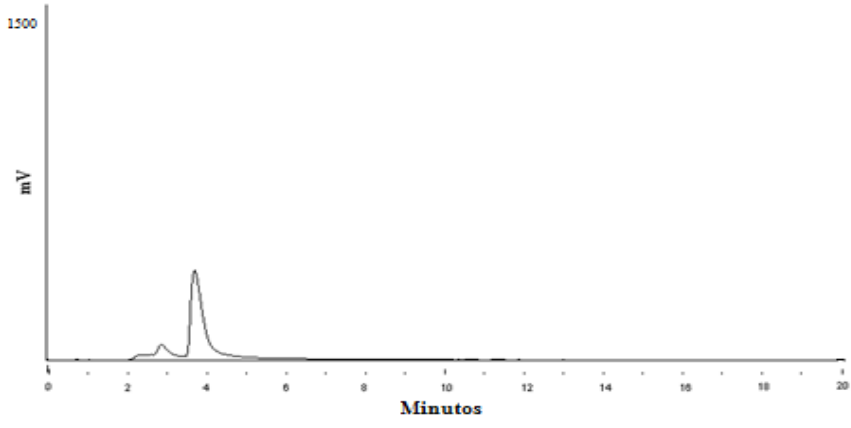
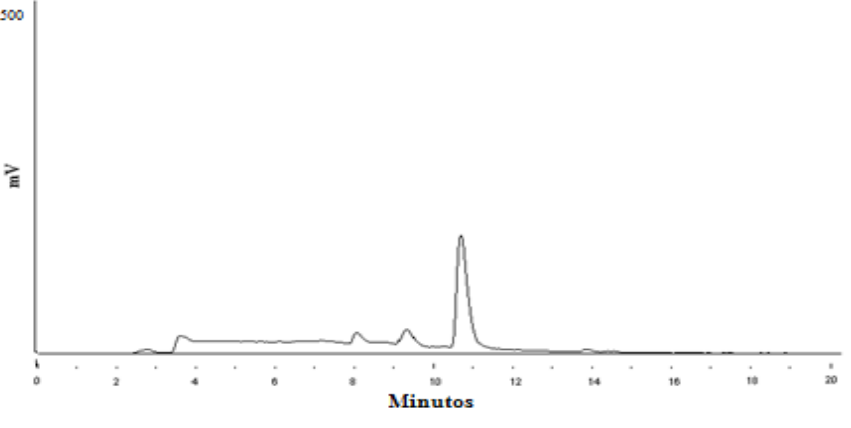
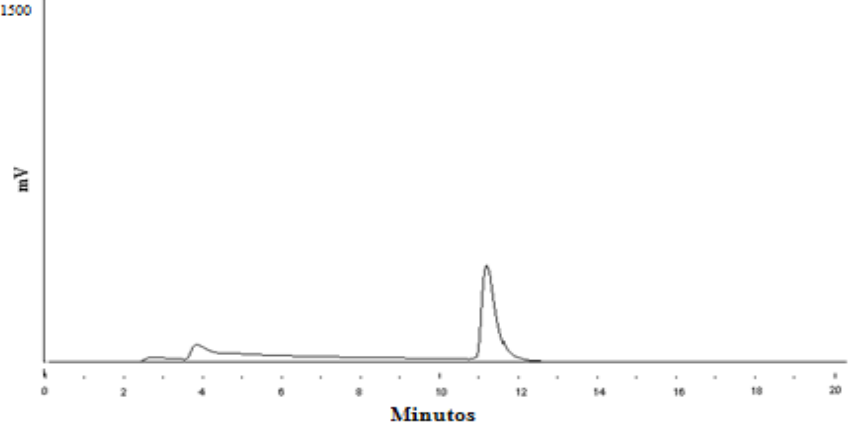
não foi bem sucedida e a pureza dos compostos permaneceu inalterada. Outra condição de reação foi testada, incubando-se as TSC com os radiometais durante 30 min, a 90°C. Essa condição, no entanto, não promoveu o aumento da pureza radioquímica dos compostos.

Também foi possível formar complexos da H2Ac4Ph com ^{111}In e ^{67}Ga (TAB. 5). Porém, a pureza radioquímica dos compostos formados foi significativamente menor (5 – 20% menor) do que aquela observada para os complexos de H2Ac4oFPh, sugerindo que a presença do flúor na posição orto do grupo fenila da molécula favorece a complexação da TSC com os radiometais.

TABELA 5: Análise comparativa da pureza radioquímica, determinada por CLAE (método B), das TSC marcadas com ^{111}In e ^{67}Ga em temperatura ambiente ou a 90°C.

Composto	Pureza radioquímica	
	30 minutos T.A.	30 minutos 90°C
H2Ac4oFPh- ^{111}In	86,4 ± 0,5%	88,0 ± 3,4%
H2Ac4oFPh- ^{67}Ga	97,5 ± 0,6%**	93,0 ± 5,0%**
H2Ac4Ph- ^{111}In	79,0 ± 5,6%**	87,0 ± 4,2%**
H2Ac4Ph- ^{67}Ga	70,0 ± 6,0%**	64,0 ± 2,0%**

* Formação de mais de um complexo radioativo. T.A. = temperatura ambiente.

 <p>The chromatogram displays a single sharp peak at approximately 3.7 minutes. The y-axis is labeled 'mV' and ranges from 0 to 1500. The x-axis is labeled 'Minutos' and ranges from 0 to 20. There are minor baseline fluctuations before the main peak.</p>	<p>Composto: $^{111}\text{InCl}_3$</p> <p>Tempo de retenção: $2,7' \pm 0,08'$ $3,9' \pm 0,06'$</p>
 <p>The chromatogram shows a primary peak at approximately 10.9 minutes. The y-axis is labeled 'mV' (0-1500) and the x-axis is 'Minutos' (0-20). Several smaller peaks are visible between 4 and 10 minutes.</p>	<p>Composto: $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Ph}-^{111}\text{In}$</p> <p>Tempo de retenção: $8,30' \pm 0,00'$ $9,50' \pm 0,00'$ $10,90' \pm 0,00'$</p>
 <p>The chromatogram features a single sharp peak at approximately 11.56 minutes. The y-axis is labeled 'mV' (0-1500) and the x-axis is 'Minutos' (0-20). The baseline is relatively flat with minor noise.</p>	<p>Composto: $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oFPh}-^{111}\text{In}$</p> <p>Tempo de retenção: $11,56' \pm 0,05'$</p>

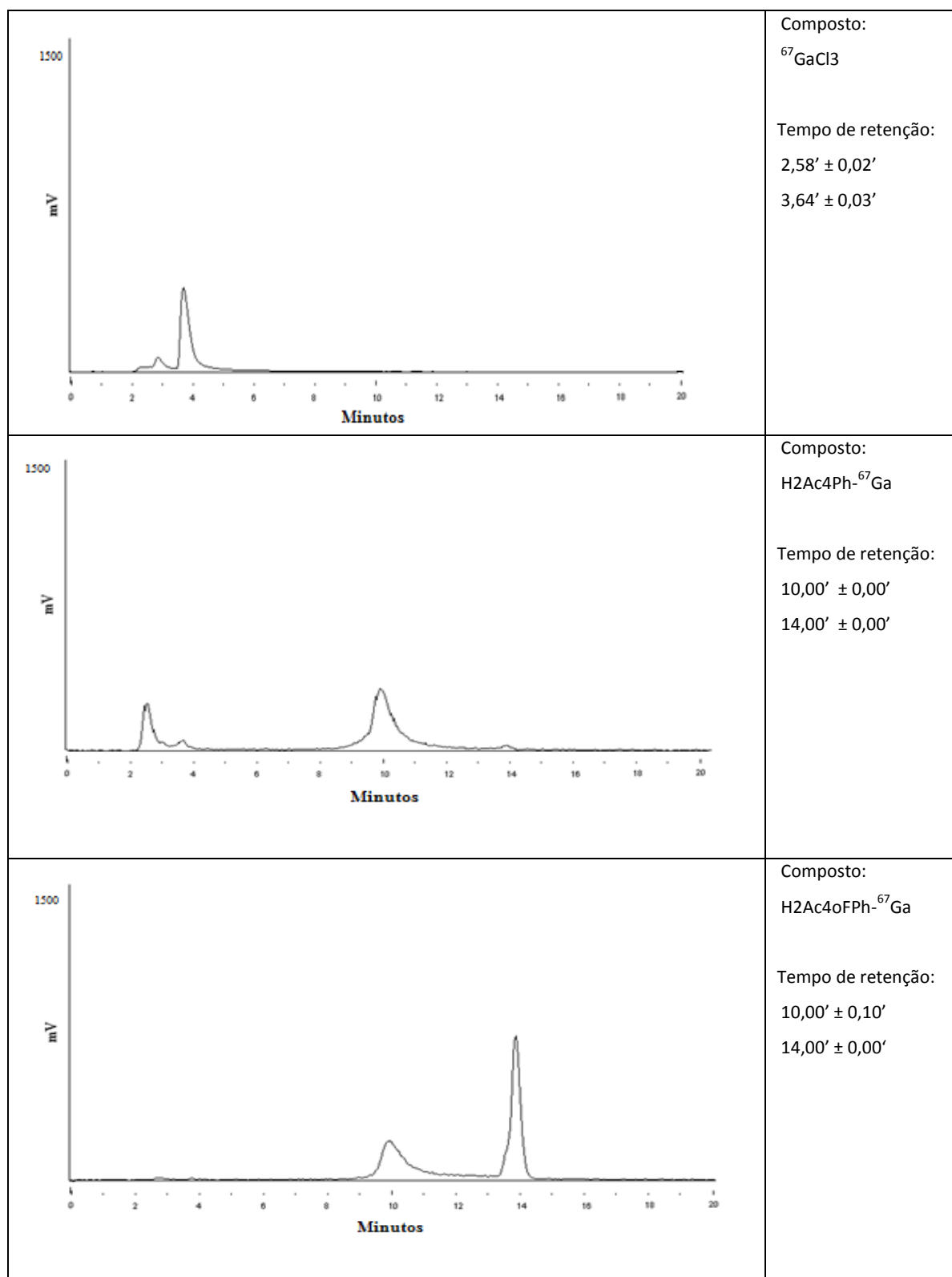


FIGURA 27: Perfil de CLAE (radioativo; método B) representativo da $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Ph}$ e $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oFPh}$ radiomarcadas com ^{111}In e ^{67}Ga . Foram utilizados $10 \mu\text{g}$ de cada TSC e 2 e 1 mCi (74 e 37 MBq) de $^{111}\text{InCl}_3$ e $^{67}\text{GaCl}_3$, respectivamente. A reação foi realizada em metanol, durante 30 min, à temperatura ambiente, sob agitação constante (800xg).

5.12 ANÁLISE DA ESTABILIDADE DOS COMPOSTOS RADIOMARCADOS

A pureza radioquímica dos compostos radiomarcados foi avaliada, 24 h após a radiomarcação, para determinação da estabilidade, quando armazenadas sob 2 – 8° C.

Os resultados obtidos (TAB. 6) demonstraram que H2Ac4oFPh-¹¹¹In manteve sua estabilidade, durante as 24 h posteriores à radiomarcação, quando incubadas sob refrigeração. H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga, no entanto, teve sua estabilidade ligeiramente reduzida para 91,0 ± 1,0%.

H2Ac4Ph-¹¹¹In teve a estabilidade significativamente reduzida, 24 h após a radiomarcação, indicando que, além de favorecer a complexação da TSC com os radiometais, a presença do flúor na posição orto do grupo fenila da molécula também contribui para o aumento da estabilidade dos complexos.

TABELA 6: Estabilidade, determinada por CLAE (método B), das TSC radiomarcadas após armazenamento por 24 h, sob 2 - 8° C.

Composto	Pureza radioquímica	
	30 minutos T.A.	24h após radiomarcação Armazenadas 2 - 8° C
H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In	86,4 ± 0,5%	83,8 ± 1,7 %
H2Ac4oFPh- ⁶⁷ Ga	97,5 ± 0,6%	91,0 ± 1,0%
H2Ac4Ph- ¹¹¹ In	79,0 ± 5,6%	31,0 ± 2,0%
H2Ac4Ph- ⁶⁷ Ga	70,0 ± 6,0%	ND

5.13 AVALIAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA DA H2Ac4oFPh-¹¹¹IN E H2Ac4oFPh-⁶⁷GA

Os estudos farmacocinéticos, demonstraram que a concentração plasmática de H2Ac4oFPh-¹¹¹In foi reduzida a apenas 8% da atividade total injetada por mL de sangue (AI.mL⁻¹), 2,5 min após a administração, tempo após o qual as análises da AI no sangue foram iniciadas. No entanto, após este mesmo intervalo de tempo, cerca de 60% da AI.mL⁻¹ de H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga ainda permaneceu circulando no corpo dos animais (FIG. 28 a, b).

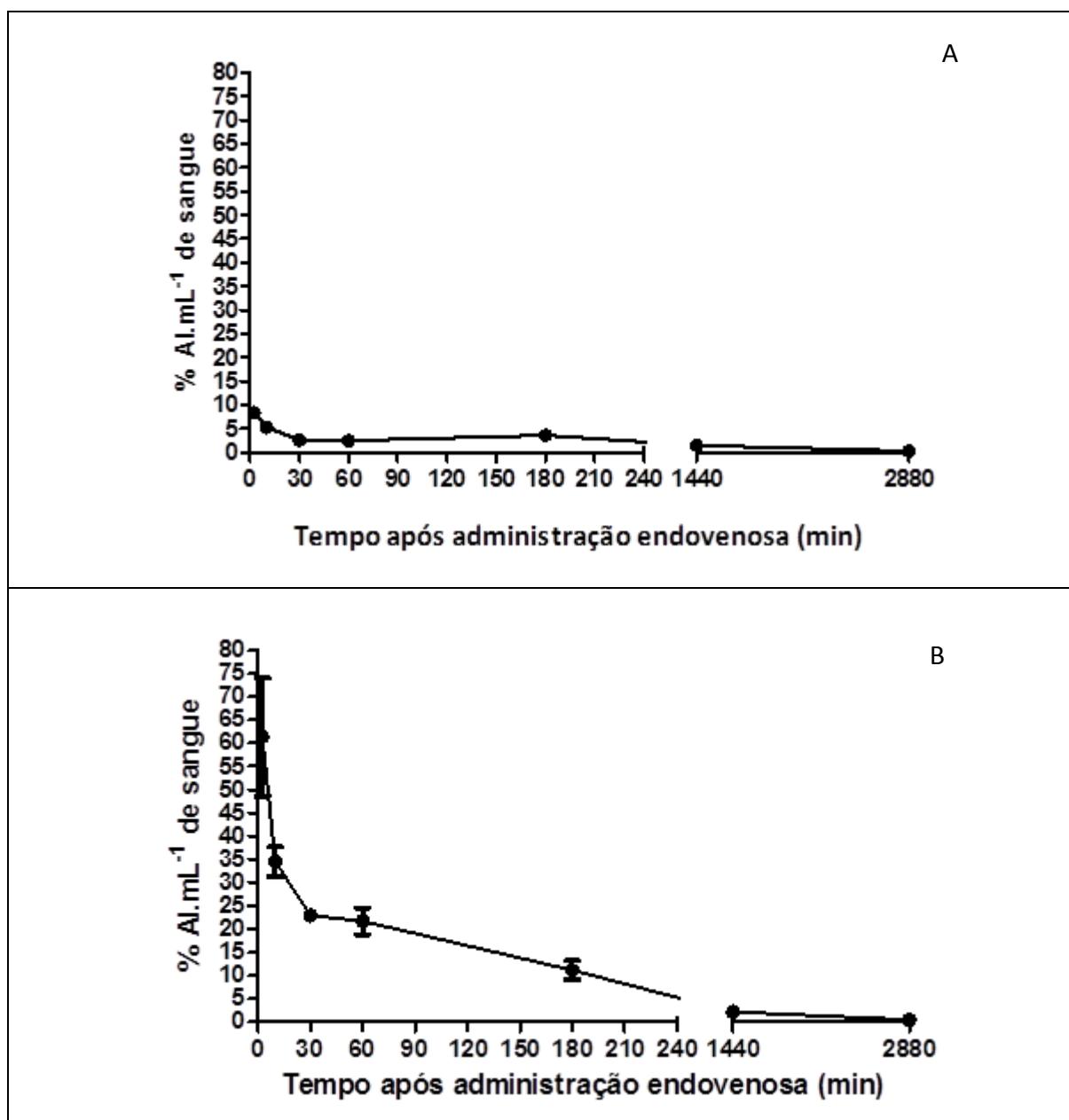


FIGURA 28: Curva de clareamento sanguíneo da H2Ac4oFPh-¹¹¹In (A) e da H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga (B) em camundongos *Swiss* sadios.

Após 2,5 min, houve redução gradativa na porcentagem de ambas as moléculas circulantes, porém, o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga foi menor que o $t_{1/2}$ da H2Ac4oFPh-¹¹¹In, tanto na fase exponencial rápida $t_{1/2}$ (α) quanto na lenta $t_{1/2}$ (β), indicando que, a partir desse tempo, a taxa de clareamento sanguíneo da H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga é maior, quando comparada com a H2Ac4oFPh-¹¹¹In. Os resultados de $t_{1/2}$ (α), de ambas as moléculas, também indicam rápido clareamento sanguíneo (TAB. 7). No entanto, o $t_{1/2}$ (β), de ambas as moléculas, apresentou-se relativamente alto. Os valores de depuração e volume de

distribuição foram maiores para H2Ac4oFPh-¹¹¹In, indicando que ela é mais facilmente removida do sangue e se distribui de maneira mais eficaz para os tecidos.

TABELA 7: Parâmetros farmacocinéticos para H2Ac4oFPh-¹¹¹In e H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga determinados em camundongos *Swiss* sadios.

Parâmetro	H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In	H2Ac4oFPh- ⁶⁷ Ga
$t_{\frac{1}{2}}(\alpha)^1$ (min)	6,5	3,7
$t_{\frac{1}{2}}(\beta)^2$ (min)	1296	131,7
α^3 (min ⁻¹)	0,106	0,189
β^4 (min ⁻¹)	0,00054	0,0053
DP ⁵ (mL.min ⁻¹)	0,018	0,0059
Vd ⁶ (L.kg ⁻¹)	33,56	1,13

¹tempo de meia-vida da fase rápida ou distributiva; ²tempo de meia-vida da fase lenta ou de eliminação; ³contante de distribuição; ⁴constante de eliminação; ⁵depuração; ⁶volume de distribuição

5.14 AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO DA H2Ac4oFPh-¹¹¹IN E H2Ac4oFPh-⁶⁷GA EM CAMUNDONGOS SWISS SADIOS

O perfil de biodistribuição da H2Ac4oFPh-¹¹¹In e H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga, em diferentes tempos após administração, está representado nas FIG. 29 (a, b), como %AI.g⁻¹. Os resultados obtidos indicam os rins como a principal via de excreção e a captação pelo coração, pâncreas, estômago, intestino, músculo e encéfalo seguiu perfusão sanguínea, para ambas as moléculas (dado evidenciado pela manutenção da razão da atividade acumulada no sangue/órgão ao longo do tempo).

Foi observada significativa captação das TSC radiomarcadas pelo fígado, indicando que este pode ser um órgão crítico do ponto de vista dosimétrico. A alta captação nos pulmões ocorreu, provavelmente, devido à sua alta vascularização.

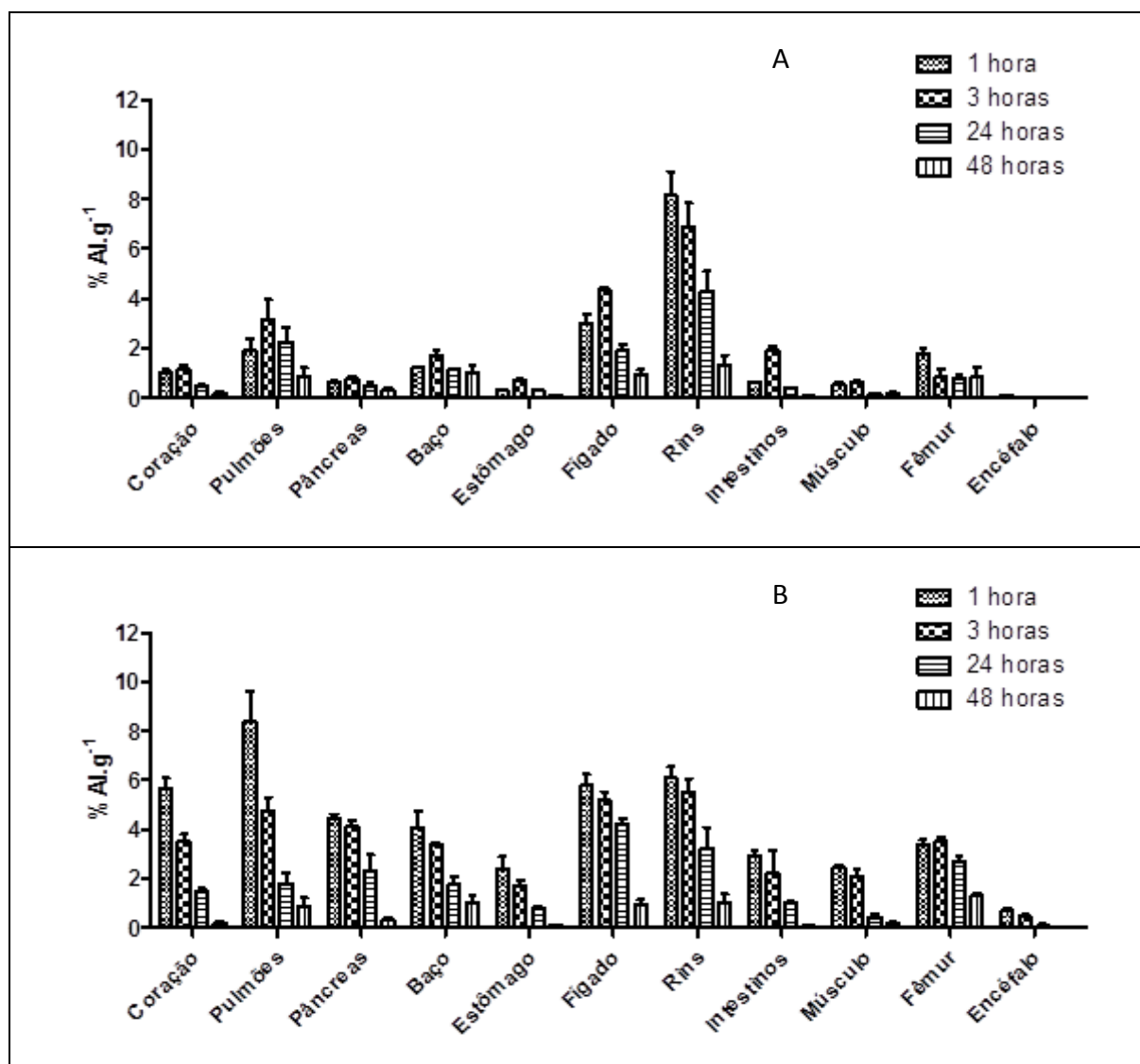


FIGURA 29: Biodistribuição da H2Ac4oFPh-¹¹¹In (A) e da H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga (B) em camundongos *Swiss* sadios, 1, 3, 24 e 48 horas após administração *i.v.* (0,37 MBq).

5.15 ESTUDOS CINTILOGRÁFICOS DA H2Ac4oFPh-¹¹¹IN E H2Ac4oFPh-⁶⁷GA EM CAMUNDONGOS SWISS SADIOS

As imagens cintilográficas das TSC radiomarcadas estão apresentadas nas FIG. 30 e 31. Áreas com maior concentração de atividade são mostradas em preto, seguidas em ordem decrescente de atividade pelas cores vermelho, laranja, amarelo, verde, azul e branco. Os resultados confirmaram os dados da biodistribuição e farmacocinética, indicando que H2Ac4oFPh-¹¹¹In é mais facilmente removida do sangue e se distribui mais rapidamente para os tecidos. Animais administrados com H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga apresentaram radiação de fundo mais intensa, em todos os tempos analisados, quando comparados com aqueles

administrados com $H_2Ac_4oFPh-^{111}In$, demonstrando que alta concentração da molécula ainda permanecia circulante.

Ambas as moléculas apresentaram acúmulo abdominal gradativo decorrente, possivelmente, da alta captação hepática e renal.

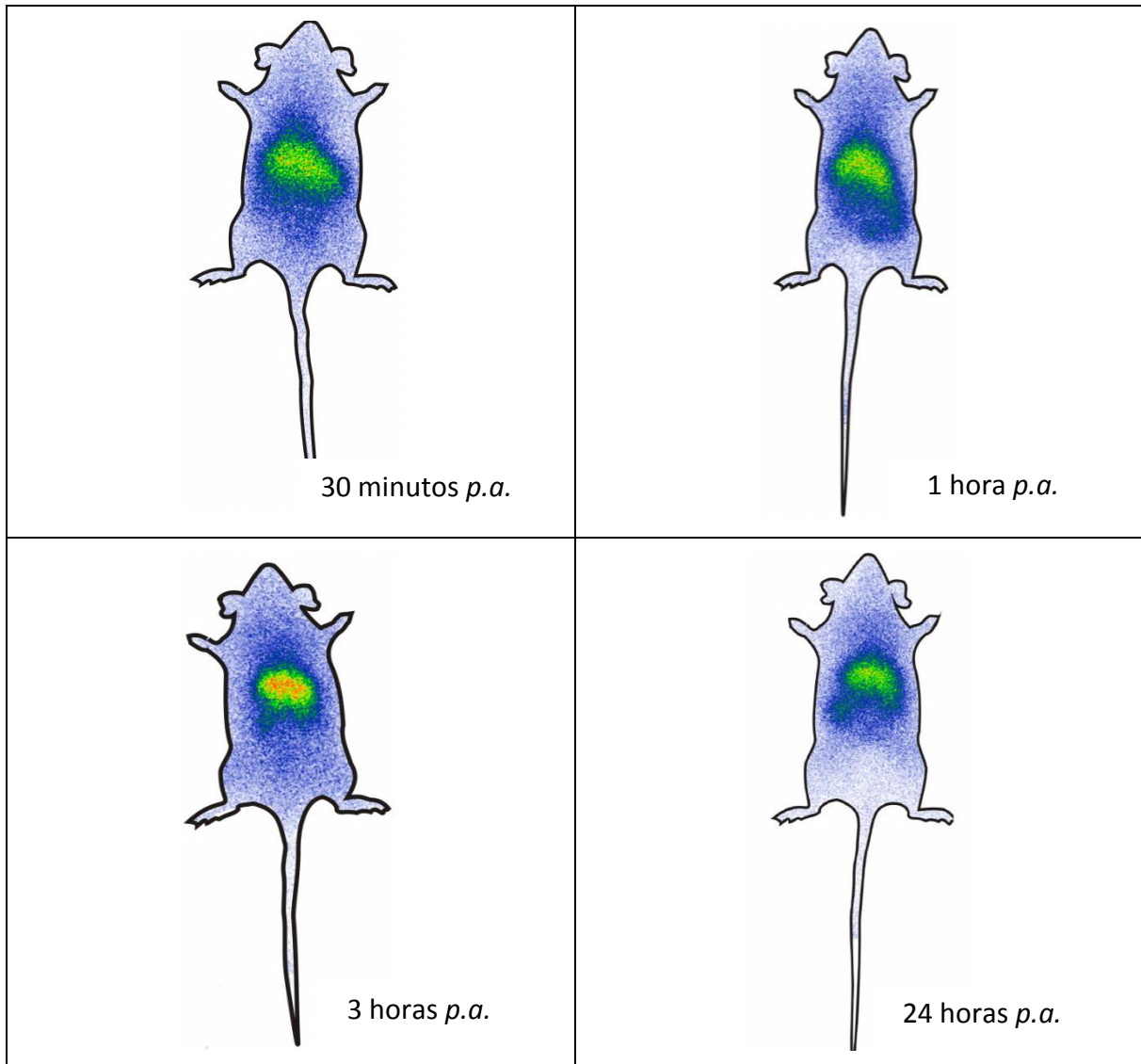


FIGURA 30: Estudos cintilográficos da $H_2Ac_4oFPh-^{111}In$ em camundongos *Swiss* sadios, 30 minutos, 1, 3 e 24 horas após administração *i.v.* (1,85 MBq).

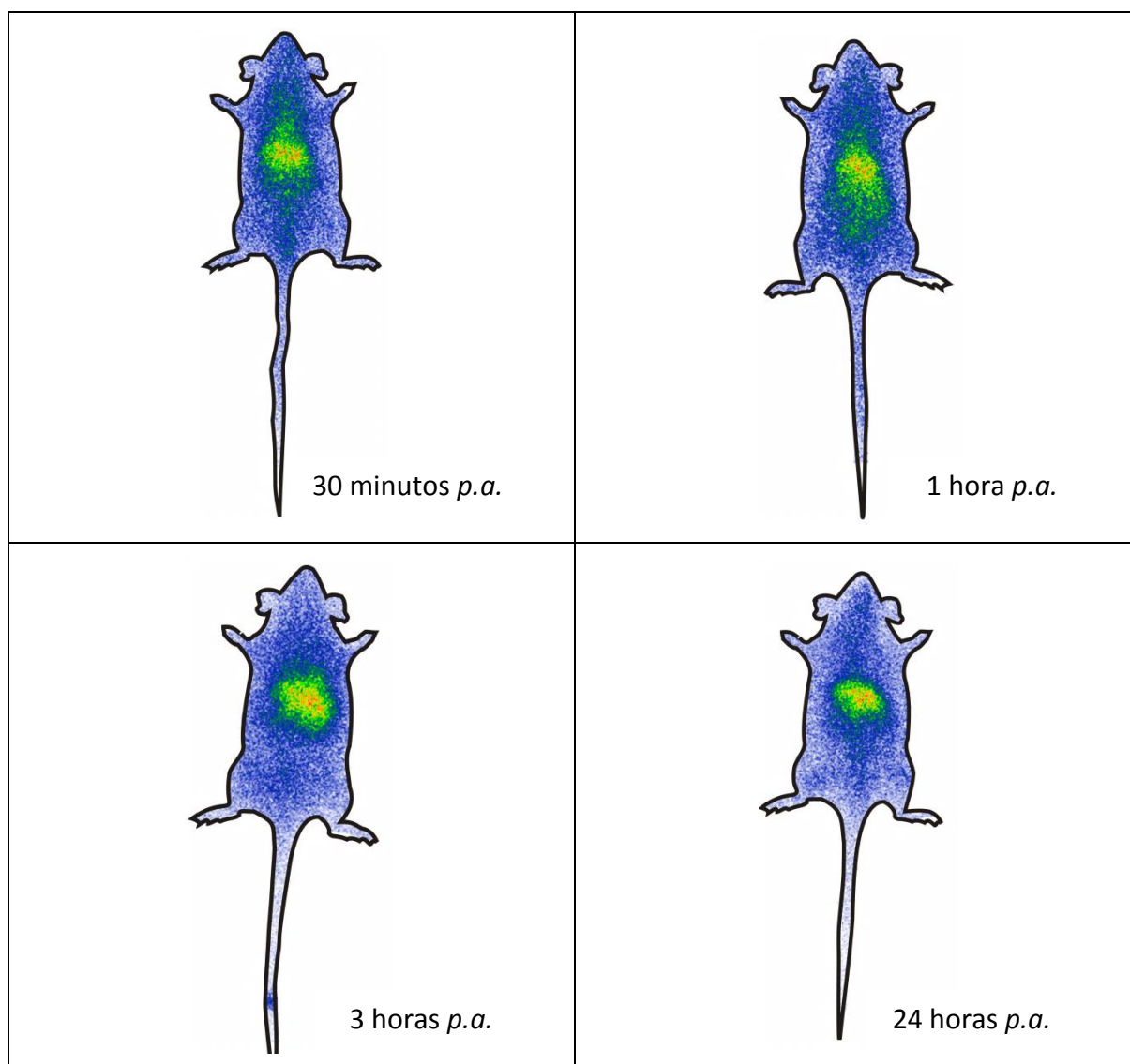


FIGURA 31: Estudos cintilográficos da H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga em camundongos *Swiss* sadios, 30 minutos, 1, 3 e 24 horas após administração *i.v.* (1,85 MBq).

5.16 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO *IN VIVO* DA H2Ac4oFPh-¹¹¹IN E H2Ac4oFPh-⁶⁷GA COM O SÍTIO TUMORAL: ESTUDOS CINTILOGRÁFICOS EM MODELO ANIMAL DE TUMOR CEREBRAL

Para avaliar a capacidade de interação da H2Ac4oFPh-¹¹¹In e H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga com os alvos presentes no tumor cerebral *in vivo*, estudos cintilográficos foram realizados, 1 e 3 h após administração *i.v.* das moléculas radiomarcadas. As imagens adquiridas estão representadas nas FIG. 32 e 33. A captação tumoral de ambas as moléculas foi pouco evidenciada nas imagens cintilográficas devido à alta captação abdominal e conseqüente razão captação abdominal/captação tumoral elevada.

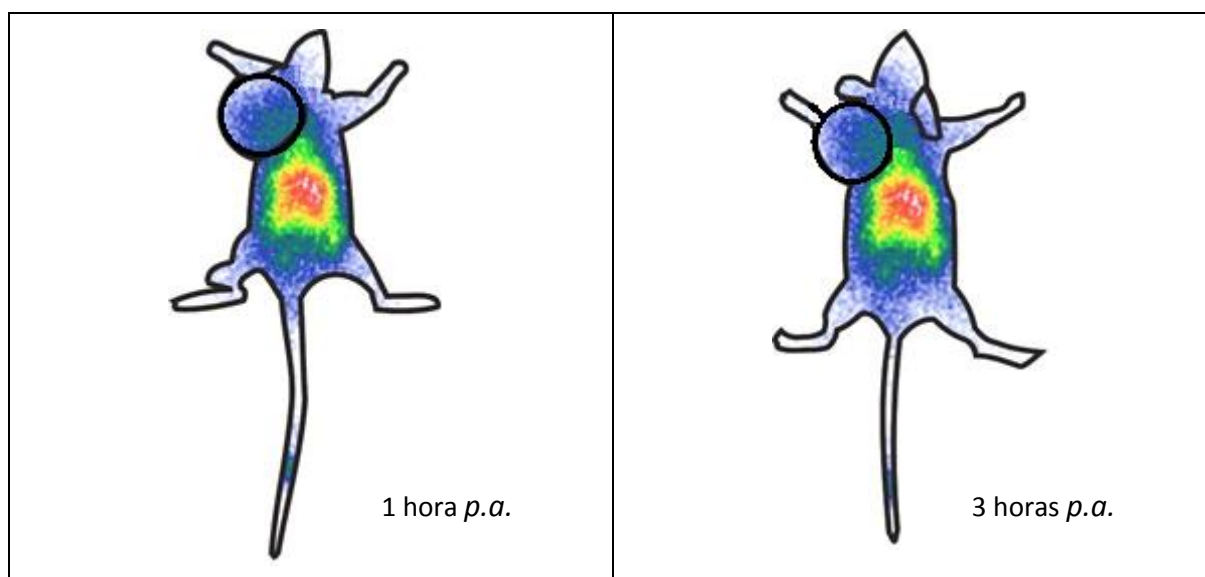


FIGURA 32: Estudos cintilográficos da H2Ac4oFPh-¹¹¹In em modelo animal de tumor cerebral, 1 e 3 horas após administração *i.v.* (1,85 MBq). Região onde o tumor estava localizado está delimitada pelo círculo preto.

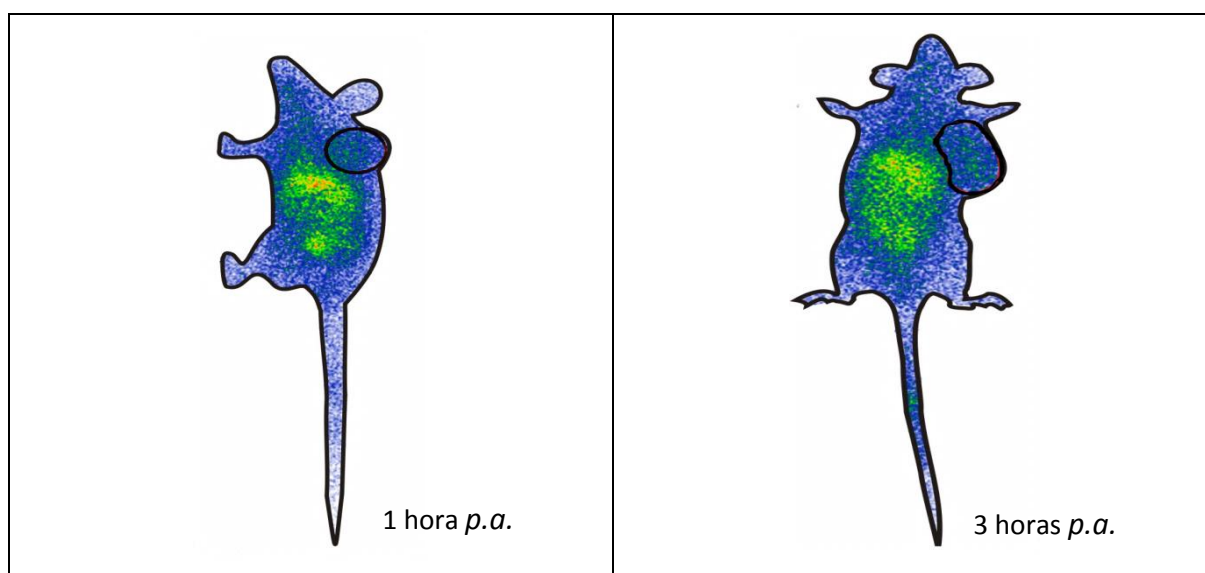


FIGURA 33: Estudos cintilográficos da H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga em modelo animal de tumor cerebral, 1 e 3 horas após administração *i.v.* (1,85 MBq). Região onde o tumor estava localizado está delimitada pelo círculo preto.

Após os estudos cintilográficos, os animais foram eutanasiados e o tumor, o sangue, e os principais órgãos foram dissecados para quantificação da radioatividade.

A atividade presente nos tumores está representada na FIG. 34, 1 e 3 h após a administração, como %AI.g⁻¹. Os resultados obtidos demonstraram que as TSC

radiomarcadas foram captadas pelo tumor cerebral. A captação da H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga ($4,77 \pm 0,8$ %Al.g⁻¹ e $4,79 \pm 0,9$ %Al.g⁻¹; 1 e 3 h após a administração, respectivamente) foi significativamente maior quando comparada com a H2Ac4oFPh-¹¹¹In ($1,03 \pm 0,2$ %Al.g⁻¹ e $1,05 \pm 0,12$ %Al.g⁻¹; 1 e 3 h após a administração, respectivamente). Essa diferença, no entanto, não foi observada no estudo cintilográfico, uma vez que a radiação de fundo observada nos animais administrados com H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga também foi visivelmente maior do que aquela observada em animais administrados com H2Ac4oFPh-¹¹¹In. Não houve diferença na captação, de ambas as moléculas, pelo tumor 1 e 3 h após a administração.

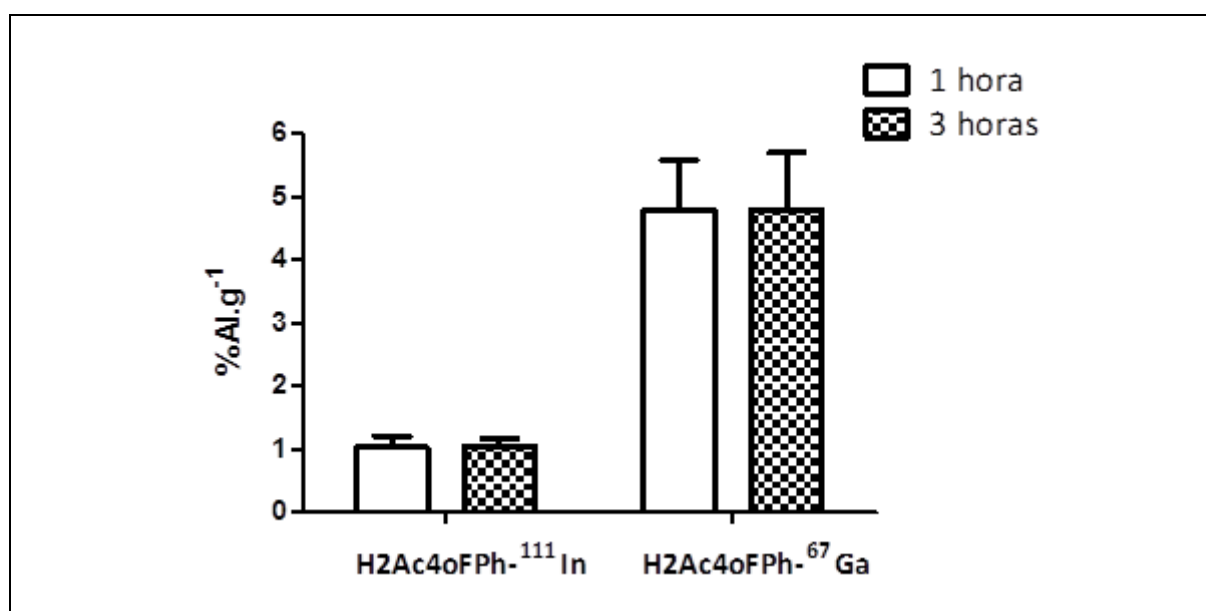


FIGURA 34: Quantificação da captação tumoral da H2Ac4oFPh-¹¹¹In e H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga 1 e 3 horas após a administração *i.v.* (1,85 MBq).

Os perfis de biodistribuição da H2Ac4oFPh-¹¹¹In e H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga, 1 e 3 h após administração *i.v.* em modelo animal de tumor, estão representados nas FIG. 35 e 36, como %Al.g⁻¹. Os perfis de biodistribuição, nos tempos analisados, foram semelhantes àqueles observados nos animais *Swiss* sadios. Porém, as atividades acumuladas em alguns órgãos dos camundongos *Nude*, como fígado, rins e baço, foram cerca de 2 - 3 vezes maiores do que aquelas acumuladas nos órgãos dos camundongos *Swiss*.

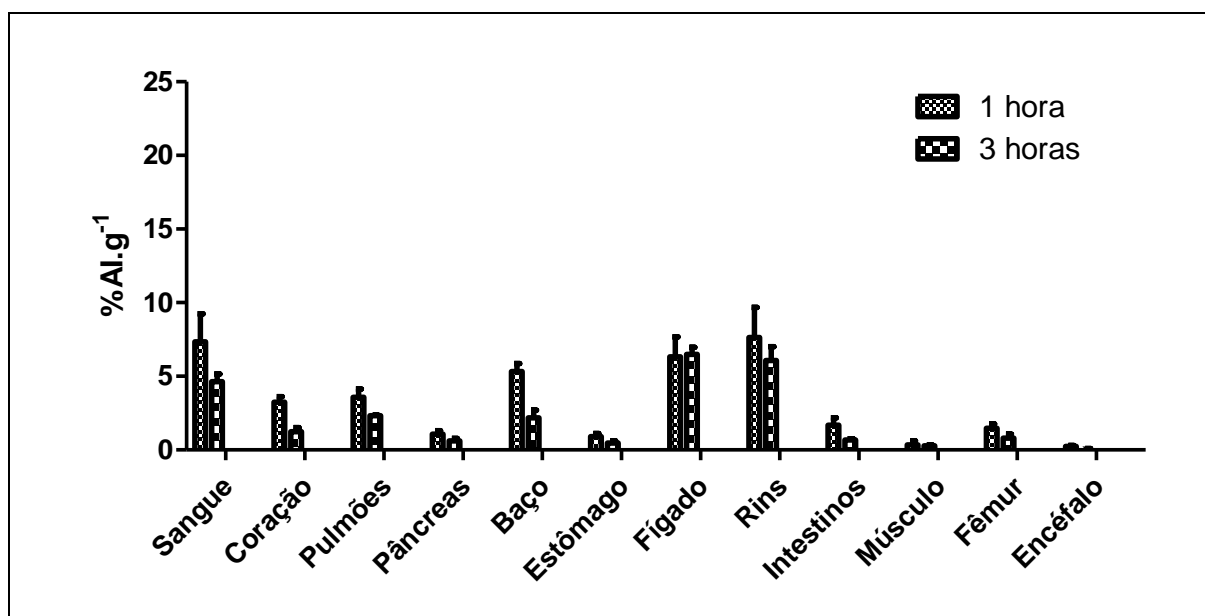


FIGURA 35: Biodistribuição da H2Ac4oFPh-¹¹¹In, em modelo animal de tumor cerebral, 1 e 3 horas após administração *i.v.* (1,85 MBq).

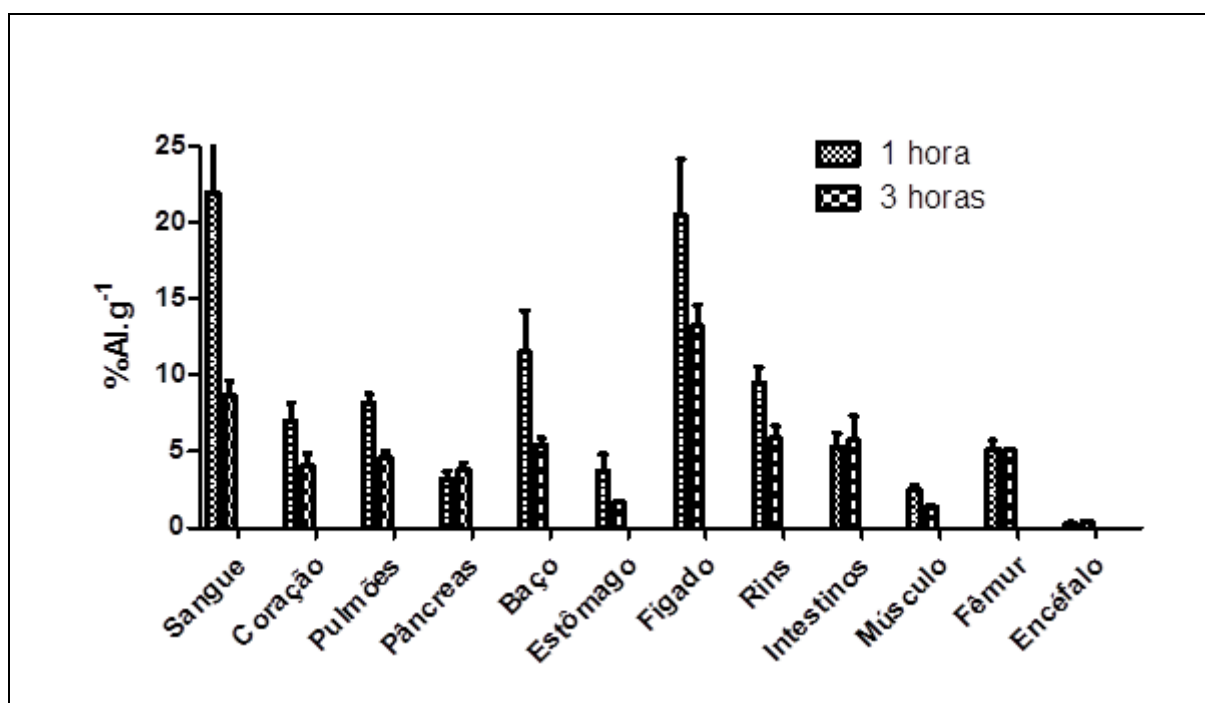


FIGURA 36: Biodistribuição da H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga, em modelo animal de tumor cerebral, 1 e 3 horas após administração *i.v.* (1,85 MBq).

As razões da atividade acumulada no tumor/encéfalo, tumor/músculo e tumor/sangue calculadas, 1 e 3 h após a administração de H2Ac4oFPh-¹¹¹In e H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga, estão apresentadas na TAB. 8. Os resultados demonstraram que, apesar da razão da atividade acumulada no tumor/sangue ter apresentado valores menores que 1, para ambas

as TSC radiomarcadas, as razões tumor/órgão não alvo, representado pelo músculo e encéfalo, foram altas o suficiente para comprovar a existência de diferença significativa entre a captação pelo órgãos não-alvo e a captação pelo tumor. Essa razão, inclusive, tende a aumentar com o passar do tempo chegando a até aproximadamente 19 e 4, para tumor/encéfalo e tumor/músculo, respectivamente, em animais administrados com H2Ac4oFPh-¹¹¹In.

TABELA 8: Razão da atividade acumulada no tumor/órgão não alvo da H2Ac4oFPh-¹¹¹In e H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga, 1 e 3 horas após a administração *i.v.*

Composto	Tempo	Razão da atividade acumulada: tumor/órgão não alvo		
		Encéfalo	Músculo	Sangue
H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In	1 hora	4,42 ± 1,14	1,98 ± 0,17	0,15 ± 0,02
	3 horas	19,78 ± 9,01	3,85 ± 0,99	0,23 ± 0,02
H2AoFc4Ph- ⁶⁷ Ga	1 hora	15,07 ± 2,81	1,82 ± 0,24	0,20 ± 0,03
	3 horas	12,51 ± 1,57	3,50 ± 0,36	0,55 ± 0,06

5.17 CARACTERIZAÇÃO ADICIONAL DA H2Ac4oFPh-¹¹¹IN

A H2Ac4oFPh foi radiomarcada de maneira satisfatória com os radioisótopos ¹¹¹In e ⁶⁷Ga e, ambos os complexos radiometálicos sintetizados apresentaram captação pelo tumor cerebral, *in vivo*. Apesar da biodistribuição e imagens, em modelo animal de tumor, terem apresentado perfil semelhante para as duas TSC radiomarcadas, a H2Ac4oFPh-¹¹¹In apresentou as seguintes vantagens em relação à H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga:

- A reação de radiomarcção da H2Ac4oFPh-¹¹¹In deu origem a um único produto final, diferente da reação de radiomarcção da H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga, que deu origem a dois diferentes produtos, com lipofilicidades distintas;
- H2Ac4oFPh-¹¹¹In apresentou maior atividade específica;
- H2Ac4oFPh-¹¹¹In manteve sua estabilidade, durante as 24 h posteriores à radiomarcção, quando incubada sob refrigeração, diferente da H2Ac4oFPh-⁶⁷Ga, que teve sua estabilidade

ligeiramente reduzida;

- H2Ac4oFPh-¹¹¹In foi mais facilmente removida do sangue e se distribuiu de maneira mais eficaz para os tecidos.

Por essas razões, a H2Ac4oFPh-¹¹¹In foi considerada mais adequada para o propósito deste trabalho e selecionada para a continuidade dos estudos.

5.17.1 DETERMINAÇÃO EXPERIMENTAL DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

O log P experimental da H2Ac4oFPh-¹¹¹In e do radioisótopo livre (¹¹¹InCl₃) está apresentado na TAB. 9. O valor negativo do log P (-1,19 ± 0,06), obtido para o ¹¹¹InCl₃, demonstra que ele apresenta maior afinidade pela fase aquosa, indicando que ele é pouco lipossolúvel. O mesmo não foi observado para a H2Ac4oFPh-¹¹¹In (log P= 0,46 ± 0,08), indicando que ela é mais lipossolúvel e, sob o ponto de vista da lipossolubilidade, é capaz de atravessar facilmente as membranas celulares.

TABELA 9: Coeficiente de partição (log P) (n-octanol : salina) experimental da H2Ac4oFPh-¹¹¹In.

Composto	Coeficiente de partição
¹¹¹ InCl ₃	-1,19 ± 0,06
¹¹¹ In-H2Ac4oFPh	0,46 ± 0,08

5.17.2 ESTUDO DE INTERNALIZAÇÃO *IN VITRO*

Estudos de internalização da H2Ac4oFPh-¹¹¹In foram realizados na linhagem de células tumorais U-87MG e, com o intuito de determinar a especificidade da internalização, os estudos também foram realizados na presença de um excesso molar (100x) da TSC fria.

Os resultados obtidos estão apresentados na FIG. 37 e demonstraram que a fração internalizada da H2Ac4oFPh-¹¹¹In aumentou gradativamente ao longo do tempo atingindo *plateau* de 75 - 80% do total adicionado, 2 h após a incubação. Essa porcentagem se

manteve constante por até 4 h de incubação, quando o ensaio foi finalizado, indicando que além de ser rapidamente internalizada pelas células tumorais, a H2Ac4oFPh-¹¹¹In fica retida no interior das células. A incubação da H2Ac4oFPh-¹¹¹In na presença de um excesso molar da TSC fria, não alterou seu perfil de internalização, sugerindo que não houve competição pela ligação em um determinado receptor específico e que a internalização ocorreu por difusão passiva através da membrana lipídica.

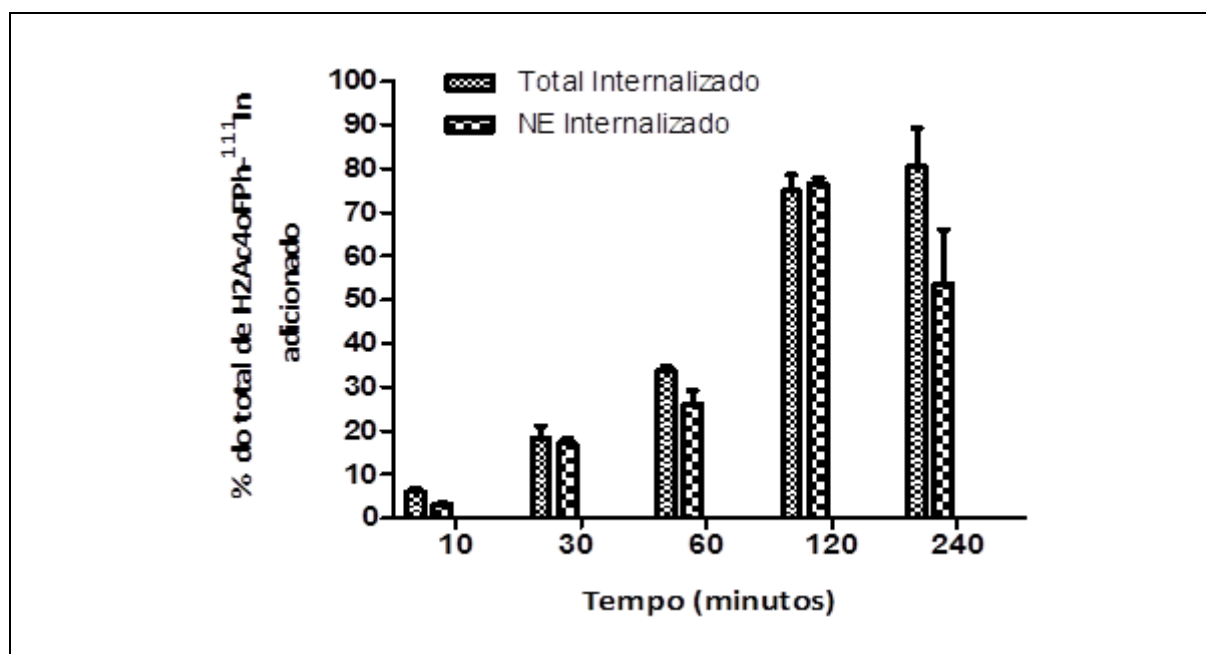


FIGURA 37: Perfil de internalização total e não específica (NE) em função do tempo de incubação com H2Ac4oFPh-¹¹¹In. Resultado expresso em porcentagem do total da TSC radiomarcada adicionada.

5.17.3 DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO EM SORO HUMANO *IN VITRO*

Com o objetivo de avaliar o comportamento da H2Ac4oFPh-¹¹¹In em soro humano, a TSC radiomarcada foi incubada à 37°C, em soro humano fresco, como descrito na metodologia. Os resultados obtidos estão apresentados na FIG. 38 e TAB. 10, e demonstraram que, já após 10 min de incubação em soro humano, cerca de 80% do total da H2Ac4oFPh-¹¹¹In adicionado encontrava-se ligado às proteínas plasmáticas. Essa fração ligada às proteínas permaneceu praticamente inalterada nos demais tempos de incubação analisados. A análise em CLAE, demonstrou que dos 20% da H2Ac4oFPh-¹¹¹In que permanecia livre no plasma, apenas cerca de 2% era correspondente à H2Ac4oFPh-¹¹¹In; o

restante da fração livre no plasma era correspondente ao ^{111}In livre, evidenciando a impureza presente na molécula marcada ($^{111}\text{InCl}_3$ livre) e possivelmente, uma pequena fração de $^{111}\text{In}^{+3}$ que se descomplexou da TSC.

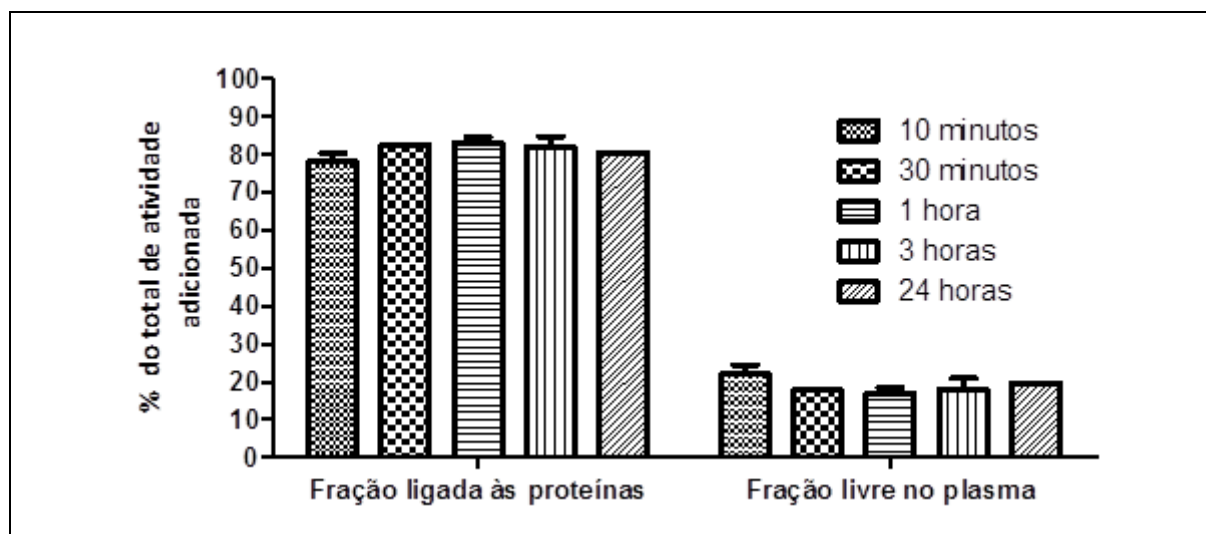


FIGURA 38: Quantificação da H2Ac4oFPh- ^{111}In ligada às proteínas plasmáticas ou livre no plasma.

TABELA 10: Análise em CLAE (método B) da H2Ac4oFPh- ^{111}In livre após diferentes tempos de incubação em soro humano (% do total adicionado).

Composto	Tempo de incubação				
	10 min.	30 min.	1 hora	3 horas	24 horas
H2Ac4oFPh- ^{111}In livre no soro	1,0 ± 1,0%	nd	2,0 ± 0,0%	nd	1,5 ± 0,5%

5.17.4 ESTUDO CINTILOGRÁFICO DA H2Ac4oFPh- ^{111}In E $^{111}\text{InCl}_3$ EM CAMUNDONGOS SWISS SADIOS: ANÁLISE COMPARATIVA

Com o intuito de avaliar se a biodistribuição da H2Ac4oFPh- ^{111}In se distingue da biodistribuição do $^{111}\text{InCl}_3$, 50 μCi (1,85 MBq) do radioisótopo livre foi administrado em camundongos *Swiss* sadios que, 1, 3 e 24 h após a administração, foram utilizados para estudos de imagem cintilográfica. As imagens adquiridas foram comparadas àquelas obtidas de animais administrados com a TSC radiomarcada. Esta análise permitiu determinar se a

imagem era realmente característica da TSC radiomarcada ou se representava, apenas, a biodistribuição do $^{111}\text{InCl}_3$ livre que, ocasionalmente, poderia se desligar da TSC.

As imagens adquiridas estão representadas na FIG. 39 e mostraram nítida distinção entre a biodistribuição do $^{111}\text{InCl}_3$ e $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oFPh-}^{111}\text{In}$, em todos os tempos analisados. Este resultado é bastante satisfatório e indica que $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oFPh}$ mantém sua estabilidade e não se descomplexa facilmente do radiometal.

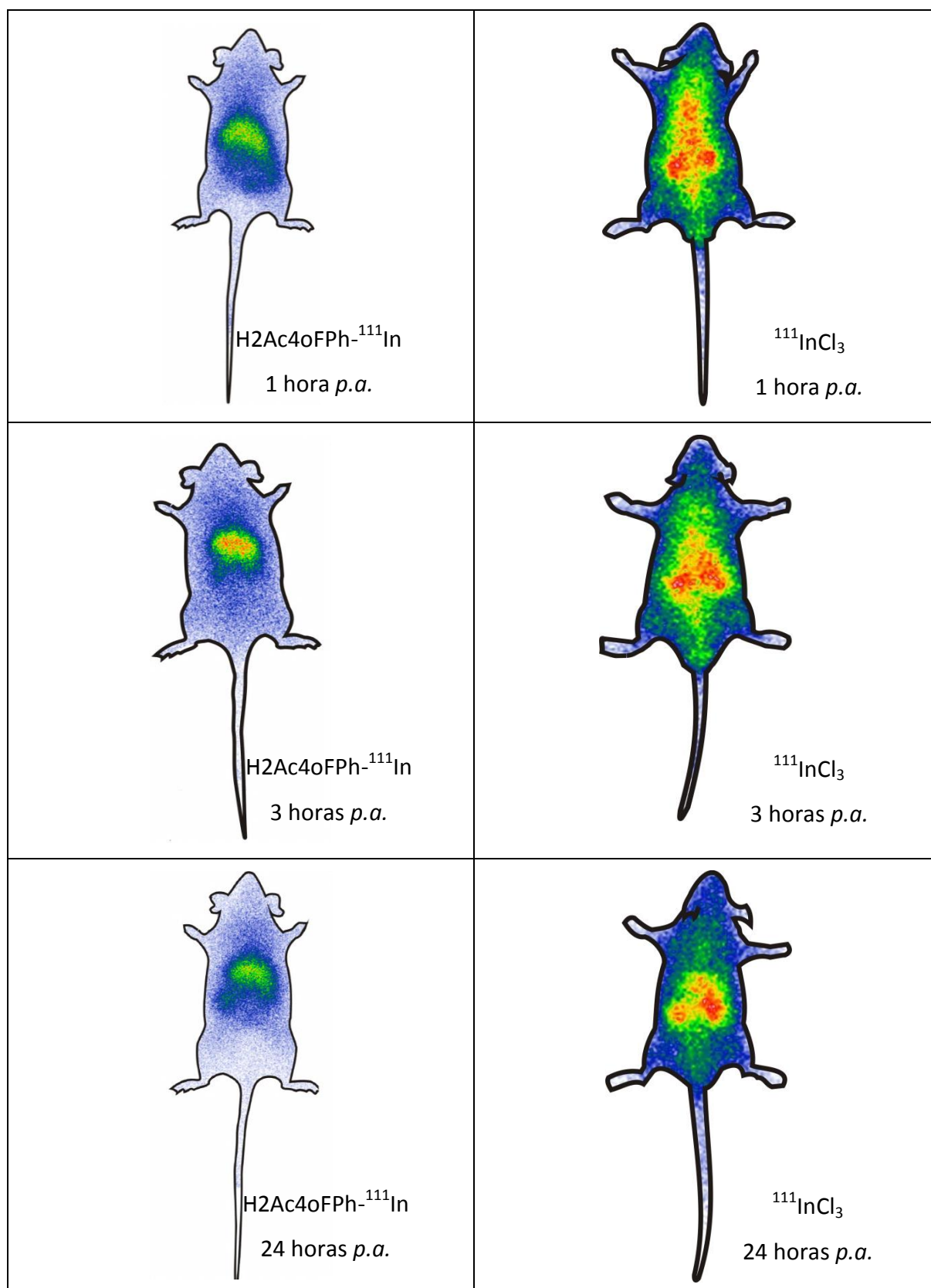


FIGURA 39: Análise comparativa das imagens cintilográficas obtidas 1, 3 e 24h após administração *i.v* de H2Ac4oFPh-¹¹¹In ou ¹¹¹InCl₃ (1,85 MBq) em animais *Swiss* sadios.

5.17.5 ESTUDOS CINTILOGRÁFICOS EM MODELO ANIMAL DE TUMOR CEREBRAL, 24 E 48 HORAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA (i.v).

Estudos cintilográficos foram realizados 24 e 48 h após a administração intravenosa da H2Ac4oFPh-¹¹¹In. Os resultados obtidos estão representados na FIG. 40 e demonstraram que as imagens tardias apresentaram redução significativa da radiação de fundo e, como consequência, foi possível observar maior distinção entre a captação tumoral e a captação pelos órgãos adjacentes. A captação abdominal permaneceu alta quando comparada à captação tumoral e demais regiões do corpo.

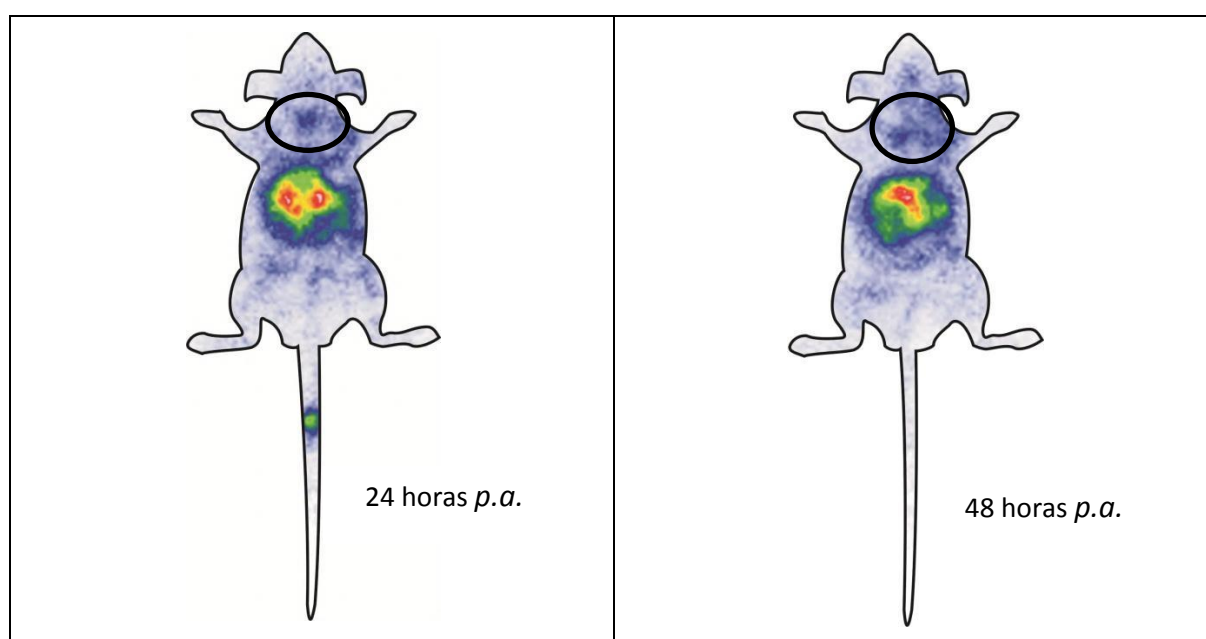


FIGURA 40: Estudos cintilográficos da H2Ac4oFPh-¹¹¹In em modelo animal de tumor cerebral, 24 e 48 horas após administração i.v. (1,85 MBq). Região onde o tumor estava localizado está delimitada pelo círculo preto.

Após os estudos cintilográficos, os animais foram eutanasiados e o tumor, o sangue, e os principais órgãos foram dissecados para quantificação da radioatividade. A atividade presente nos tumores está representada na FIG. 41, como %AI.g⁻¹. A %AI.g⁻¹ observada 3 h após administração foi projetada na mesma figura a título de comparação. Os resultados obtidos demonstraram que a concentração de H2Ac4oFPh-¹¹¹In no tumor aumentou até 24 h após administração atingindo, aproximadamente, 1,5% da AI.g⁻¹. Quarenta e oito horas após administração a concentração retornou ao valor observado 3 h após administração, restando ainda aproximadamente 1% da AI.g⁻¹.

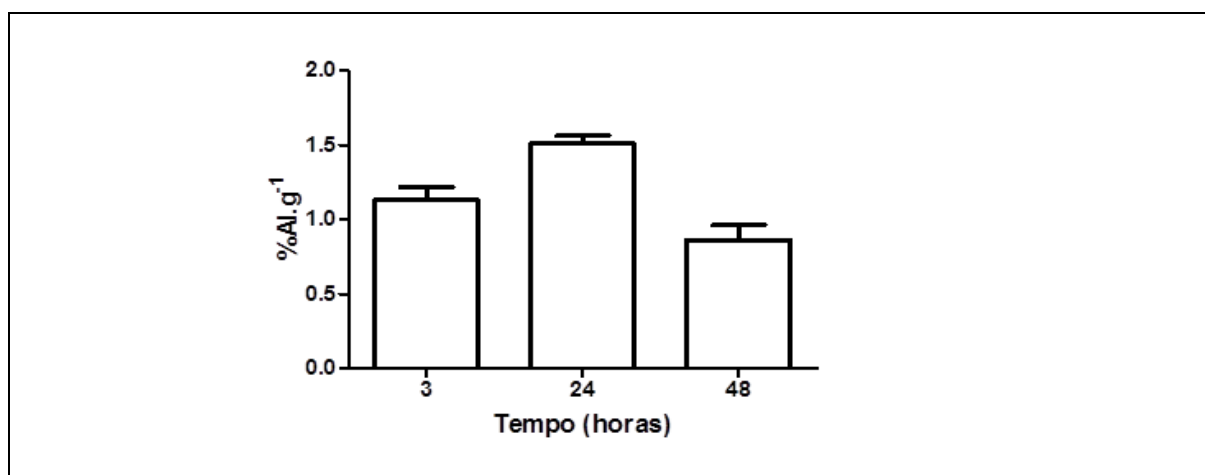


FIGURA 41: Quantificação da captação tumoral da H2Ac4oFPh-¹¹¹In 3, 24 e 48 horas após a administração *i.v.* (1,85 MBq).

A atividade de H2Ac4oFPh-¹¹¹In presente nos principais órgãos dos animais, 24 e 48 h após administração *i.v.*, estão representados na FIG. 42, como %AI.g⁻¹. Nestes tempos tardios, uma fração considerável da atividade injetada encontrava-se acumulada no fígado, rins e baço, órgãos que, provavelmente, foram responsáveis pela alta retenção abdominal da H2Ac4oFPh-¹¹¹In observada nas imagens cintilográficas.

As razões da atividade acumulada no tumor/encéfalo, tumor/músculo e tumor/sangue calculadas, 24 e 48 h após a administração de H2Ac4oFPh-¹¹¹In, estão apresentadas na TAB. 11. As razões tumor/músculo e tumor/encéfalo, permaneceram tão altas quanto aquelas observadas 1 e 3 h após administração. No entanto, a razão tumor/sangue foi cerca de 2 vezes maior do que aquela observada nos tempos iniciais pós-administração. O aumento dessa razão foi, certamente, responsável pela maior distinção entre a captação tumoral e a captação pelos órgãos adjacentes observada nas imagens e citada anteriormente.

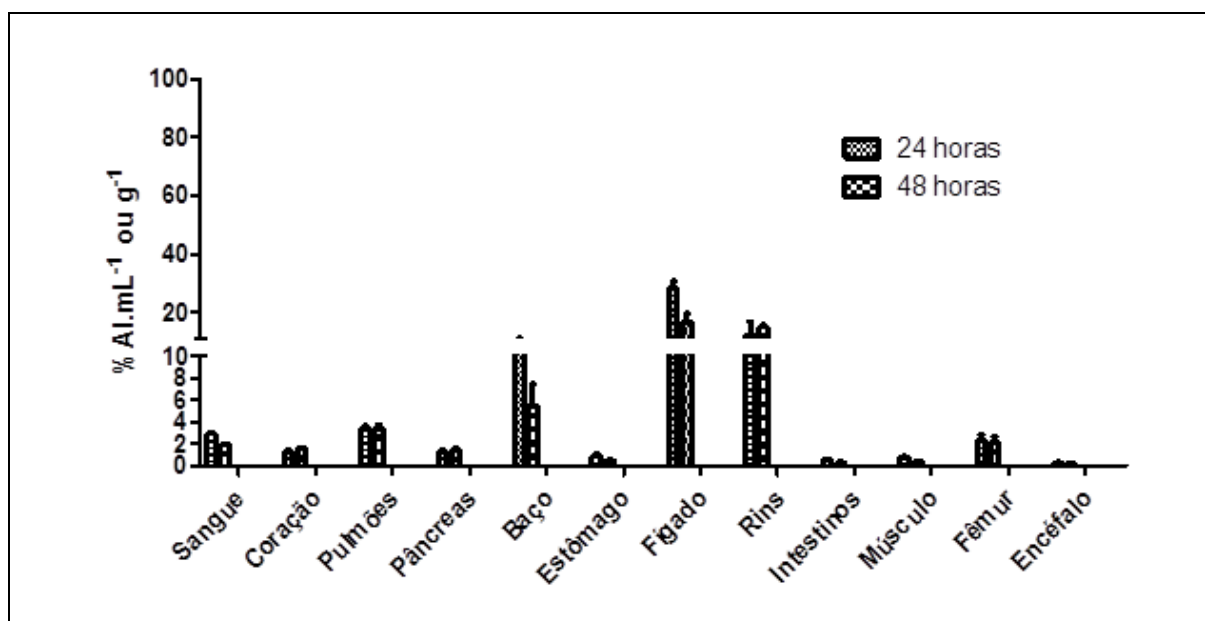


FIGURA 42: Biodistribuição da H2Ac4oFPh-¹¹¹In, em modelo animal de tumor cerebral, 24 e 48 horas após administração *i.v.* (1,85 MBq).

TABELA 11: Razão da atividade acumulada no tumor/órgão não alvo da H2Ac4oFPh-¹¹¹In, 24 e 48 horas após administração *i.v.*

Composto	Tempo	Razão: tumor/órgão não alvo		
		Encéfalo	Músculo	Sangue
H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In	24 horas	21,12 ± 5,6	1,90 ± 0,28	0,52 ± 0,03
	48 horas	16,50 ± 7,1	2,43 ± 0,43	0,46 ± 0,04

5.17.6 ESTUDOS CINTILOGRÁFICOS EM MODELO ANIMAL DE TUMOR CEREBRAL, APÓS ADMINISTRAÇÃO POR VIA INTRATUMORAL (I.T.)

Para avaliar a retenção da H2Ac4oFPh-¹¹¹In pelas células de tumor cerebral (U-87MG) *in vivo*, obtendo assim a estimativa da sua potencialidade para uso em terapia local complexada a emissores de partículas, a TSC radiomarcada foi injetada em modelo animal de tumor por via intratumoral. Diferentes tempos após a administração (3, 24 e 48 h), imagens cintilográficas foram obtidas e estão representadas na FIG. 43.

As imagens obtidas demonstraram que H2Ac4oFPh-¹¹¹In penetrou e se distribuiu

rapidamente já 3 h após a administração, quando a primeira imagem foi obtida. Como esperado, a distribuição da dose foi reduzindo gradativamente com a aproximação da região periférica do tumor, em todos os tempos analisados, e a atividade depositada na região do tumor foi visivelmente maior do que aquela observada nas demais regiões do corpo dos animais, mesmo 48 h após administração.

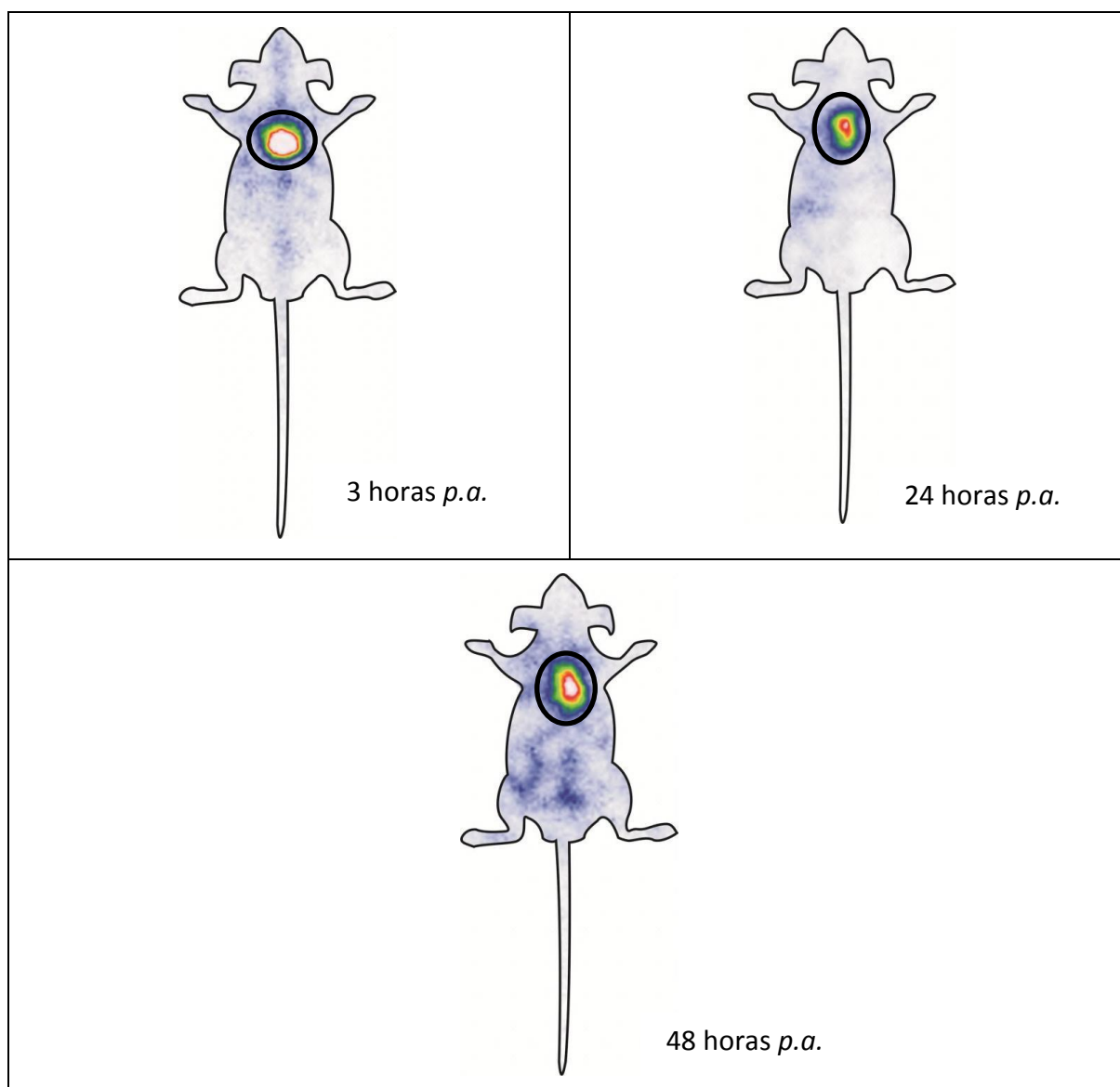


FIGURA 43: Estudos cintilográficos da H2Ac4oFPh-¹¹¹In em modelo animal de tumor cerebral, 3, 24 e 48 horas após administração *i.t.* (1,85 MBq). Região onde o tumor estava localizado está delimitada pelo círculo preto.

Após os estudos cintilográficos, os animais foram eutanasiados e o tumor, o sangue, e os principais órgãos foram dissecados para quantificação da radioatividade. A atividade

presente nos tumores está representada nas FIG. 44 como $\%AI.g^{-1}$. Os resultados obtidos demonstraram que a administração intratumoral aumentou consideravelmente a atividade no tumor: cerca de 80% da $\%AI.g^{-1}$ ficou retida no tumor por até 24 h após a administração e, 48 h após a administração, ainda houve retenção significativa, atingindo aproximadamente 40% da $\%AI.g^{-1}$.

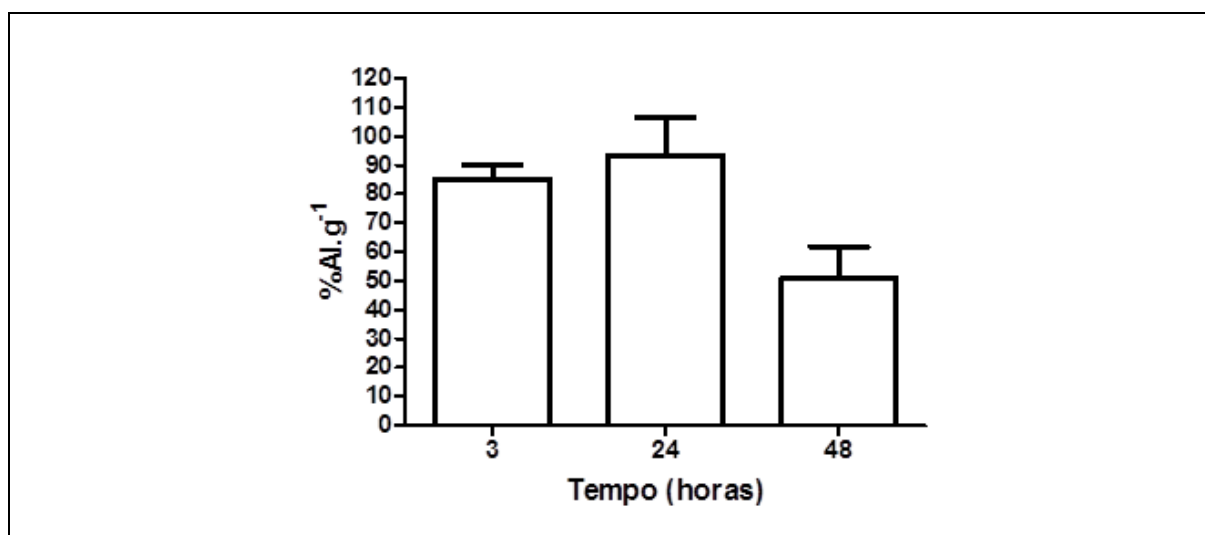


FIGURA 44: Quantificação da captação tumoral da H2Ac4oFPh-¹¹¹In 3, 24 e 48 horas após a administração *i.t.*

A atividade de H2Ac4oFPh-¹¹¹In presente nos principais órgãos dos animais, 3, 24 e 48 h após administração *i.t.*, estão representados na FIG. 45, como $\%AI.g^{-1}$. A injeção intratumoral, além de promover maior retenção da AI no tumor, reduziu a atividade acumulada nos órgãos, principalmente naqueles mais críticos sob o ponto de vista dosimétrico, como fígado e rins. A atividade presente no fígado e rins reduziu, 48 h após a administração *i.t.*, cerca de 9 e 1,3 vezes, respectivamente.

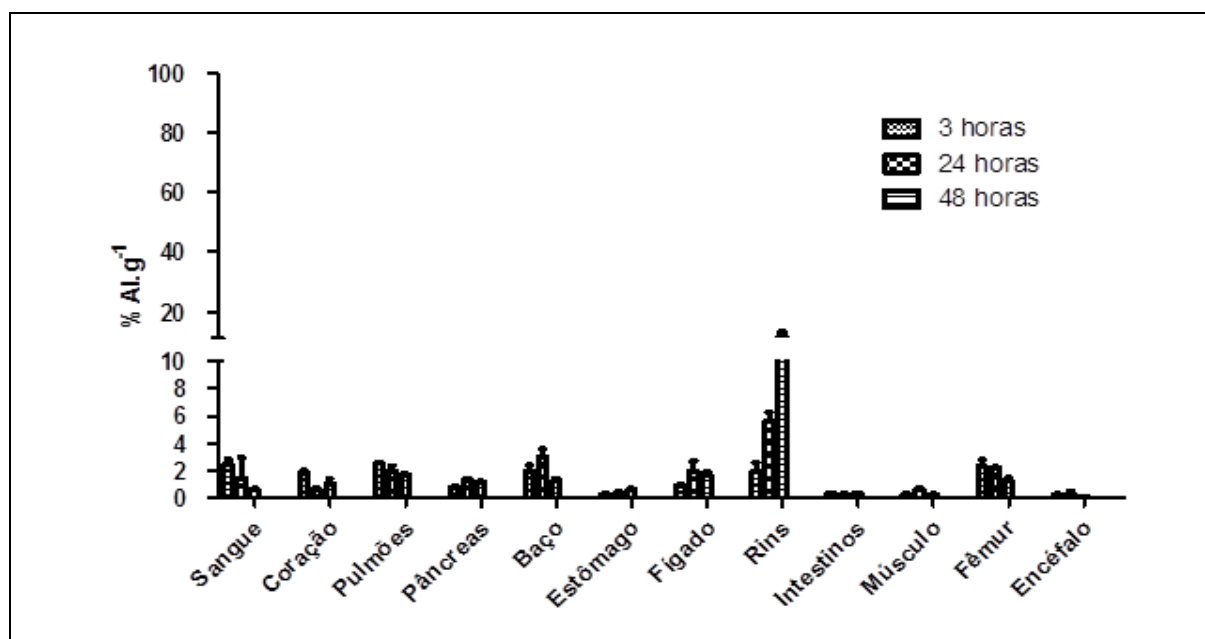


FIGURA 45: Biodistribuição da H2Ac4oFPh-¹¹¹In, em modelo animal de tumor cerebral, 3, 24 e 48 horas após administração *i.t.* (1,85 MBq).

As razões da atividade acumulada tumor/encéfalo, tumor/músculo e tumor/sangue calculadas, 3, 24 e 48 h após a administração de H2Ac4oFPh-¹¹¹In, estão apresentadas na TAB. 12. Os valores foram superiores, em todos os tempos testados, àqueles obtidos após injeção intravenosa. Quarenta e oito horas após administração, os valores foram cerca de 28, 85 e 185 vezes maiores do que as razões tumor/encéfalo, tumor/músculo e tumor/sangue, respectivamente. Estes resultados são bastante promissores e indicam que a TSC estudada apresenta difusão e retenção tumoral adequadas para tratamento local de glioblastoma.

TABELA 12: Razão da atividade acumulada no tumor/órgão não alvo da H2Ac4oFPh-¹¹¹In, 3, 24 e 48 horas após administração *i.t.*

Composto	Tempo	Razão: tumor/órgão não alvo		
		Encéfalo	Músculo	Sangue
H2Ac4oFPh- ¹¹¹ In	3 horas	460,88 ± 28,30	489,34 ± 32,99	35,51 ± 7,88
	24 horas	507,00 ± 46,04	159,60 ± 41,78	36,09 ± 6,31
	48 horas	462,31 ± 58,90	207,11 ± 59,95	85,09 ± 16,77

6

DISCUSSÃO

O câncer mata milhões de pessoas todos os anos e, atualmente, já é considerado um evidente problema de saúde pública mundial (INCA, 2012). Um grande número de quimioterápicos encontra-se disponível para aplicação clínica em terapia oncológica, porém, a resistência de alguns tipos de câncer e a toxicidade para as células normais são apontadas como as principais causas da falha terapêutica e aumento da mortalidade promovida por essa doença. Sendo assim, o desenvolvimento de substâncias com baixa toxicidade e com potencial terapêutico, é a principal ferramenta na tentativa de aumentar a sobrevida dos pacientes e garantir a segurança e eficácia do tratamento.

As tiossemicarbonas constituem uma classe de compostos sintéticos com diversas atividades biológicas, incluindo atividade antitumoral (Feun et al., 2002; Mendes et al., 2009). Apesar de vários estudos demonstrarem o grande potencial das TSC como agentes terapêuticos, diferentes modificações químicas realizadas em moléculas pertencentes a essa classe indicam novas possibilidades para aplicações e ainda necessitam de estudos aprofundados. Por esse motivo, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a potencial aplicação de diferentes derivados de 2-acetilpiridina N-4 fenil tiossemicarbonas (H2Ac4Ph) para terapia oncológica.

Todos os derivados de H2Ac4Ph testados foram citotóxicos de forma dose-dependente para linhagens de células de tumor de mama e cerebrais, com IC₅₀ na ordem de nanomolar. Além disso, as TSC testadas se mostraram mais potentes do que o etoposídeo, antineoplásico bastante utilizado na clínica médica, e não induziram hemólise em concentrações menores que 10000 nM. A linhagem de tumor de mama apresentou maior sensibilidade à grande maioria dos compostos, quando comparada com as duas linhagens de glioblastoma. No entanto, não foi observada diferença significativa na taxa de sobrevivência

das células U-87MG e T98-G tratadas, sugerindo que a mutação na proteína p53, presente nas células T98-G, não interfere na citotoxicidade induzida pelas TSC.

Em geral, os compostos que possuem o halogênio na posição orto foram mais potentes do que seus respectivos isômeros com halogênio na posição meta ou para do grupo fenila e, o composto que possui o nitro na posição para foi o menos potente dentre todos os compostos testados. H2Ac4oFPh e H2Ac4oClPh apresentaram a maior atividade antitumoral, sugerindo que a adição de cloro ou flúor na posição orto do grupo fenila é uma boa estratégia para aumentar a citotoxicidade de H2Ac4Ph.

A inserção de halogênios em moléculas com propriedades terapêuticas, em geral, promove o aumento da permeabilidade à membrana plasmática, proporciona maior estabilidade à molécula e favorece as interações eletrostáticas que garantem maior afinidade com o alvo. Diversos artigos científicos e patentes relacionados à química medicinal tratam da inserção de halogênios durante a síntese final dos compostos, principalmente de flúor e cloro (Hernandes et al., 2010). Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com esses artigos e patentes que demonstram os benefícios da inserção de flúor e cloro nas moléculas candidatas a fármacos.

Em estudo recente, publicado pelo nosso grupo de pesquisa (Soares et al., 2012), foi realizada a avaliação da relação estrutura-atividade (REA), dos 13 diferentes derivados de TSC testados no presente trabalho. O objetivo desse estudo foi identificar, por meio de cálculos teóricos, as propriedades estéricas e eletrônicas envolvidas na atividade antitumoral das TSC. A área superficial molecular, o coeficiente de partição teórico (octanol-água), o momento dipolo e as energias do HOMO e LUMO foram correlacionadas com o pIC50 (-logIC50) obtido para cada composto. Os resultados obtidos demonstraram que quanto menor a área superficial molecular, maior citotoxicidade dos compostos para as células tumorais. Também foi encontrada correlação direta entre a energia do HOMO e a atividade antitumoral dos compostos para células U-87MG e MCF-7, o que representa um resultado interessante, uma vez que a energia do HOMO está diretamente relacionada com a reatividade da molécula. Além disso, a correlação entre a citotoxicidade e a carga do átomo de enxofre indicou que, quanto mais negativamente carregado estiver este átomo, maior é o efeito citotóxico da TSC.

As diversas atividades biológicas das TSC também são relacionadas à capacidade destes compostos atuarem como quelantes de metais, inibindo a ação fisiológica de algumas

metaloproteínas celulares (French et al., 1966) e, conseqüentemente, induzindo as células à morte.

As células tumorais tratadas com os derivados de H2Ac4Ph apresentaram alterações morfológicas bastante visíveis tais como: irregularidades na membrana plasmática, redução do volume citoplasmático, formação de *blebs*, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos. Além disso, o tratamento com TSC não induziu alteração da integridade de membrana das células e promoveu a externalização de fosfatidilserina. Todas essas características indicam que, após serem tratadas com as TSC, as células tumorais são induzidas à morte por apoptose.

Alguns autores também demonstraram que as TSC são capazes de induzir a morte apoptótica em células tumorais. Yuan e colaboradores (2004) demonstraram que a di-2 piridilcetona-4,4 dimetil-3 tiossemicarbazona (Dp44mT) apresentou atividade antitumoral seletiva e foi capaz de induzir a apoptose em células de câncer de pulmão. Estes autores demonstraram, ainda, que a apoptose induzida pela Dp44mT é mediada pela liberação de citocromo c da mitocôndria e posterior ativação de caspases (Yuan et al., 2004).

Foi possível observar, também, que as células tratadas com os derivados de H2Ac4Ph apresentaram compartimentos citoplasmáticos ácidos característicos do processo de morte autofágica, sugerindo que, assim como os quimioterápicos cisplatina e etoposídeo (Baskic et al., 2006; Lee et al., 2007), as TSC são capazes de induzir apoptose e autofagia das células tumorais. De fato, é sabido que apoptose e autofagia podem ocorrer mutuamente promovendo a morte (Gozuacik et al., 2004). No entanto, testes mais específicos, como a quantificação da proteína autofágica LC3, são necessários para confirmar a hipótese de morte autofágica.

A confirmação dessa hipótese poderá aumentar, ainda mais, as chances de as TSC em estudo serem consideradas protótipos promissores para utilização como quimioterápicos antitumorais. Isso porque, aparentemente, o sucesso do tratamento quimioterápico não depende apenas da indução da apoptose, principalmente em tumores resistentes a esse tipo de morte. A indução alternativa de outro tipo de morte, como a autofagia, pode certamente representar novas possibilidades para um tratamento antitumoral mais eficaz (de Bruin et al., 2008).

O mecanismo de ação de vários quelantes de metais é dependente não só da

quelação propriamente dita, mas também da capacidade do complexo quelante-metal em formar espécies reativas de oxigênio (ROS). Na sua forma reduzida, o complexo pode reagir com o oxigênio molecular promovendo a geração de ROS e induzindo dano de biomoléculas celulares essenciais (Jansson et al., 2010b). No entanto, os danos promovidos pelas ROS não matam as células diretamente. Eles desencadeiam uma cascata de sinalização celular que induz a morte por apoptose (Ozben, 2007). A peroxidação de lipídios de membrana (PL) é consequência inevitável do estresse oxidativo induzido por ROS e desempenha papel crucial na sinalização induzida por elas. A oxidação de ácidos graxos leva à geração de peróxidos lipídicos que, então, iniciam uma reação em cadeia, destruindo a membrana plasmática e de organelas, e promovendo a morte subsequente (Yang et al., 2003).

O tratamento com a H2Ac4oFPh aumentou significativamente a geração ROS e a peroxidação lipídica nas células de glioblastoma, sugerindo que o estresse oxidativo induzido pela TSC é responsável, ao menos em parte, pela apoptose induzida por essa TSC. Estes resultados estão de acordo com diversos trabalhos que demonstraram a correlação positiva entre a geração de ROS e efeito antitumoral de diferentes classes de TSC (Shao et al., 2006; Jansson et al., 2010a; Hancock et al., 2011; Stefani et al., 2011). Além disso, estes resultados também demonstram que, diferente do que se pensava inicialmente, a remoção do ferro de enzimas importantes para a fisiologia celular não é a única responsável pelo efeito antitumoral das TSC. O efeito redox do complexo metálico de TSC formado também é responsável, ao menos em parte, por este efeito.

Vários mecanismos podem estar envolvidos na apoptose induzida por ROS: danos no DNA, induzidos por ROS, podem resultar na ativação de p53 e induzir apoptose mediada por essa proteína (Ott et al., 2007); ROS também podem ativar a via de sinalização ASK1/JNK e desencadear a apoptose (Circu et al., 2010), além de poderem gerar poros nas membranas mitocondriais promovendo a liberação de citocromo c e induzindo este tipo de morte (Fruehauf et al., 2007; Fogg et al., 2011).

Estudos recentes demonstraram que a sinalização da apoptose mediada por ROS pode estar associada à diminuição dos níveis de glutathiona celular (L-γ-glutamil-L-cisteinil-glicina, GSH) e consequente perda de equilíbrio redox celular. A GSH é o tiol intracelular mais abundante, e está envolvido em muitas funções celulares, incluindo defesa antioxidante que ocorre por meio da interação direta com ROS ou por meio de atividades enzimáticas, como de GSH peroxidases e GSH-S-transferases (Fruehauf et al., 2007). A GSH desempenha um

papel essencial na manutenção do ambiente redox intracelular. Ela é predominantemente presente na sua forma reduzida, GSH, que também é a forma biologicamente ativa. Porém, em condições de estresse oxidativo, ela é oxidada (GSSG) resultando em diminuição da razão GSH/GSSG (Circu et al., 2010). O desequilíbrio da razão GSH/GSSG, mais especificamente o aumento da GSSG, precede, cineticamente, a perda da integridade mitocondrial, liberação de citocromo-c e ativação da caspase-3 (Circu et al., 2008).

Yu e colaboradores (2011) demonstraram que a di-2-piridilcetona-4,4-dimetil-3-TSC e a 2-benzoilpiridina-4,4-dimetil-3-TSC são capazes de reduzir a razão GSH/GSSH em células tumorais. Estudos mais aprofundados são necessários para comprovar se sinalização da apoptose mediada por ROS, em células tratadas com H2Ac4oFPh, está associada à diminuição dos níveis de glutathiona celular.

Os bons resultados obtidos nos estudos *in vitro* estimularam a avaliação do efeito antitumoral da H2Ac4oFPh *in vivo*, entretanto, a avaliação da tolerância ao tratamento com a máxima concentração solúvel em solução veículo (5 mg.kg^{-1}) foi realizada previamente a este estudo. Com o intuito de potencializar o efeito antitumoral sem, no entanto, promover efeitos tóxicos elevados, o tratamento foi realizado durante quatro dias consecutivos, totalizando 20 mg.kg^{-1} de TSC por animal, administrados por via subcutânea. O tratamento não induziu alterações comportamentais, perda de massa corporal ou morte dos animais tratados, indicando que poderia ser utilizado, com segurança, nos testes para avaliação do seu efeito antitumoral *in vivo*.

Este mesmo tratamento foi, então, testado em modelo animal de tumor cerebral por meio de dois protocolos distintos: o protocolo 1, no qual o tratamento foi iniciado 6 dias após o implante, quando ainda não havia massa tumoral mensurável, e o protocolo 2, no qual o tratamento foi iniciado 10 dias após o implante, quando já era possível identificar massa tumoral em crescimento. Apesar da H2Ac4oFPh ter apresentado potente atividade antitumoral *in vitro*, este efeito terapêutico não pôde ser observado, com tamanha eficácia, *in vivo*, com os protocolos de terapia utilizados.

Em ambos os protocolos de tratamento foi observada a tendência à redução da taxa de crescimento tumoral nos animais tratados com a TSC, nos primeiros dias após o fim do tratamento. No entanto, ao final do experimento, não foi observada diferença estatística entre o volume tumoral dos animais controle e tratados com a TSC.

A tendência à redução da taxa de crescimento tumoral foi bastante visível,

principalmente nos animais tratados de acordo com o protocolo 1, indicando que o tratamento com a TSC é mais eficaz quando utilizado em tumores ainda em estágio inicial de desenvolvimento e sugerindo que, se a terapia tivesse sido continuada por tempo prolongado, resultados mais satisfatórios poderiam ter sido obtidos. Outros diferentes protocolos de tratamento variando a dose, o tempo do início do tratamento, a duração do tratamento ou até mesmo utilizando a H2Ac4oFPh como adjuvante ou neoadjuvante a outras formas de terapia, devem ser testados a fim de se obter melhores resultados. Barker e colaboradores (2006) demonstraram recentemente que o tratamento de glioblastoma com a Triapina, *in vivo*, pode ser significativamente otimizado quando associado à radioterapia. Possivelmente, essa poderá ser uma boa estratégia para intensificar o efeito antitumoral da H2Ac4oFPh.

Além de avaliar a aplicação dos derivados de 2-acetilpiridina N-4 fenil TSC para terapia oncológica, esse trabalho também teve como objetivo avaliar a possível aplicação desses derivados em diagnóstico oncológico. Isso porque a falta de diagnósticos precoces e precisos também tem sido relacionada ao aumento da mortalidade provocado pelo câncer, o que justifica a pesquisa de novas moléculas para esse propósito. Para isso, sondas radioativas da H2Ac4oFPh foram sintetizadas, utilizando os radioisótopos ^{111}In e ^{67}Ga como radiotraçadores. As possíveis alterações na eficiência da marcação promovidas pela presença do flúor no grupo fenila da molécula também foram avaliadas por meio da radiomarkação da H2Ac4Ph.

A H2Ac4oFPh foi radiomarcada com sucesso apresentando atividade específica e pureza radioquímica adequadas. Essa TSC demonstrou ser um excelente quelante para os radiometais ^{111}In e ^{67}Ga e apresentou estabilidade e pureza radioquímica significativamente maiores do que os compostos formados a partir da radiomarkação da H2Ac4Ph, sugerindo que a presença do flúor na posição orto do grupo fenila da molécula favorece a complexação da TSC com os radiometais. A inserção de halogênios, como o flúor, em compostos orgânicos pode promover alterações volumétricas, conformacionais e permitem estabelecer ligações inter- e intramoleculares que são favoráveis às interações eletrostáticas (Hernandes et al., 2010). Essas alterações, certamente, foram responsáveis pelos melhores resultados obtidos na complexação da H2Ac4oFPh com os radiometais, quando comparados com a H2Ac4Ph.

É importante enfatizar que, apesar do tempo de reação entre H2Ac4oFPh e os radiometais ter sido padronizado em 30 min, a TSC pôde ser rapidamente radiomarcada.

Poucos segundos após a mistura dos reagentes já era possível observar a formação de um composto amarelado (dado não mostrado), característico da complexação entre TSC e metais (Chan et al., 2010). Além disso, o aumento da temperatura de reação não promoveu o aumento da pureza radioquímica dos compostos radiomarcados. Estes resultados são bastante interessantes e merecem atenção especial. Eles demonstram que H2Ac4oFPh se complexa facilmente com ^{111}In e ^{67}Ga , sem necessidade de aquecimento ou incubação por longo período de tempo, o que representa grande vantagem, uma vez que altas temperaturas podem promover a degradação da molécula e longos períodos de incubação inviabilizam a complexação com radioisótopos de meia vida curta. Um exemplo seria a complexação com o gálio-68 (^{68}Ga), que possui meia-vida de 68 min e desperta grande interesse na clínica médica, já que permite imagens PET de altíssima resolução.

A biodistribuição e as imagens cintilográficas obtidas após a administração *i.v* da H2Ac4oFPh- ^{111}In e H2Ac4oFPh- ^{67}Ga apresentaram perfil semelhante, indicando os rins como a principal via de excreção e demonstrando alta captação pelos órgãos abdominais, como o fígado e baço. No entanto, a H2Ac4oFPh- ^{111}In apresentou algumas vantagens em relação à H2Ac4oFPh- ^{67}Ga , como maior estabilidade *in vitro* e farmacocinética mais favorável para o propósito. A estabilidade da H2Ac4oFPh- ^{111}In também foi confirmada *in vivo*, já que a molécula apresentou significativa distinção entre seu perfil de biodistribuição e aquele observado após a administração do radioisótopo livre ($^{111}\text{InCl}_3$).

O perfil de biodistribuição das moléculas marcadas em camundongos *Nude*, implantados com tumor cerebral, foi semelhante àquele observado nos animais *Swiss* sadios. Porém, as atividades acumuladas em alguns órgãos dos camundongos *Nude*, como fígado e rins, foram cerca de 2 - 3 vezes maiores do que aquelas acumuladas nos órgãos dos camundongos *Swiss*. Tal fato pode ter ocorrido devido à diferença das atividades de TSC radiomarcadas injetadas nos animais que foram utilizados apenas para os estudos de biodistribuição (animais *Swiss*) e os animais utilizados na imagem e que, posteriormente, tiveram seus órgãos removidos para quantificação da radioatividade (animais *Nude*). A atividade administrada para obtenção das imagens em camundongos *Nude* foi cerca de 5 vezes maior do que aquela administrada para os estudos de biodistribuição em camundongos *Swiss*, devido à grande diferença de sensibilidade dos equipamentos utilizados para cada propósito. Apesar de todos os cálculos terem sido feitos baseados na porcentagem de atividade injetada, o aumento da concentração de moléculas marcadas

administradas, possivelmente, favoreceu o acúmulo destas nos órgãos.

Além disso, diferenças inerentes aos tipos de animais utilizados, como massa corporal e volemia, e a presença de tumor vascularizado nos animais *Nude*, também são fatores importantes e que podem resultar em variações significativas na captação de moléculas radiomarcadas (Schroeder et al., 2010).

Intensa radiação de fundo foi observada em imagens obtidas nos tempos iniciais após a administração da H2Ac4oFPh-¹¹¹In, que pode ter sido ocasionado pela sua ligação às proteínas plasmáticas (Ritschel et al., 2009), o que impediu boa distinção entre a captação da molécula pelo sítio tumoral e aquela presente nos órgãos adjacentes. De fato, a análise do comportamento da H2Ac4oFPh-¹¹¹In em soro humano *in vitro*, evidenciou alta ligação dessa molécula às proteínas plasmáticas.

Muitos fármacos circulam na corrente sanguínea ligados às proteínas plasmáticas, no entanto, apenas a fração não-ligada constitui a forma farmacologicamente ativa (Rang et al., 2012). Apesar da H2Ac4oFPh-¹¹¹In não circular livre no plasma, os dados de biodistribuição demonstraram que a maior parte da atividade injetada se distribuiu rapidamente pelos tecidos. Tal característica pode ser justificada pelo fato de moléculas lipofílicas poderem transpor facilmente as membranas e interagir com macromoléculas teciduais. Considerando a relação quantitativa plasma/macromoléculas teciduais é possível concluir que a ligação às proteínas plasmáticas pode não promover uma influência significativa no equilíbrio de distribuição de drogas que possuem solubilidade lipídica alta (Ritschel et al., 2009), como a H2Ac4oFPh-¹¹¹In. No entanto, um pequeno, porém considerável número de moléculas marcadas deve permanecer circulando ligadas às proteínas plasmáticas, o que foi, certamente, responsável pela alta radiação de fundo visualizada nos estudos de imagem e pela alta $T_{1/2}(\beta)$ evidenciada nos estudos farmacocinéticos.

Imagens tardias (24 e 48 h após a administração *i.v*) apresentaram redução significativa da radiação de fundo permitindo melhor distinção entre a captação tumoral e a captação pelos órgãos adjacentes. No entanto, a captação abdominal permaneceu alta quando comparada à captação tumoral e demais regiões do corpo, impedindo melhor visualização do tumor.

Outros autores têm dedicado atenção especial à aplicação das diferentes classes de TSC no diagnóstico em Medicina Nuclear. Em 2006, Wei e colaboradores radiomarcaram a Azabiciclo[3.2.2]nonano TSC com cobre-64 (EPH-⁶⁴Cu). Assim como a H2Ac4oFPh-¹¹¹In, a

EPH-⁶⁴Cu apresentou alta captação hepática, renal, e esplênica. Apesar de também ser altamente captada por órgãos abdominais, EPH-⁶⁴Cu se mostrou eficiente na detecção de tumores com alta expressão de topoisomerase II, por meio de imagens obtidas em PET/CT. Esses dados, juntamente com os resultados de biodistribuição do presente trabalho, que evidenciam alta captação da H2Ac4oFPh-¹¹¹In pelo sítio tumoral, sugerem que se tivéssemos utilizado um equipamento mais sensível, como um SPECT/CT, ou até mesmo um software menos limitado, que permitisse filtrar a imagem em algumas regiões, imagens com nítida visualização do tumor poderiam ter sido obtidas.

Na Medicina Nuclear é extremamente vantajoso que um radiofármaco penetre e fique retido no interior da célula alvo promovendo, assim, imagens com bom contraste ou terapia eficiente (Naqvi et al., 2011). Nesse sentido, os estudos de determinação do coeficiente de partição e de internalização permitem prever a eficácia de um radiofármaco, uma vez que determina a lipossolubilidade da molécula ou quantifica moléculas radiomarcadas no interior das células, respectivamente.

A determinação do log P experimental da H2Ac4oFPh-¹¹¹In demonstrou que ela é lipossolúvel e, sob o ponto de vista da lipossolubilidade, é capaz de atravessar facilmente as membranas celulares. Do mesmo modo, os estudos de internalização indicaram que além de ser rapidamente internalizada pelas células tumorais, a H2Ac4oFPh-¹¹¹In fica retida no interior das células.

A incubação da H2Ac4oFPh-¹¹¹In na presença de um excesso molar da TSC fria, não alterou seu perfil de internalização, sugerindo que não houve competição pela ligação em um determinado receptor específico e que a internalização ocorreu por difusão passiva através da membrana lipídica. Esse resultado pode ser corroborado por aquele obtido na determinação experimental do coeficiente de partição óleo: água e com dados muito bem estabelecidos na literatura que demonstram a permeabilidade das membranas biológicas às substâncias lipossolúveis (Ritschel et al., 2009).

A elevada internalização da H2Ac4oFPh-¹¹¹In pelas células tumorais *in vitro*, chamou a atenção para a possibilidade de utilização dessa TSC em terapia local de tumor cerebral. Esse tipo de terapia representa uma boa alternativa principalmente para o tratamento de glioblastoma multiforme, que possui natureza infiltrativa e não é facilmente ressecável. O tratamento local prévio deste tipo de tumor tem sido utilizado com intuito de reduzir o número de células tumorais dentro da massa tumoral principal e na zona de infiltração

restringindo, assim, o risco de disseminação de células tumorais durante a ressecção (Sheleg et al., 2002).

No entanto, o fato do índio-111 ser um emissor gama, inviabiliza sua utilização, complexado à TSC, para terapia propriamente dita. Apesar disso, a administração local da molécula complexada ao índio-111 é extremamente importante para avaliar sua retenção no tumor e sua biodistribuição quando administrada por essa via, provendo assim, informações sobre a potencial aplicabilidade dessa molécula, complexada a um emissor alfa ou beta, para tratamento local de tumor. Merlo (1999), Cordier (2010) e colaboradores, após avaliarem a biodistribuição e a retenção tumoral do octreotídeo e da substância P complexados ao índio-111, administradas por via intratumoral, utilizaram essas moléculas radiomarcadas com ítrio-90, um emissor beta puro, para tratamento local de glioblastoma multiforme em humanos e obtiveram bons resultados (Merlo et al., 1999; Cordier et al., 2010). Outro exemplo da importância de estudar as características de fármacos radiomarcados com índio-111, previamente à sua utilização complexado a radioisótopos beta, é o radiofármaco Zevalin (Ibritumomab-⁹⁰Y). O kit comercial deste radiofármaco, utilizado para terapia de linfoma, inclui reagentes para a marcação do anticorpo com índio-111, que deve ser realizada previamente à marcação com o ⁹⁰Y. Apenas pacientes que apresentarem biodistribuição normal do Ibritumomab-¹¹¹In podem ser tratados com Ibritumomab-⁹⁰Y, caso contrário, a terapia pode causar reações severas e até a morte do paciente (Galbraith, 2010).

Após ser administrada por via intratumoral, a H2Ac4oFPh-¹¹¹In penetrou e se distribuiu rapidamente na massa tumoral. Essa capacidade de se distribuir rapidamente na região alvo é bastante comum para moléculas pequenas, e representa uma grande vantagem em comparação com fármacos que possuem alta massa molecular, como proteínas ou anticorpos monoclonais, que se difundem mais lentamente (Cordier et al., 2010). Além disso, atividade depositada na região do tumor foi significativamente maior do que aquela observada nos órgãos não alvo, mesmo 48 h após administração, indicando que a H2Ac4oFPh-¹¹¹In permanece retida no tumor por um longo período de tempo.

Estes resultados são bastante promissores e indicam que a TSC estudada apresenta difusão e retenção tumoral adequadas para tratamento local de glioblastoma. Associar a atividade citotóxica da H2Ac4oFPh com a propriedade terapêutica de radioisótopos emissores de partículas pode ser uma boa estratégia para o tratamento local desse tipo de tumor. Com este propósito, o ítrio-90 é um forte candidato para a radiomarcagem da

H2Ac4oFPh, pois, além de ser um emissor beta puro, apresenta características químicas muito semelhantes às do índio-111 (Vallabhajosula, 2009) e, portanto, poderá, em teoria, complexar-se facilmente a esta TSC.

7

CONCLUSÕES

- ✓ Todos os derivados de 2-acetilpiridina N-4 fenil tiossemicarbazonas testados foram citotóxicos para as linhagens de tumor de mama e cerebrais apresentando, inclusive, maior atividade antitumoral *in vitro*, do que o etoposídeo.
- ✓ As TSC que possuem o halogênio ou nitro na posição orto apresentaram maior atividade antitumoral *in vitro* que seus respectivos isômeros com halogênio ou nitro na posição meta ou para do grupo fenila.
- ✓ Os compostos H2Ac4oFPh e H2Ac4oClPh apresentaram a maior atividade antitumoral, dentre todos os compostos testados, com IC₅₀ na ordem de nanomolar.
- ✓ O tipo de morte induzido pelas TSC é a apoptose, porém a indução da morte autofágica não pode ser descartada.
- ✓ O tratamento com H2Ac4oFPh induziu a geração de ROS e peroxidação lipídica em células de glioblastoma sugerindo que o estresse oxidativo é responsável, ao menos em parte, pela apoptose induzida por esta TSC.
- ✓ A máxima concentração solúvel de H2Ac4oFPh, 5 mg.kg⁻¹, administrada por via *s.c.*, durante 4 dias consecutivos, não induziu alterações comportamentais, perda de massa corporal superior a 20% da massa total inicial ou morte dos animais tratados, demonstrando que ela não é tóxica.

-
- ✓ O tratamento realizado, em modelo animal de tumor cerebral, com 5 mg.kg^{-1} de H2Ac4oFPh, administrada por via *s.c.*, durante 4 dias consecutivos, reduziu a taxa de crescimento tumoral nos primeiros dias após o tratamento, no entanto, este protocolo de tratamento não se mostrou eficaz ao final do experimento.
 - ✓ Sondas radioativas da H2Ac4oFPh foram sintetizadas, utilizando ^{111}In e ^{67}Ga como radiotraçadores, com atividade específica e pureza radioquímica satisfatórias.
 - ✓ A H2Ac4oFPh- ^{111}In apresentou vantagens em relação à H2Ac4oFPh- ^{67}Ga como: maior atividade específica, presença de um único produto final, maior estabilidade *in vitro*, maior volume de distribuição, maior clareamento sanguíneo e, portanto, foi considerada mais adequada para aplicação para estudos de imagem molecular.
 - ✓ H2Ac4oFPh- ^{111}In apresentou natureza lipossolúvel e foi facilmente internalizada pelas células de glioblastoma, *in vitro*.
 - ✓ H2Ac4oFPh- ^{111}In foi captada pelas células de glioblastoma *in vivo*, porém, a alta captação abdominal e a alta radiação de fundo não permitiram boa distinção do tumor nos estudos de imagem.
 - ✓ A administração intratumoral permitiu maior difusão e retenção da H2Ac4oFPh- ^{111}In no sítio tumoral e reduziu significativamente a atividade acumulada nos órgãos, sugerindo que esta TSC apresenta características adequadas para tratamento local de glioblastoma.

8

PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✓ Realizar testes mais aprofundados com o intuito de confirmar a participação da autofagia no mecanismo de ação antitumoral da H2Ac4oFPh.
- ✓ Estudar o mecanismo envolvido na apoptose induzida pela H2Ac4oFPh.
- ✓ Avaliar a citotoxicidade das TSC em culturas de células normais, *in vitro*, e realizar estudos de genotoxicidade e mutagenicidade.
- ✓ Testar novos protocolos de terapia *in vivo* com a H2Ac4oFPh variando a dose, o tempo do início do tratamento, a duração do tratamento ou até mesmo utilizando-a como adjuvante ou neoadjuvante a outras formas de terapia.
- ✓ Adquirir imagens em SPECT/CT da H2Ac4oFPh-¹¹¹In, em modelo animal de tumor cerebral e em outros modelos de tumor.
- ✓ Realizar a radiomarcagem da H2Ac4oFPh com emissores de partículas, como o ítrio-90, e avaliar sua aplicabilidade para terapia local de glioblastoma multiforme.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABTA (2006). American Brain Tumor Association. Causes & Risks facts. A Primer of Brain Tumors: Cap 4.
2. ACS. (2012). American Cancer Society. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/index>. Acesso em: julho/2012.
3. Amos SM, Duong CP, Westwood JA, Ritchie DS, Junghans RP, Darcy PK, Kershaw MH (2011). "Autoimmunity associated with immunotherapy of cancer." **Blood** 118(3): 499-509.
4. Arrowsmith RL, Waghorn PA, Jones MW, Bauman A, Brayshaw SK, Hu Z, Kociok-Kohn G, Mindt TL, Tyrrell RM, Botchway SW, Dilworth JR, Pascu SI (2011). "Fluorescent gallium and indium bis(thiosemicarbazones) and their radiolabelled analogues: synthesis, structures and cellular confocal fluorescence imaging investigations." **Dalton Trans** 40(23): 6238-6252.
5. Atieh D, Modiano M, Shriberg L, Brafman L, Szno M, Vahdat L (2004). "A phase II trial of 3-Aminopyridine-2-Carboxaldehyde Thiosemicarbazone (3-AP) in patients with metastatic breast cancer." **J Clin Oncology** 22(14): 864.
6. Avery SV (2011). "Molecular targets of oxidative stress." **Biochem J** 434(2): 201-210.
7. Barker CA, Burgan WE, Carter DJ, Cerna D, Gius D, Hollingshead MG, Camphausen K, Tofilon PJ (2006). "In vitro and in vivo radiosensitization induced by the ribonucleotide reductase inhibitor Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone)." **Clin Cancer Res** 12(9): 2912-2918.
8. Barnett GC, West CM, Dunning AM, Elliott RM, Coles CE, Pharoah PD, Burnet NG (2009). "Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype." **Nat Rev Cancer** 9(2): 134-142.
9. Barreiro E, Fraga C (2005). "A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do programa nacional de fármacos (Pronfar)." **Quím Nova** 28: 56-63.
10. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW (2012). "Cancer and radiation therapy: current advances and future directions." **Int J Med Sci** 9(3): 193-199.
11. Baskic D, Popovic S, Ristic P, Arsenijevic NN (2006). "Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide." **Cell Biol Int** 30(11): 924-932.
12. Begg AC, Stewart FA, Vens C (2011). "Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs." **Nat Rev Cancer** 11(4): 239-253.

13. Bernier J, Hall EJ, Giaccia A (2004). "Radiation oncology: a century of achievements." **Nat Rev Cancer** 4(9): 737-747.
14. Bharadwaj R, Yu H (2004). "The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer." **Oncogene** 23(11): 2016-2027.
15. Bharti N, Shailendra, Gonzalez Garza MT, Cruz-Vega DE, Castro-Garza J, Saleem K, Naqvi F, Maurya MR, Azam A (2002). "Synthesis, characterization and antiameobic activity of benzimidazole derivatives and their vanadium and molybdenum complexes." **Bioorg Med Chem Lett** 12(6): 869-871.
16. Bossy-Wetzell E, Green DR (2000). "Detection of apoptosis by annexin V labeling." **Methods Enzymol** 322: 15-18.
17. Brown EJ, Baltimore D (2000). "ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality." **Genes Dev** 14(4): 397-402.
18. Brown JM, Attardi LD (2005). "The role of apoptosis in cancer development and treatment response." **Nat Rev Cancer** 5(3): 231-237.
19. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B (1998). "Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage." **Science** 282(5393): 1497-1501.
20. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G (2004). "Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition." **Oncogene** 23(16): 2825-2837.
21. Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, Armstrong SA, Letai A (2006). "Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members." **Cancer Cell** 9(5): 351-365.
22. Chan J, Thompson A, MW MJ, Peach J (2010). "Synthesis and structural studies of gallium(III) and indium(III) complexes of 2-acetylpyridine thiosemicarbazones." **Inorg Chim Acta** 363: 1140-1149.
23. Chater S, Amara S, Moussata D, Bozec A, Omezzine A, Romestaing P, Chapet O, Gerard JP, Mornex F, Benahmed M, Mauduit C (2007). "Differential effects of ionizing radiation and platinum-derivative chemotherapy on apoptotic pathways in testicular germ cells." **Int J Radiat Biol** 83(4): 269-278.
24. Chiou TJ, Chu ST, Tzeng WF (2003). "Protection of cells from menadione-induced apoptosis by inhibition of lipid peroxidation." **Toxicology** 191(2-3): 77-88.
25. Circu ML, Aw TY (2008). Glutathione and apoptosis. **Free Radic Res** 42: 689-706.
26. Circu ML, Aw TY (2010). "Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis". **Free Radic Biol Med** 48(6): 749-762.
27. Colli B, Jr CC (2001). "Análise crítica dos resultados do tratamento neurooncológico dos gliomas malignos do SNC: Perspectivas futuras." **J Bras Neurocirurgia**. 12: 36-53.

28. Cordier D, Forrer F, Kneifel S, Sailer M, Mariani L, Macke H, Muller-Brand J, Merlo A (2010). "Neoadjuvant targeting of glioblastoma multiforme with radiolabeled DOTAGA-substance P--results from a phase I study." **J Neurooncol** 100(1): 129-136.
29. Cowley AR, Dilworth JR, Donnelly PS, Heslop JM, Ratcliffe SJ (2007). "Bifunctional chelators for copper radiopharmaceuticals: the synthesis of [Cu(ATSM)-amino acid] and [Cu(ATSM)-octreotide] conjugates." **Dalton Trans**(2): 209-217.
30. Crim JA, Petering HG (1967). "The antitumor activity of Cu(II)KTS, the copper (II) chelate of 3-ethoxy-2-oxobutyraldehyde bis(thiosemicarbazone)." **Cancer Res** 27(7): 1278-1285.
31. de Bruin EC, Medema JP (2008). "Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response." **Cancer Treat Rev** 34(8): 737-749.
32. Dehdashti F, Mintun MA, Lewis JS, Bradley J, Govindan R, Laforest R, Welch MJ, Siegel BA (2003). "In vivo assessment of tumor hypoxia in lung cancer with ⁶⁰Cu-ATSM." **Eur J Nucl Med Mol Imaging** 30(6): 844-850.
33. Desai BN, Myers BR, Schreiber SL (2002). "FKBP12-rapamycin-associated protein associates with mitochondria and senses osmotic stress via mitochondrial dysfunction." **Proc Natl Acad Sci U S A** 99(7): 4319-4324.
34. Dewey WC, Ling CC, Meyn RE (1995). "Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy." **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 33(4): 781-796.
35. Elmore S (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." **Toxicol Pathol** 35(4): 495-516.
36. Engel RH, Evens AM (2006). "Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer." **Front Biosci** 11: 300-312.
37. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes." **Free Radic Biol Med** 11(1): 81-128.
38. Fass L (2008). "Imaging and cancer: a review." **Mol Oncol** 2(2): 115-152.
39. Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S (2005). "The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells." **Proc Natl Acad Sci U S A** 102(23): 8204-8209.
40. Ferraz KS, Fernandes L, Carrilho D, Pinto MC, Leite Mde F, Souza-Fagundes EM, Speziali NL, Mendes IC, Beraldo H (2009). "2-Benzoylpyridine-N(4)-tolyl thiosemicarbazones and their palladium(II) complexes: cytotoxicity against leukemia cells." **Bioorg Med Chem** 17(20): 7138-7144.
41. Feun L, Modiano M, Lee K, Mao J, Marini A, Savaraj N, Plezia P, Almassian B, Colacino E, Fischer J, MacDonald S (2002). "Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule." **Cancer Chemother Pharmacol** 50(3): 223-229.
42. Filho G, Guimarães R, Bogliolo L (2009). Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: GB Filho Bogliolo: Patologia Geral. Rio de Janeiro, G Koogan: Cap. 8.

43. Finaud J, Lac G, Filaire E (2006). "Oxidative stress : relationship with exercise and training." **Sports Med** 36(4): 327-358.
44. Finch RA, Liu MC, Cory AH, Cory JG, Sartorelli AC (1999). "Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone; 3-AP): an inhibitor of ribonucleotide reductase with antineoplastic activity." **Adv Enzyme Regul** 39: 3-12.
45. Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, Kriegelstein J, Kissel T (2003). "In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis." **Biomaterials** 24(7): 1121-1131.
46. Fleischer A, Ghadiri A, Dessauge F, Duhamel M, Rebollo MP, Alvarez-Franco F, Rebollo A (2006). "Modulating apoptosis as a target for effective therapy." **Mol Immunol** 43(8): 1065-1079.
47. Fogg VC, Lanning NJ, Mackeigan JP (2011). "Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death". **Chin J Can** 30(8): 526-539.
48. French FA, Blanz EJ, Jr. (1966). "The carcinostatic activity of thiosemicarbazones of formyl heteroaromatic compounds. 3. Primary correlation." **J Med Chem** 9(4): 585-589.
49. Fruehauf JP, Meyskens, Jr. FL (2007). "Reactive Oxygen Species: A Breath of Life or Death?" **Clin Cancer Res** 13: 789-794.
50. Galbraith W (2010). Radiopharmaceuticals in nuclear medicine. In: BT Smith. Nuclear Pharmacy. Londres, P press: 6.
51. Garcia MA, Carrasco E, Aguilera M, Alvarez P, Rivas C, Campos JM, Prados JC, Calleja MA, Esteban M, Marchal JÁ, Aranega A (2011). "The chemotherapeutic drug 5-fluorouracil promotes PKR-mediated apoptosis in a p53-independent manner in colon and breast cancer cells." **PLoS ONE** 6(8): e23887.
52. Gourlay CW, Du W, Ayscough KR (2006). "Apoptosis in yeast--mechanisms and benefits to a unicellular organism." **Mol Microbiol** 62(6): 1515-1521.
53. Gozuacik D, Kimchi A (2004). "Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism." **Oncogene** 23(16): 2891-2906.
54. Hall IH, Lackey CB, Kistler TD, Ives JS, Beraldo H, Ackerman LJ, West DX (2000). "The cytotoxicity of symmetrical and unsymmetrical bis(thiosemicarbazones) and their metal complexes in murine and human tumor cells." **Arch Pharm (Weinheim)** 333(7): 217-225.
55. Halliwell B, Gutteridge J (2007). Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death Free radicals in Biology and Medicine. Oxford, OU Press: Cap. 4.
56. Hancock CN, Stockwin LH, Han B, Divelbiss RD, Jun JH, Malhotra SV, Hollingshead MG, Newton DL (2011). "A copper chelate of thiosemicarbazone NSC 689534 induces oxidative/ER stress and inhibits tumor growth in vitro and in vivo." **Free Radic Biol Med** 50(1): 110-121.

57. He C, Klionsky DJ (2009). "Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy." **Annu Rev Genet** 43: 67-93.
58. Hefti FF (2008). "Requirements for a lead compound to become a clinical candidate." **BMC Neurosci** 9 Suppl 3: S7.
59. Hendry JH, Jeremic B, Zubizarreta EH (2006). "Normal tissue complications after radiation therapy." **Rev Panam Salud Publica** 20(2-3): 151-160.
60. Hernandez MZ, Cavalcanti SM, Moreira DR, de Azevedo Junior WF, Leite AC (2010). "Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design." **Curr Drug Targets** 11(3): 303-314.
61. Hsu S, Singh B, Schuster G (2004). "Induction of apoptosis in oral cancer cells: agents and mechanisms for potential therapy and prevention." **Oral Oncol** 40(5): 461-473.
62. INCA (2012). Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: www.inca.gov.br Acesso em: Setembro/2012.
63. IPEN (2012). Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares. Catálogo de produtos e serviços. Disponível em: www.ipen.br Acesso em: Setembro/12.
64. Ito H, Daido S, Kanzawa T, Kondo S, Kondo Y (2005). "Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells." **Int J Oncol** 26(5): 1401-1410.
65. Jalilian AR, Yousefnia H, Garousi J, Novinrouz A, Rajamand AA, Shafae K (2009). "The development of radiogallium-acetylacetonate bis(thiosemicarbazone) complex for tumour imaging." **Nucl Med Rev Cent East Eur** 12(2): 65-71.
66. Jang MH, Shin MC, Lim S, Han SM, Park HJ, Shin I, Lee JS, Kim KA, Kim EH, Kim CJ (2003). "Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299." **J Pharmacol Sci** 91(2): 95-104.
67. Jansson PJ, Hawkins CL, Lovejoy DB, Richardson DR (2010a). "The iron complex of Dp44mT is redox-active and induces hydroxyl radical formation: an EPR study." **J Inorg Biochem** 104(11): 1224-1228.
68. Jansson PJ, Sharpe PC, Bernhardt PV, Richardson DR (2010b). "Novel thiosemicarbazones of the ApT and DpT series and their copper complexes: identification of pronounced redox activity and characterization of their antitumor activity." **J Med Chem** 53(15): 5759-5769.
69. Jin P, Hardy S, Morgan DO (1998). "Nuclear localization of cyclin B1 controls mitotic entry after DNA damage." **J Cell Biol** 141(4): 875-885.
70. Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, Rubinstein LV, Venditti JM, Schepartz S, Kalyandrug S, Christian M, Arbuck S, Hollingshead M, Sausville EA (2001). "Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials." **Br J Cancer** 84(10): 1424-1431.

71. Josephs D, Spicer J, O'Doherty M (2009). "Molecular imaging in clinical trials." **Target Oncol** 4(3): 151-168.
72. Jurisson S, Cutler C, Smith SV (2008). "Radiometal complexes: characterization and relevant *in vitro* studies." **Q J Nucl Med Mol Imaging** 52(3): 222-234.
73. Karp JE, Giles FJ, Gojo I, Morris L, Greer J, Johnson B, Thein M, Sznol M, Low J (2008). "A phase I study of the novel ribonucleotide reductase inhibitor 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP, Triapine) in combination with the nucleoside analog fludarabine for patients with refractory acute leukemias and aggressive myeloproliferative disorders." **Leuk Res** 32(1): 71-77.
74. Kasuga NC, Sekino K, Ishikawa M, Honda A, Yokoyama M, Nakano S, Shimada N, Koumo C, Nomiya K (2003). "Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 12 zinc(II) complexes with four thiosemicarbazone and two semicarbazone ligands." **J Inorg Biochem** 96(2-3): 298-310.
75. Kievit FM, Florczyk SJ, Leung MC, Veiseh O, Park JO, Disis ML, Zhang M (2010). "Chitosan-alginate 3D scaffolds as a mimic of the glioma tumor microenvironment." **Biomaterials** 31(22): 5903-5910.
76. Klaymann DL, Scovill JP, Bartosevich JF, Mason CJ (1979). "2-Acetylpyridine thiosemicarbazones. 2. N4,N4-Disubstituted derivatives as potential antimalarial agents." **J Med Chem** 22(11): 1367-1373.
77. Klionsky DJ, Emr SD (2000). "Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation." **Science** 290(5497): 1717-1721.
78. Kohen R, Nyska A (2002). "Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification." **Toxicol Pathol** 30(6): 620-650.
79. Kola I, Landis J (2004). "Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?" **Nat Rev Drug Discov** 3(8): 711-715.
80. Kovala-Demertzi D, Yadav PN, Wiecek J, Skoulika S, Varadinova T, Demertzis MA (2006). "Zinc(II) complexes derived from pyridine-2-carbaldehyde thiosemicarbazone and (1E)-1-pyridin-2-ylethan-1-one thiosemicarbazone. Synthesis, crystal structures and antiproliferative activity of zinc(II) complexes." **J Inorg Biochem** 100(9): 1558-1567.
81. Kowalsky RJ, Falen SW (2004). Radiation detection and measurement. In: American Pharmacists Association. Radiopharmaceuticals in nuclear pharmacy and nuclear medicine. Washington, NT Landis.
82. Kowol C, Berger R, Eichinger R, Roller A, Jakupec M, Schmidt P, Arion V, Keppler B (2007). "Gallium(III) and iron(III) complexes of alpha-N-heterocyclic thiosemicarbazones: synthesis, characterization, cytotoxicity, and interaction with ribonucleotide reductase." **J Med Chem** 50 (6): 1254-1265.
83. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA,

- Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." **Cell Death Differ** 16(1): 3-11.
84. Kubota Y, Kubota K, Tani S (2000). "DNA binding properties of DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) analogs having an imidazoline ring or a tetrahydropyrimidine ring: groove-binding and intercalation." **Nucleic Acids Symp Ser**(44): 53-54.
85. Lee SB, Tong SY, Kim JJ, Um SJ, Park JS (2007). "Caspase-independent autophagic cytotoxicity in etoposide-treated CaSki cervical carcinoma cells." **DNA Cell Biol** 26(10): 713-720.
86. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B (1998). "The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy." **Biochim Biophys Acta** 1366(1-2): 177-196.
87. Lessa JA, Guerra JC, de Miranda LF, Romeiro CF, Da Silva JG, Mendes IC, Speziali NL, Souza-Fagundes EM, Beraldo H (2011). "Gold(I) complexes with thiosemicarbazones: cytotoxicity against human tumor cell lines and inhibition of thioredoxin reductase activity." **J Inorg Biochem** 105(12): 1729-1739.
88. Li L, Ishdorj G, Gibson SB (2012). "Reactive oxygen species regulation of autophagy in cancer: implications for cancer treatment." **Free Radic Biol Med** 53(7): 1399-1410.
89. Linden A, Gulden M, Martin HJ, Maser E, Seibert H (2008). "Peroxide-induced cell death and lipid peroxidation in C6 glioma cells." **Toxicol In Vitro** 22(5): 1371-1376.
90. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." **J Biol Chem** 193(1): 265-275.
91. Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G (2007). "Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1." **EMBO J** 26(10): 2527-2539.
92. Mates JM, Sanchez-Jimenez FM (2000). "Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy." **Int J Biochem Cell Biol** 32(2): 157-170.
93. McKnight JA (2003). "Principles of chemotherapy." **Clin Tech Small Anim Pract** 18(2): 67-72.
94. Mendes IC, Soares MA, Dos Santos RG, Pinheiro C, Beraldo H (2009). "Gallium(III) complexes of 2-pyridineformamide thiosemicarbazones: cytotoxic activity against malignant glioblastoma." **Eur J Med Chem** 44(5): 1870-1877.
95. Merlo A, Hausmann O, Wasner M, Steiner P, Otte A, Jermann E, Freitag P, Reubi JC, Muller-Brand J, Gratzl O, Macke HR (1999). "Locoregional regulatory peptide receptor targeting with the diffusible somatostatin analogue 90Y-labeled DOTA0-D-Phe1-Tyr3-octreotide (DOTATOC): a pilot study in human gliomas." **Clin Cancer Res** 5(5): 1025-1033.

96. Mettler F, Guiberteau M (2006). Essentials of nuclear medicine imaging Philadelphia. Cap 1.
97. Miao B, Degterev A (2009). "Methods to analyze cellular necroptosis". **Methods Mol Biol** 559: 79-93.
98. Miller MC, Stineman CN, Vance JR, West DX, Hall IH (1998). "The cytotoxicity of copper(II) complexes of 2-acetyl-pyridyl-4N-substituted thiosemicarbazones." **Anticancer Res** 18(6A): 4131-4139.
99. Moller P, Koretz K, Leithauser F, Bruderlein S, Henne C, Quentmeier A, Krammer PH (1994). "Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium." **Int J Cancer** 57(3): 371-377.
100. Naqvi SA, Sosabowski JK, Nagra SA, Ishfaq MM, Mather SJ, Matzow T (2011). "Radiopeptide internalisation and externalization assays: cell viability and radioligand integrity." **Appl Radiat Isot** 69(1): 68-74.
101. NCI (2009). Triapine, Cisplatin, and Radiation Therapy in Treating Patients With Cervical Cancer or Vaginal Cancer. NC Institute. USA. **NCT00941070**.
102. Niida H, Tsuge S, Katsuno Y, Konishi A, Takeda N, Nakanishi M (2005). "Depletion of Chk1 leads to premature activation of Cdc2-cyclin B and mitotic catastrophe." **J Biol Chem** 280(47): 39246-39252.
103. Nutting CM, van Herpen CM, Miah AB, Bhide SA, Machiels JP, Buter J, Kelly C, de Raucourt D, Harrington KJ (2009). "Phase II study of 3-AP Triapine in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma." **Ann Oncol** 20(7): 1275-1279.
104. Ocker M, Höpfne M (2012). "Apoptosis-modulating drugs for improved cancer therapy". **Eur Surg Res** 48: 111-120.
105. Ohka F, Natsume A, Wakabayashi T (2012). "Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme." **Neurol Res Int** 2012: 878425.
106. Oliveira R, Santos D, Ferreira D, Coelho P, Veiga F (2006). "Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações." **Rev Bras Ciên Farm** 2: 151-165.
107. Orloff J, Douglas F, Pinheiro J, Levinson S, Branson M, Chaturvedi P, Ette E, Gallo P, Hirsch G, Mehta C, Patel N, Sabir S, Springs S, Stanski D, Evers MR, Fleming E, Singh N, Tramontin T, Golub H (2009). "The future of drug development: advancing clinical trial design." **Nat Rev Drug Discov** 8(12): 949-957.
108. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B (2007). "Mitochondria, oxidative stress and cell death". **Apoptosis** 12(5): 913-22.
109. Ozben T (2007). "Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy." **J Pharm Sci** 96(9): 2181-2196.
110. Page R, Takimoto C (2008). Principles of Chemotherapy. In: Pazdur R, Coia L, Hoskins W. Cancer Management: A Multidisciplinary Approach. Michigan, O Group: Cap 3.

111. Paterson BM, Karas JA, Scanlon DB, White JM, Donnelly PS (2010). "Versatile new bis(thiosemicarbazone) bifunctional chelators: synthesis, conjugation to bombesin(7-14)-NH(2), and copper-64 radiolabeling." **Inorg Chem** 49(4): 1884-1893.
112. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B (2005). "Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy." **Cell** 122(6): 927-939.
113. Piacentini M, Evangelisti C, Mastroberardino PG, Nardacci R, Kroemer G (2003). "Does prothymosin- α act as molecular switch between apoptosis and autophagy?" **Cell Death Differ** 10(9): 937-939.
114. Plowman J, Dykes D, Hollingshead M, Simpson-Herren L, Alley M (1998). Human tumor xenograft models in NCI drug development. In: Teicher B. Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical trials and approval. Totowa (NJ), H Press. 1: 101 – 25.
115. Plumb JA, Milroy R, Kaye SB (1989). "Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay." **Cancer Res** 49(16): 4435-4440.
116. Prata MI, Santos AC, Bligh SW, Chowdhury AH, Geraldine CF, de Lima JJ (2000). "Characterization of (111)In(3+) complexes of DTPA amide derivatives: biodistribution and clearance studied by gamma imaging." **Nucl Med Biol** 27(6): 605-610.
117. Quiroga AG, Perez JM, Montero EI, Masaguer JR, Alonso C, Navarro-Ranninger C (1998). "Palladated and platinated complexes derived from phenylacetaldehyde thiosemicarbazone with cytotoxic activity in cis-DDP resistant tumor cells. Formation of DNA interstrand cross-links by these complexes." **J Inorg Biochem** 70(2): 117-123.
118. Quiroga AG, Perez JM, Montero EI, West DX, Alonso C, Navarro-Ranninger C (1999). "Synthesis and characterization of Pd(II) and Pt(II) complexes of p-isopropylbenzaldehyde N-protected thiosemicarbazones. Cytotoxic activity against ras-transformed cells." **J Inorg Biochem** 75(4): 293-301.
119. Ramachandran E, Kalaivani P, Prabhakaran R, Rath NP, Brinda S, Poornima P, Padma VV, Natarajan K (2012). "Synthesis, X-ray crystal structure, DNA binding, antioxidant and cytotoxicity studies of Ni(II) and Pd(II) thiosemicarbazone complexes." **Metalomics** 4(2): 218-227.
120. Rang H, Dale M, Ritter J, Moore P (2012). Farmacologia. Rio de Janeiro. Cap. 3, 5 e 7.
121. Ravikumar B, Berger Z, Vacher C, O'Kane CJ, Rubinsztein DC (2006). "Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis." **Hum Mol Genet** 15(7): 1209-1216.
122. Rhee SG, Chang TS, Jeong W, Kang D (2010). "Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells." **Mol Cells** 29(6): 539-549.
123. Ritschel W, Kearns G (2009). Lipid/water partition coefficient. Handbook of basic pharmacokinetics including clinical applications. EUA, WAP Association: 8.

124. Roninson IB, Broude EV, Chang BD (2001). "If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells." **Drug Resist Updat** 4(5): 303-313.
125. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T (1965). "Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode." **Nature** 205: 698-699.
126. Saha G (2010). *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. USA. Cap. 4 e 6.
127. Scandalios JG (2005). "Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses." **Braz J Med Biol Res** 38(7): 995-1014.
128. Schroeder RP, Muller C, Reneman S, Melis ML, Breeman WA, de Blois E, Bangma CH, Krenning EP, van Weerden WM, de Jong M (2010). "A standardised study to compare prostate cancer targeting efficacy of five radiolabelled bombesin analogues." **Eur J Nucl Med Mol Imaging** 37(7): 1386-1396.
129. Shao J, Zhou B, Di Bilio AJ, Zhu L, Wang T, Qi C, Shih J, Yen Y (2006). "A Ferrous-Triapine complex mediates formation of reactive oxygen species that inactivate human ribonucleotide reductase." **Mol Cancer Ther** 5(3): 586-592.
130. Shao J, Zhou B, Zhu L, Qiu W, Yuan YC, Xi B, Yen Y (2004). "In vitro characterization of enzymatic properties and inhibition of the p53R2 subunit of human ribonucleotide reductase." **Cancer Res** 64(1): 1-6.
131. Sheleg SV, Korotkevich EA, Zhavrid EA, Muravskaya GV, Smeyanovich AF, Shanko YG, Yurkshtovich TL, Bychkovsky PB, Belyaev SA (2002). "Local chemotherapy with cisplatin-depot for glioblastoma multiforme." **J Neurooncol** 60(1): 53-59.
132. Soares MA, Lessa JA, Mendes IC, Da Silva JG, Dos Santos RG, Salum LB, Daghestani H, Andricopulo AD, Day BW, Vogt A, Pesquero JL, Rocha WR, Beraldo H (2012). "N⁴-Phenyl-substituted 2-acetylpyridine thiosemicarbazones: cytotoxicity against human tumor cells, structure-activity relationship studies and investigation on the mechanism of action". **Bioorg Med Chem** 20(11): 3396-409.
133. Stefani C, Punnia-Moorthy G, Lovejoy DB, Jansson PJ, Kalinowski DS, Sharpe PC, Bernhardt PV, Richardson DR (2011). "Halogenated 2'-benzoylpyridine thiosemicarbazone (XBpT) chelators with potent and selective anti-neoplastic activity: relationship to intracellular redox activity." **J Med Chem** 54(19): 6936-6948.
134. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM (2000). "Apoptosis signaling." **Annu Rev Biochem** 69: 217-245.
135. Takai H, Tominaga K, Motoyama N, Minamishima YA, Nagahama H, Tsukiyama T, Ikeda K, Nakayama K, Nakanishi M (2000). "Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice." **Genes Dev** 14(12): 1439-1447.
136. Teitz Y, Ronen D, Vansover A, Stematsky T, Riggs JL (1994). "Inhibition of human immunodeficiency virus by N-methylisatin-beta 4':4'-diethylthiosemicarbazone and N-allylisatin-beta-4':4'-diallylthiosemicarbazone." **Antiviral Res** 24(4): 305-314.

137. Tenório R, Góes A, Lima Jd, Faria Ad, Alves A, Aquinol Td (2005). "Tiosemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica." **Quím. Nova** 28(6): 1030-1038.
138. Thannickal VJ, Fanburg BL (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 279(6): L1005-1028.
139. Thrall J, Ziessman H (2003). *Medicina Nuclear Rio de Janeiro*. Cap. 2 e 4.
140. Tinois E (2005). "Imagens Funcionais PET e fMRI." **Mult tecnol saúde**: 1-14.
141. Trachootham D, Alexandre J, Huang P (2009). "Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?" **Nat Rev Drug Discov** 8(7): 579-591.
142. Traynor AM, Lee JW, Bayer GK, Tate JM, Thomas SP, Mazurczak M, Graham DL, Kolesar JM, Schiller JH (2010). "A phase II trial of triapine (NSC# 663249) and gemcitabine as second line treatment of advanced non-small cell lung cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study 1503." **Invest New Drugs** 28(1): 91-97.
143. UWhealth. (2012). Disponível em: www.uwhealth.org Acesso em: Julho/2012.
144. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." **Chem Biol Interact** 160(1): 1-40.
145. Vallabhajosula S (2009). *Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT*. Berlim. 392.
146. Vavere AL, Lewis JS (2007). "Cu-ATSM: a radiopharmaceutical for the PET imaging of hypoxia." **Dalton Trans**(43): 4893-4902.
147. Vousden KH, Lane DP (2007). "p53 in health and disease." **Nat Rev Mol Cell Biol** 8(4): 275-283.
148. Wadler S, Makower D, Clairmont C, Lambert P, Fehn K, Sznol M (2004). "Phase I and pharmacokinetic study of the ribonucleotide reductase inhibitor, 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone, administered by 96-hour intravenous continuous infusion." **J Clin Oncol** 22(9): 1553-1563.
149. Wang S, Konorev EA, Kotamraju S, Joseph J, Kalivendi S, Kalyanaraman B (2004). "Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. intermediacy of H₂O₂- and p53-dependent pathways." **J Biol Chem** 279(24): 25535-25543.
150. Wei L, Easmon J, Nagi RK, Muegge BD, Meyer LA, Lewis JS (2006). "⁶⁴Cu-azabicyclo[3.2.2]nonane thiosemicarbazone complexes: radiopharmaceuticals for PET of topoisomerase II expression in tumors." **J Nucl Med** 47(12): 2034-2041.
151. West D, NM NK, Bain G (1996). "Copper(II) complexes of 2-formyl-, 2-acetyl- and 2-benzoylpyridine N(4) N(4)-m-, N(4)-p-chlorophenylthiosemicarbazones." **Trans Metal Chem** 21(1): 52-57.

152. WHO. (2012). World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/cancer>
Acesso em: Julho/2012.
153. Workman P, Kaye S (2002). "Cancer therapeutics: A Trends Guide with eleven reviews of various new potentials approaches to the development of anticancer drugs." **Mol Med Suppl** v.8: 73.
154. Yalowich JC, Wu X, Zhang R, Kanagasabai R, Hornbaker M, Hasinoff BB (2012). "The anticancer thiosemicarbazones Dp44mT and triapine lack inhibitory effects as catalytic inhibitors or poisons of DNA topoisomerase IIalpha." **Biochem Pharmacol** 84(1): 52-58.
155. Yang Y, Sharma R, Sharma A, Awasthi S, Awasthi YC (2003). "Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling." **Acta Biochim Pol** 50(2): 319-336.
156. Yee KW, Cortes J, Ferrajoli A, Garcia-Manero G, Verstovsek S, Wierda W, Thomas D, Faderl S, King I, O'Brien S M, Jeha S, Andreeff M, Cahill A, Sznol M, Giles FJ (2006). "Triapine and cytarabine is an active combination in patients with acute leukemia or myelodysplastic syndrome." **Leuk Res** 30(7): 813-822.
157. Yu Y, Kalinowski DS, Kovacevic Z, Siafakas AR, Jansson PJ, Stefani C, Lovejoy DB, Sharpe PC, Bernhardt PV, Richardson DR (2009). "Thiosemicarbazones from the old to new: iron chelators that are more than just ribonucleotide reductase inhibitors." **J Med Chem** 52(17): 5271-5294.
158. Yu Y, Suryo Rahmanto Y, Hawkins CL, Richardson DR. (2011). "The potent and novel thiosemicarbazone chelators di- 2- pyridylketone -4,4 -dimethyl -3 thiosemicarbazone and 2-benzoylpyridine-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone affect crucial thiol systems required for ribonucleotide reductase activity". **Mol Pharmacol** 79(6): 921-31.
159. Yuan J, Lovejoy DB, Richardson DR (2004). "Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: in vitro and in vivo assessment." **Blood** 104(5): 1450-1458.
160. Zur Hausen H (2001). "Cervical carcinoma and human papillomavirus: on the road to preventing a major human cancer." **J Natl Cancer Inst** 93(4): 252-253.

ANEXO

ARTIGO PUBLICADO

Soares MA, Lessa JA, Mendes IC, Da Silva JG, Dos Santos RG, Salum LB, Daghestani H, Andricopulo AD, Day BW, Vogt A, Pesquero JL, Rocha WR, Beraldo H. (2012). "N⁴-phenyl-substituted 2-acetylpyridine thiosemicarbazones: cytotoxicity against human tumor cells, structure-activity relationship studies and investigation on the mechanism of action". **Bioorg Med Chem.** 2012(11):3396-409.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

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

N⁴-Phenyl-substituted 2-acetylpyridine thiosemicarbazones: Cytotoxicity against human tumor cells, structure–activity relationship studies and investigation on the mechanism of action

Marcella A. Soares^{a,b}, Josane A. Lessa^c, Isolda C. Mendes^d, Jeferson G. Da Silva^c, Raquel G. dos Santos^{b,e}, Lívia B. Salum^f, Hikmat Daghestani^g, Adriano D. Andricopulo^f, Billy W. Day^h, Andreas Vogtⁱ, Jorge L. Pesquero^a, Willian R. Rocha^c, Heloisa Beraldo^{c,*}

^a Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear, CDTN, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Escola de Belas Artes, Departamento de Artes Plásticas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, 30130-100 Belo Horizonte, MG, Brazil

^f Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

^g Department of Structural Biology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15260, USA

^h Department of Pharmaceutical Sciences, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15261, USA

ⁱ University of Pittsburgh Drug Discovery Institute, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15261, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2012

Revised 5 April 2012

Accepted 10 April 2012

Available online 19 April 2012

Keywords:

2-Acetylpyridine thiosemicarbazones

Glioblastoma

Breast cancer

Cytotoxicity

Tubulin

ABSTRACT

N⁴-Phenyl 2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4Ph; N-(phenyl)-2-(1-(pyridin-2-yl)ethylidene)hydrazinecarbothioamide) and its N⁴-*ortho*-, -*meta*- and -*para*-fluorophenyl (H2Ac4oFPPh, H2Ac4mFPPh, H2Ac4pFPPh), N⁴-*ortho*-, -*meta*- and -*para*-chlorophenyl (H2Ac4oClPh, H2Ac4mClPh, H2Ac4pClPh), N⁴-*ortho*-, -*meta*- and -*para*-iodophenyl (H2Ac4oIPh, H2Ac4mIPh, H2Ac4pIPh) and N⁴-*ortho*-, -*meta*- and -*para*-nitrophenyl (H2Ac4oNO₂Ph, H2Ac4mNO₂Ph, H2Ac4pNO₂Ph) derivatives were assayed for their cytotoxicity against human malignant breast (MCF-7) and glioma (T98G and U87) cells. The compounds were highly cytotoxic against the three cell lineages (IC₅₀: MCF-7, 52–0.16 nM; T98G, 140–1.0 nM; U87, 160–1.4 nM). All tested thiosemicarbazones were more cytotoxic than etoposide and did not present any haemolytic activity at up to 10⁻⁵ M. The compounds were able to induce programmed cell death. H2Ac4pClPh partially inhibited tubulin assembly at high concentrations and induced cellular microtubule disorganization.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In 2030 an estimated 12 million deaths from cancer are projected in the world.¹ Breast cancer, one of the highest incident types, affects more than one million women every year.² Treatment options for patients with advanced breast cancer are varied and include endocrine therapies, chemotherapies and targeted therapies. Nonetheless, the high mortality evoked by this pathology is related to the resistance of breast tumor cells to conventional therapy.³

Malignant gliomas are the most frequent and lethal cancers originating in the central nervous system and the second most common form of cancer in pediatric patients.⁴ Malignant gliomas are classified as astrocytomas, oligodendrogliomas, and oligoastrocytomas and are histologically graded as II, III, or IV by WHO. The

most aggressive, grade IV, astrocytoma is referred to as glioblastoma multiforme.⁵ Traditionally, patients with glioblastoma multiforme have been managed with surgery followed by radiotherapy. More recently, the oral alkylating agent temozolamide has become the standard of care for the management of glioblastoma multiforme.⁶ Other alternative chemotherapy agents, such as etoposide, carboplatin and nitrosurea-containing procarbazine, lomustine and vincristine, have also been studied.⁷ These therapies produce, however, only a short median survival time.⁸ Moreover, the low tolerance of the central nervous system to conventional chemotherapeutic agents impairs the effectiveness of the treatment.⁹ Thus, it is important to search for novel drug candidates in order to overcome these challenges.

Thiosemicarbazones constitute an interesting class of compounds with a wide spectrum of pharmacological applications.¹⁰ α (N)-Heterocyclic thiosemicarbazones have been extensively investigated as potential anticancer agents.¹¹ The search for an effective anticancer agent led to the onset of clinical studies of

* Corresponding author. Tel.: +55 31 34095740; fax: +55 31 34095700.
E-mail address: hberaldo@ufmg.br (H. Beraldo).

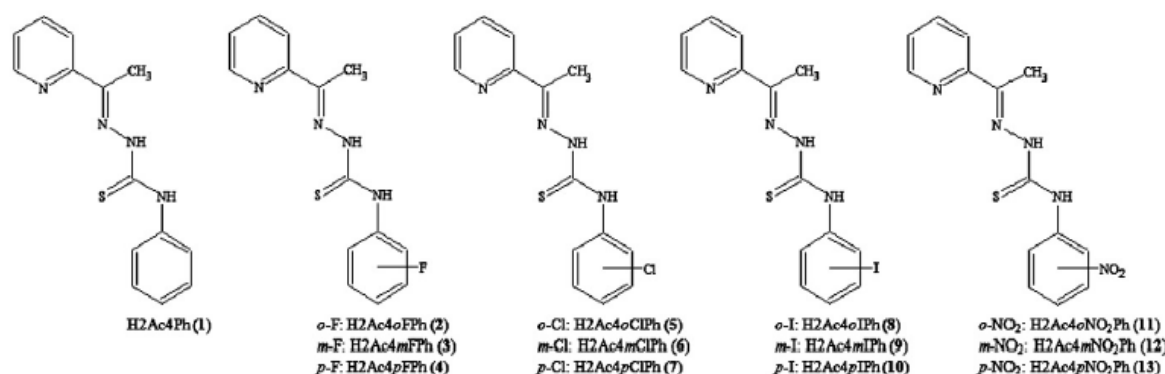


Figure 1. Structural representation of **1** (H2Ac4Ph), **2** (H2Ac4oFPh), **3** (H2Ac4mFPh), **4** (H2Ac4pFPh), **5** (H2Ac4oClPh), **6** (H2Ac4mClPh), **7** (H2Ac4pClPh), **8** (H2Ac4oIPh), **9** (H2Ac4mIPh), **10** (H2Ac4pIPh), **11** (H2Ac4oNO₂Ph), **12** (H2Ac4mNO₂Ph), **13** (H2Ac4pNO₂Ph).

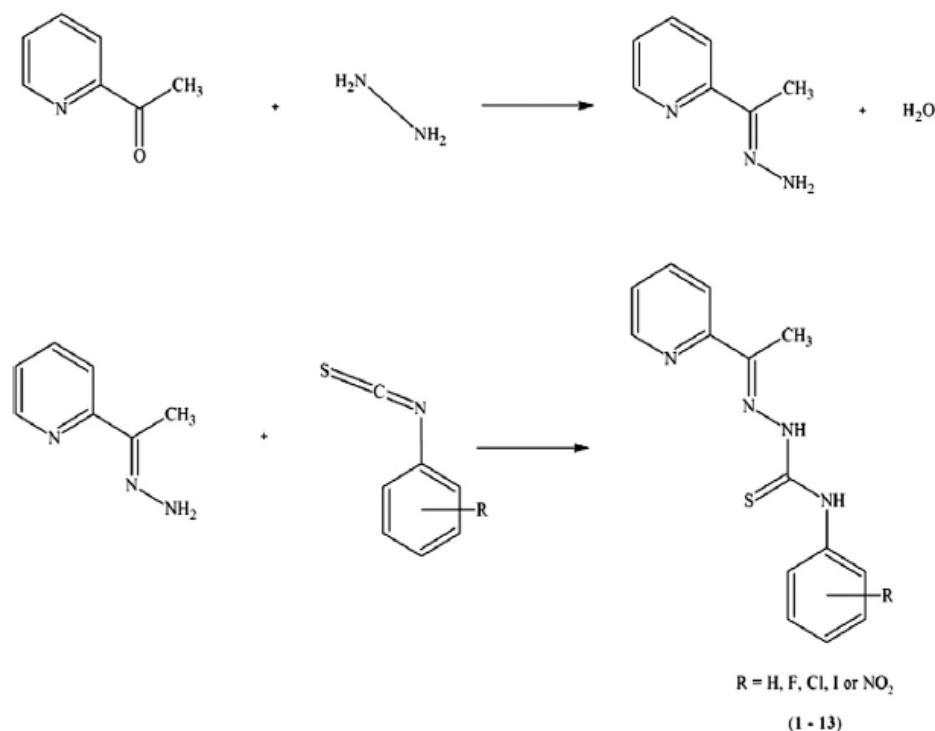
3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP; Triapine[®], Vion Pharmaceuticals Inc., New Haven, CT).^{12,13} The antitumor activity of $\alpha(N)$ -heterocyclic thiosemicarbazones has been attributed to their ability to inhibit ribonucleoside diphosphate reductase (RDR), a rate-limiting enzyme in DNA syntheses that catalyzes the conversion of ribonucleotides into deoxyribonucleotides.^{11–14}

The cytotoxic activity of thiosemicarbazones and their metal complexes against a variety of human solid tumor cell lines as well as leukemic cells has been reported by other authors^{15–19} and by our group.^{20–24} Particularly, we have recently demonstrated that **1** (H2Ac4Ph) and its *N*⁴-*ortho*-, *-meta*- and *-para*-chlorophenyl and *N*⁴-*ortho*-, *-meta*- and *-para*-tolyl derivatives showed cytotoxicity at nanomolar concentrations against malignant glioma.²⁵ **1** and its chlorophenyl-derivatives were highly active against

glioblastoma, and these results encouraged us to further investigate their cytotoxic properties as well as those of novel derivatives.²⁵

The development of anticancer drugs requires the evaluation of the possible mechanism of action involved in the process of cancer cell death. During the past decade, advances in chemotherapy in order to induce apoptosis in cancer cells were achieved. More recently, the focus of the research has been on the non-apoptotic types of programmed cell death, such as autophagy, which is characterized by an increase in the number of autophagosomes, vesicles that surround cellular organelles.²⁶ Subsequently, autophagosomes merge with lysosomes and digest the organelles, leading to cell death.²⁷

Apoptosis and autophagy are predominantly distinct. However, several studies have demonstrated cross-talk between them.²⁶ A



Scheme 1. Synthesis of compounds 1–13.

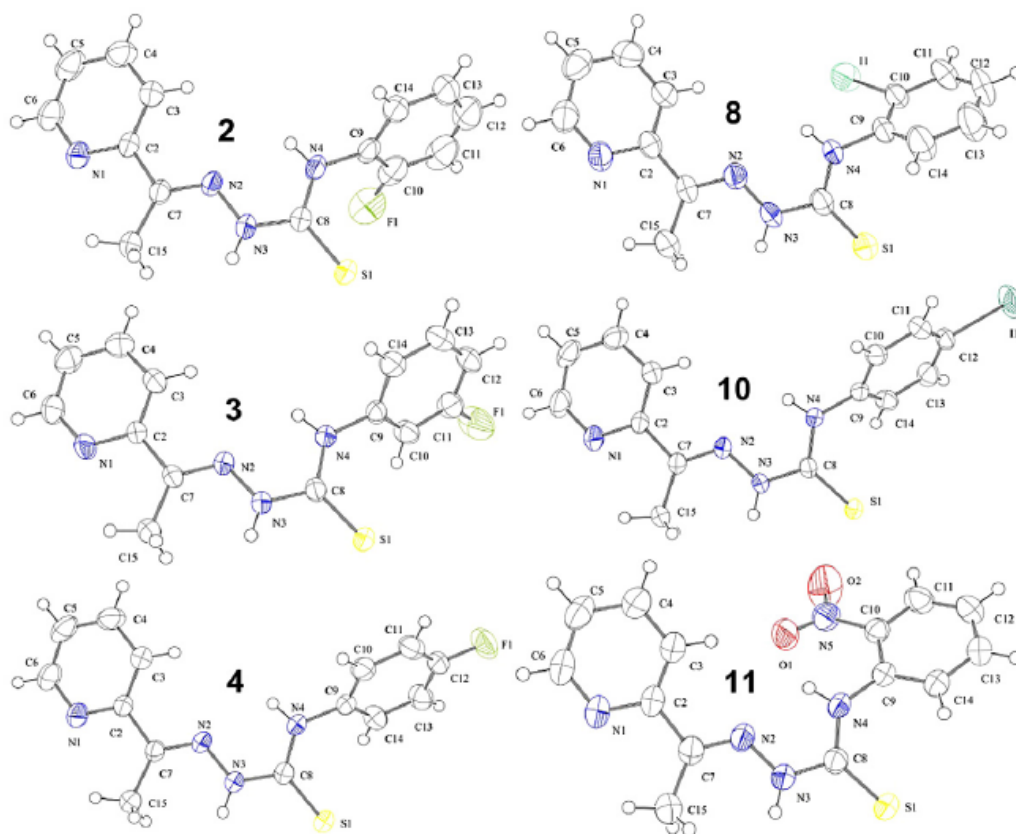


Figure 2. Molecular plots of **2**, **3**, **4**, **8**, **10** and **11** showing the labelling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level.

variety of chemotherapeutic agents (alkylating agents and arsenic trioxide), hormonal therapies (tamoxifen and vitamin D analogues), natural compounds (resveratrol), cytokines (IFN γ), gene therapies (p53 and p27Kip1), microtubule disturbing agents and radiotherapy have shown to trigger autophagic cell death in a panel of cancer cells.²⁸

In the present work we evaluated the cytotoxicities of *N*⁴-phenyl 2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4Ph; *N*-(phenyl)-2-(1-(pyridin-2-yl)ethylidene)hydrazinecarbothioamide) (**1**) and its *N*⁴-*ortho*-, *-meta*- and *-para*-fluorophenyl (H2Ac4oFPh, H2Ac4mFPh, H2Ac4pFPh) (**2–4**), *N*⁴-*ortho*-, *-meta*- and *-para*-chlorophenyl (H2Ac4oClPh, H2Ac4mClPh, H2Ac4pClPh) (**5–7**), *N*⁴-*ortho*-, *-meta*- and *-para*-iodophenyl (H2Ac4oIPh, H2Ac4mIPh, H2Ac4pIPh) (**8–10**) and *N*⁴-*ortho*-, *-meta*- and *-para*-nitrophenyl (H2Ac4oNO₂Ph, H2Ac4mNO₂Ph, H2Ac4pNO₂Ph) (**11–13**) derivatives (Fig. 1) against MCF-7 (breast adenocarcinoma), U87 (glioblastoma multiforme expressing wild-type p53 protein) and T98G (glioblastoma multiforme expressing mutant p53) human malignant tumor cells. A preliminary analysis of the compounds' mechanism of action was carried out along with structure–activity relationship (SAR) studies. The effect of H2Ac4pClPh on tubulin assembly and its effects on cellular microtubule organization and mitotic arrest were also investigated.

2. Results and discussion

2.1. Formation of the thiosemicarbazones

Preparation of all thiosemicarbazones was carried out by a previously described method,²⁹ as shown in Scheme 1. The novel

thiosemicarbazones **8–10** were characterized by means of their infrared, NMR and HRMS spectra.

2.2. Characterization of the thiosemicarbazones

In the infrared spectra of **8–10** vibrations attributed to ν (N–H) at 3306–3264 and 3232–3208 cm⁻¹ were observed. Absorptions at 1595–1581 and 786–782 cm⁻¹ were attributed to ν (C=N) and ν (C=S), respectively. Absorptions attributed to the in-plane deformation mode of the pyridine ring were observed at 621–616 cm⁻¹.

Duplicated signals were observed in the ¹H NMR spectra (DMSO-*d*₆) of **8–10** suggesting a mixture of the *E* (95–87%) and *Z* (13–5%) configurational isomers. This behavior has also been observed for other 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones.²⁵ The *N*³-H chemical shifts at δ 10.90–10.79 ppm, are characteristic of the *E* configuration, in which *N*³-H is hydrogen bonded to the solvent,^{20–22} while chemical shifts at δ 14.69–14.66 ppm indicate the presence of the *Z* configuration, in which *N*³-H is hydrogen bonded to the pyridine nitrogen.^{20–22} Some hydrogen signals of the *Z* isomer could not be observed separately since they appear in the same region as those of the *E* isomer.

2.3. X-ray diffraction analysis

Upon slow evaporation in 9:1 acetone/DMSO crystals of **2–4**, **8**, **10** and **11** were formed and their crystal structures were determined by X-ray diffraction. The crystal structures of **1**³⁰ and **5**–**7**²⁵ had been previously determined.

Figure 2 shows perspective views of **2–4**, **8**, **10** and **11**. Table 1 reports the crystal data and refinement results for the determined

Table 1
Crystal data and refinement results for **2–4**, **8**, **10** and **11**

Compound	2	3	4	8	10	11
Empirical formula	C ₁₄ H ₁₃ FN ₄ S	C ₁₄ H ₁₃ FN ₄ S	C ₁₄ H ₁₃ FN ₄ S	C ₁₄ H ₁₃ IN ₄ S	C ₁₄ H ₁₃ IN ₄ S	C ₁₄ H ₁₃ N ₅ O ₂ S
Formula weight	288.34	288.34	288.34	396.24	396.24	315.35
Crystal system	Monoclinic	Triclinic	Triclinic	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic
Space group	P 21/c	P $\bar{1}$	P $\bar{1}$	P 21/n	P 21/n	P 21/c
Unit cell dimensions						
a, Å	5.4620(2)	5.8660(4)	5.8396(4)	11.3298(3)	10.4026(3)	11.3298(3)
b, Å	10.5664(4)	10.1714(6)	10.2292(6)	7.5376(2)	5.6886(2)	7.5376(2)
c, Å	24.1928(9)	12.0075(7)	11.8164(7)	17.2904(5)	25.9488(6)	17.2904(5)
α , °	90	75.061(5)	76.218(5)	90	90	90
β , °	94.868(3)	85.873(5)	87.761(5)	98.910(3)	92.499(2)	98.910(4)
γ , °	90	89.139(5)	89.358(5)	90	90	90
Volume, Å ³	1391.22(9)	690.42(7)	685.00(7)	1529.08(11)	1534.09(8)	1458.77(7)
Z/density calcd, Mg/m ³	4/1.377	2/1.387	2/1.398	4/1.721	4/1.716	4/1.436
Absorption coefficient, mm ⁻¹	0.239	0.241	0.243	2.226	2.219	0.237
F(000)	600	300	300	776	776	656
Crystal size, mm	0.20 × 0.12 × 0.06	0.23 × 0.16 × 0.12	0.25 × 0.12 × 0.08	0.36 × 0.20 × 0.10	0.39 × 0.20 × 0.07	0.23 × 0.17 × 0.08
θ range for data coll., °	3.19–26.37	4.10–26.37	3.02–26.37	2.76–26.37	3.00–26.37	2.77–26.37
Index range	–6 ≤ h ≤ 6 –9 ≤ k ≤ 13 –25 ≤ l ≤ 3	–7 ≤ h ≤ 6 –12 ≤ k ≤ 11 –14 ≤ l ≤ 11	–7 ≤ h ≤ 6 –12 ≤ k ≤ 12 –14 ≤ l ≤ 10	–15 ≤ h ≤ 14 –5 ≤ k ≤ 5 –34 ≤ l ≤ 34	–11 ≤ h ≤ 13 –6 ≤ k ≤ 7 –31 ≤ l ≤ 32	–14 ≤ h ≤ 13 –9 ≤ k ≤ 9 –20 ≤ l ≤ 21
Collected reflections/unique (R _{int})	10392/2834(0.0605)	4972/2809(0.0353)	5207/2804(0.0278)	9035/3120(0.0325)	13323/3120(0.0598)	11910/2987(0.0371)
Completeness (%)	99.9 (to 26.37°)	99.6 (to 26.37°)	99.9 (to 26.37°)	99.9 (to 26.37°)	99.9 (to 26.37°)	99.9 (to 26.37°)
Max and min transmission	0.9858 and 0.9538	0.9717 and 0.9467	0.9811 and 0.9660	1.00000 and 0.77529	0.8784 and 0.4782	0.9813 and 0.9475
Data/restraints/parameters	2834/0/182	2809/0/182	2804/0/182	3120/0/182	3120/0/182	2966/0/200
Goodness-of-fit on χ^2	0.987	1.063	0.915	0.887	1.053	1.061
Final R indices [I > 2 σ (I)]	R ₁ = 0.0422 wR ₂ = 0.1155	R ₁ = 0.0480 wR ₂ = 0.1425	R ₁ = 0.0379 wR ₂ = 0.0846	R ₁ = 0.0323 wR ₂ = 0.0658	R ₁ = 0.0392 wR ₂ = 0.1096	R ₁ = 0.0369 wR ₂ = 0.0990
R indices (all data)	R ₁ = 0.0601 wR ₂ = 0.1293	R ₁ = 0.0645 wR ₂ = 0.1495	R ₁ = 0.0660 wR ₂ = 0.0901	R ₁ = 0.0607 wR ₂ = 0.0706	R ₁ = 0.0511 wR ₂ = 0.1140	R ₁ = 0.0540 wR ₂ = 0.1039
Largest peak & hole, e Å ⁻³	0.300/–0.326	0.598/–0.279	0.219/–0.178	0.607/–0.706	1.066/–1.246	0.161/–0.206

structures. Selected intra-molecular bond distances and angles for **1**³⁰ and **5–7**,²⁵ **2–4**, **8**, **10** and **11** are given in Tables 2 and 3, respectively.

The bond distances are very similar in all structures. The S1–C8 bond varies from 1.654(3) to 1.677(2) Å. This bond is longer in **1** than in its derivatives. The C2–C7 bond varies from 1.472(4) to 1.497(2) Å. The N2–C7, N2–N3, N4–C8 and N4–C9 bonds are in the 1.278(2)–1.290(3) Å, 1.361(3)–1.378(3) Å, 1.328(4)–1.3514(19) Å and 1.3973(19)–1.430(3) Å ranges, respectively. Compound **11** has the shortest N4–C9 bond, which can be attributed to the resonance withdrawing effect of the *ortho* nitro group. In general the bond distances in the thiosemicarbazone skeleton of **11** were shorter than in the other derivatives (see Table 2).

As expected, in all thiosemicarbazones the bond angles are also similar, but some differences were observed for the N4–C8–N3, N4–C8–S1, C7–N2–N3 and C8–N4–C9 bond angles in **11** in comparison with the other thiosemicarbazones (see Table 3). These differences might be attributed to a geometric constraint due to the formation of an additional N4H···O2 intra-molecular hydrogen bond observed in the structure of **11** (see Table 4) which is absent in thiosemicarbazones **2–4**, **8** and **10**.

All thiosemicarbazones **2–4**, **8**, **10** and **11** adopt the *EE* conformation in relation to the C7–N2 and N3–C8 bonds. The presence of the *E* conformation with respect to the N3–C8 bond, commonly observed in the solid state, is associated with the formation of a pair of N–H···S hydrogen bonds that are interrelated across a center of inversion generating dimers.²⁵ As can be seen in Table 4, all the NH···S interactions are linked to a symmetry operation. A weak N4–H···N2 intra-molecular hydrogen bond (see Table 4) is present in all structures, except in **8**. This hydrogen bond probably hinders rotation around the N3–C8 bond and might contribute to the stability of the *EE* conformation. Fig. 3 shows the packing of **3** and **11**, with the inter-molecular N–H···S hydrogen bonds.

2.4. Cytotoxic activity against malignant breast and glioma cells

The results showed that all thiosemicarbazones were cytotoxic in a dose-dependent way against all studied tumor cell lineages (Supporting Material). The concentrations that inhibit 50% of cell survival (IC₅₀) (Table 5) were found in the 52–0.16, 140–1.0, and 160–1.4 nM ranges for MCF-7, T98G and U87 cells, respectively. Breast tumor cells were significantly more sensitive to the thiosemicarbazones' cytotoxic effect than glioma cells. However, there was no significant difference between their cytotoxic effect against U87 and T98G cells, suggesting that the mutation extent in the p53 gene of T98G cells did not interfere in the thiosemicarbazones' cytotoxic effect.

Although in general the presence of substituents on the N⁴-phenyl group does not lead to more cytotoxic compounds, in some cases the substituted derivatives were as or more potent than **1**. Thus, in these cases the presence of different substituents was an interesting strategy to improve the cytotoxicity of **1**. Generally, the *ortho* substituted thiosemicarbazones were more active against the three cell lines than their *meta* and *para* position isomers.

All thiosemicarbazones presented higher cytotoxic activity than the topoisomerase II inhibitor etoposide for which the IC₅₀ values were 480, 460 and 620 nM against MCF-7, T98G and U87 cells, respectively. Moreover, the thiosemicarbazones' antitumoral doses resulted in no significant toxicity to red blood cells (IC₅₀ > 10⁻⁵ M), indicating a good therapeutic index.

2.5. SAR studies

SAR studies were carried out to identify the stereo and electronic properties determined by theoretical calculations that may be involved in the mechanism of action of **1–13**. Properties of interest in this study were molecular surface area, theoretical octanol–water

Table 2
Selected bond distances (Å) for **1** and its derivatives

Atoms	1 ³⁰	5 ^{25a}	6 ²⁵	7 ²⁵	2	3	4	8	10	11	
S1–C8	1.677(2)	1.654(3)	1.654(3)	1.669(3)	1.671(2)	1.6711(17)	1.671(2)	1.672(2)	1.665(3)	1.670(3)	1.6613(15)
C2–C7	1.486(2)	1.474(4)	1.472(4)	1.487(4)	1.484(2)	1.488(2)	1.487(3)	1.487(2)	1.473(5)	1.495(4)	1.497(2)
N2–C7	1.284(3)	1.281(3)	1.278(3)	1.290(3)	1.283(2)	1.283(2)	1.287(3)	1.280(2)	1.285(4)	1.285(4)	1.278(2)
N2–N3	1.376(2)	1.362(3)	1.361(3)	1.378(3)	1.374(2)	1.3783(19)	1.371(2)	1.377(2)	1.368(4)	1.376(3)	1.3681(18)
N3–C8	1.358(3)	1.359(3)	1.351(3)	1.354(3)	1.352(2)	1.346(2)	1.359(3)	1.349(2)	1.361(4)	1.352(4)	1.361(2)
N4–C8	1.346(3)	1.328(4)	1.336(3)	1.349(3)	1.341(2)	1.343(2)	1.340(3)	1.342(2)	1.336(4)	1.347(4)	1.3514(19)
N4–C9	1.421(3)	1.413(3)	1.421(3)	1.430(3)	1.423(2)	1.412(3)	1.421(3)	1.428(2)	1.419(4)	1.417(4)	1.3973(19)
C–R ^b	–	1.679(11)	1.724(3)	1.741(3)	1.7411(19)	1.347(3)	1.352(3)	1.362(2)	2.088(3)	2.087(3)	1.456(2)
		1.800(14)									

^a There are two molecules in the asymmetric unit.^b R = F, Cl, I or NO₂.**Table 3**
Selected angles for **1** and its derivatives

Atoms	1 ³⁰	5 ^{25a}	6 ²⁵	7 ²⁵	2	3	4	8	10	11	
N2N3C8	118.9(2)	118.2(2)	118.9(2)	119.0(2)	118.66(15)	118.14(14)	118.67(17)	119.18(14)	119.1(3)	118.7(2)	118.23(13)
N3C8S1	119.7(1)	121.0(2)	121.5(2)	121.2(2)	119.99(15)	121.12(13)	119.93(15)	120.19(12)	120.7(2)	120.2(2)	120.70(11)
N4C8N3	114.8(2)	114.7(2)	114.4(2)	114.4(2)	114.71(17)	114.99(15)	114.43(17)	114.58(15)	114.9(3)	114.9(2)	112.28(13)
N4C8S1	125.5(2)	124.3(2)	124.1(2)	124.3(2)	125.26(14)	123.88(14)	125.60(15)	125.22(13)	124.5(2)	124.9(2)	126.99(13)
C7N2N3	118.8(2)	119.1(2)	118.7(2)	118.7(2)	118.86(15)	118.79(14)	118.37(18)	118.91(13)	118.9(3)	118.1(2)	121.28(14)
C8N4C9	127.6(2)	125.1(3)	123.5(2)	125.4(2)	126.87(17)	125.95(15)	127.40(17)	127.07(14)	125.2(3)	126.5(2)	129.92(13)

^a There are two molecules in the asymmetric unit.**Table 4**
Hydrogen bonds [Å and °] for **2–4**, **8**, **10** and **11**

Compound	D–H...A	d(D–H)	d(H...A)	d(D...A)	(D–H...A)	Symmetry operation
2	N4–H4...N2	0.86	2.16	2.568(2)	108.6	–
	N3–H3...S1	0.86	2.72	3.5798(16)	174.4	–x+2, –y+1, –z+1
3	N4–H4...N2	0.86	2.16	2.580(2)	109.5	–
	N3–H3...S1	0.86	2.87	3.7215(18)	172.8	–x, –y+1, –z+2
4	N4–H4...N2	0.86	2.16	2.583(2)	110.1	–
	N3–H3...S1	0.86	2.87	3.7289(15)	174.5	–x, –y+1, –z+1
8	N3–H3A...S1	0.86	2.78	3.635(3)	171.0	–x+1, –y+1, –z
	N4–H4...N2	0.86	2.17	2.586(3)	109.1	–
10	N3–H3A...S1	0.86	2.80	3.652(3)	173.8	–x+1, –y+2, –z+1
	N4–H4...N2	0.86	2.05	2.5208(19)	113.4	–
11	N3–H3A...S1	0.86	2.79	3.6383(14)	167.9	–x+1, –y+2, –z
	N4–H4...O1	0.86	2.06	2.6137(17)	121.8	–
	N4–H4...O1	0.86	2.06	2.6137(17)	121.8	–

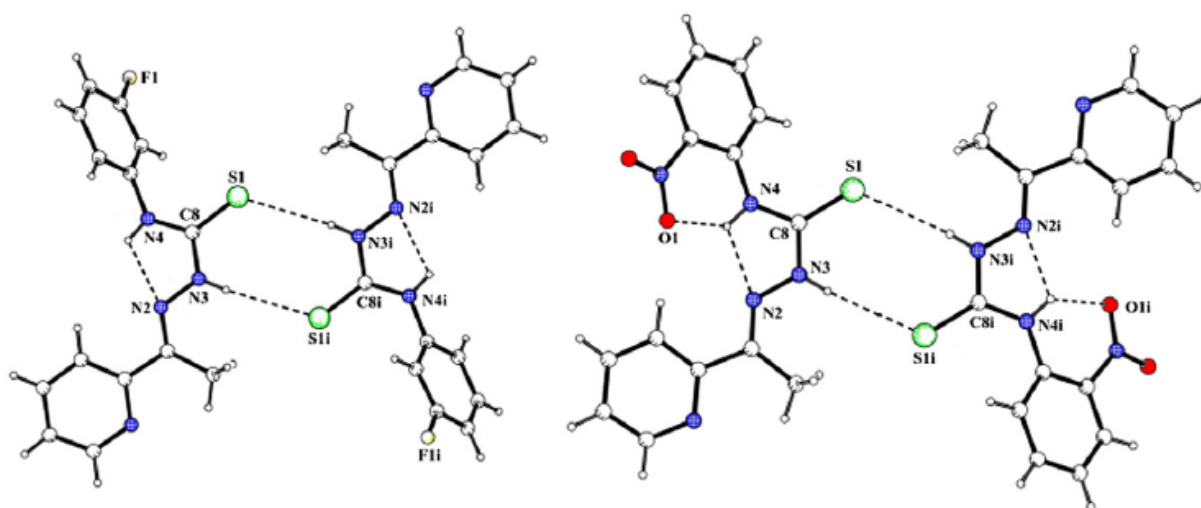
**Figure 3.** Molecular packing of **3** (left) and **11** (right), showing the N–H...S hydrogen bond (dashed lines).

Table 5
Cytotoxic effect of **1–13** and etoposide on malignant cells and their haemolytic activity

Compound	IC ₅₀ (nM) ^a			Haemolytic activity (nM) ^b
	MCF-7	T98G	U87	
1	0.18 ± 0.06	6.80 ± 0.83	1.40 ± 0.39	>10000
2	0.39 ± 0.20	3.10 ± 2.20	5.00 ± 0.47	>10000
3	9.00 ± 2.00	12.00 ± 5.40	18.00 ± 1.70	>10000
4	1.20 ± 0.73	17.00 ± 1.90	10.00 ± 10.00	>10000
5	0.16 ± 0.14	1.10 ± 0.96	2.60 ± 2.10	>10000
6	24.00 ± 1.50	1.00 ± 0.40	31.00 ± 9.60	>10000
7	8.50 ± 0.40	5.90 ± 0.76	1.70 ± 0.82	>10000
8	4.10 ± 1.90	8.10 ± 4.20	6.10 ± 2.10	>10000
9	45.00 ± 37.00	61.00 ± 25.00	84.00 ± 10.00	>10000
10	6.60 ± 3.20	64.00 ± 36.00	59.00 ± 37.00	>10000
11	5.70 ± 0.19	6.60 ± 3.30	4.30 ± 0.82	>10000
12	38.00 ± 32.00	140.00 ± 110.00	69.00 ± 7.10	>10000
13	52.00 ± 21.00	140.00 ± 11.00	160.00 ± 56.00	>10000
Etoposide	480.00 ± 70.00	460.00 ± 25.00	620.00 ± 150.00	>10000

^a IC₅₀ determined by the MTT assay.^b IC₅₀ determined by direct haemolysis assay. Data were expressed as average ± standard deviation, n = 4.

partition coefficients (log*P*), dipole moment, highest occupied molecular orbital (HOMO) and lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) energies, which were correlated to pIC₅₀ (−log IC₅₀). Molecular surface area may offer information on stereo features for drug–receptor interactions. Log*P* and dipole values may give some insights on the degree of lipophilicity of these molecules. Additionally, HOMO and LUMO energies are related to ionization potential and electron affinity, respectively. These frontier orbitals are associated to the molecule's reactivity. HOMO energy is closely related to susceptibility to electrophilic attack while LUMO energy is closely related to susceptibility to nucleophilic attack.

Calculated stereo and electronic properties for **1–13** and experimental pIC₅₀ values against MCF-7, T98G and U87 cells are shown in Table 6. Attempting to establish some correlation between stereo–electronic parameters and biological activity, we

built simple correlation matrices (Supporting Material) for the *E* and *Z* isomers.

SAR data for the *E* isomers indicate that there are similar correlations between the chemical descriptors and cytotoxic activity against MCF-7 and U87 cells. Different correlations were found between descriptors and cytotoxicity against T98G and U87 cells. Although U87 and T98G are both glioma cells, the former is wild-type while the latter is a p53-mutant cell. Thus, the mechanisms of thiosemicarbazones' cytotoxic action may be different in these two cell lines. Reasonable correlations were observed between the cytotoxic activities against MCF-7 and U87 cells and the molecular surface area (*R* = −0.71 and −0.60 for MCF-7 and U87 cells, respectively), the HOMO energy (*R* = 0.69 and 0.67 for MCF-7 and U87 cells, respectively) and the charge on sulfur (*R* = 0.71 and 0.68 for MCF-7 and U87 cells, respectively). Thus,

Table 6
Experimental pIC₅₀ (−log IC₅₀) values for **1–13** against MCF-7, T98G and U87 cells and calculated stereo and electronic properties

Compound	pIC ₅₀ MCF-7	pIC ₅₀ T98G	pIC ₅₀ U87	Surface area (Å)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Log <i>P</i> (ALOG <i>P</i> s)	Dipole (D)	Charge (e. u.) ^a		
									N _{py}	N _{azo}	S
<i>E</i> Isomers											
1	9.745	8.167	8.854	365.315	−8.171	1.690	3.100	5.281	−0.484	−0.296	−0.200
2	9.409	8.509	8.301	371.197	−8.307	1.650	3.220	4.211	−0.485	−0.296	−0.198
3	8.046	7.921	7.745	372.401	−8.400	1.520	3.240	4.496	−0.484	−0.297	−0.193
4	8.921	7.770	8.000	372.370	−8.283	1.536	3.230	5.795	−0.483	−0.297	−0.201
5	9.796	8.959	8.585	380.124	−8.346	1.621	3.670	3.877	−0.485	−0.293	−0.196
6	7.620	9.000	7.509	382.152	−8.416	1.509	3.650	4.374	−0.484	−0.298	−0.192
7	8.071	8.229	8.770	382.175	−8.304	1.492	3.650	6.042	−0.483	−0.298	−0.195
8	8.387	8.092	8.215	390.191	−8.332	1.612	3.780	4.437	−0.485	−0.290	−0.196
9	7.347	7.215	7.076	391.944	−8.407	1.510	3.790	4.651	−0.484	−0.297	−0.193
10	8.180	7.194	7.229	391.979	−8.220	1.483	3.800	5.788	−0.483	−0.297	−0.195
11	8.244	8.180	8.367	402.386	−8.370	0.840	3.170	1.826	−0.489	−0.287	−0.192
12	7.420	6.854	7.161	406.617	−8.602	1.225	3.170	4.174	−0.484	−0.300	−0.188
13	7.284	6.854	6.796	406.613	−8.688	1.096	3.180	7.978	−0.483	−0.299	−0.178
<i>Z</i> Isomers											
1	9.745	8.167	8.854	364.729	−7.916	1.466	3.100	6.968	−0.503	−0.290	−0.201
2	9.409	8.509	8.301	370.528	−8.063	1.469	3.220	6.024	−0.503	−0.288	−0.201
3	8.046	7.921	7.745	371.803	−8.152	1.371	3.240	7.161	−0.503	−0.291	−0.194
4	8.921	7.770	8.000	371.781	−8.030	1.395	3.230	8.186	−0.503	−0.291	−0.203
5	9.796	8.959	8.585	379.517	−8.107	1.448	3.670	5.864	−0.503	−0.286	−0.196
6	7.620	9.000	7.509	381.567	−8.169	1.359	3.650	7.277	−0.503	−0.292	−0.194
7	8.071	8.229	8.770	381.574	−8.060	1.352	3.650	8.704	−0.503	−0.292	−0.197
8	8.387	8.092	8.215	389.019	−8.119	1.437	3.780	6.278	−0.503	−0.283	−0.194
9	7.347	7.215	7.076	391.345	−8.160	1.358	3.790	7.231	−0.503	−0.291	−0.195
10	8.180	7.194	7.229	391.425	−7.998	1.343	3.800	8.103	−0.503	−0.291	−0.196
11	8.244	8.180	8.367	403.070	−8.258	1.078	3.170	4.617	−0.504	−0.279	−0.190
12	7.420	6.854	7.161	406.006	−8.390	1.228	3.170	8.250	−0.504	−0.293	−0.190
13	7.284	6.854	6.796	405.998	−8.473	1.077	3.180	11.486	−0.504	−0.292	−0.179

^a e. u.: electrostatic unit.

the smaller the molecular surface area, the higher the cytotoxic activity against MCF-7 and U87 cells. A direct correlation was found between the HOMO energies and the activities against MCF-7 and U87 cells, which is an interesting result since the HOMO energy is closely related to the molecules' reactivity. Besides, the direct correlation between cytotoxicity and the charge on sulfur indicates that the more negatively charged the sulfur atom, the higher anti-proliferative effect of the thiosemicarbazones against MCF-7 and U87 cells. It's noteworthy that HOMO energy and negative charge on sulfur are correlated ($R = 0.90$) and both properties are correlated to the activities against MCF-7 and U87 cells. Thus, the sulfur atom may play an important role in the thiosemicarbazones' reactivity and therefore, in their cytotoxic activity.

Comparison of HOMO density plots for all *E* isomers (Fig. 4) shows distinct electronic delocalization among the studied thiosemicarbazones, which may partially account for the difference in biological activity of these compounds, although other parameters may not be excluded.

Concerning correlation between the properties of *E* isomers and activity against T98G cells, we only found an inverse correlation between cytotoxicity and molecular surface area ($R = -0.60$).

The same correlations observed for *E* isomers were also verified for the *Z* isomers. In addition, for the *Z* isomers the cytotoxic activity against T98G cells is correlated to the LUMO energy ($R = 0.63$) and the dipole ($R = 0.62$).

2.6. Morphological analysis of tumor cells

Treatment with compounds 1–13 induced visible membrane and nuclear alterations characteristics of programmed cell death on breast and glioma cells. The main morphological changes observed were: irregularities in cellular shape, cell shrinkage and membrane blebbing (Fig. 5). Moreover, chromatin condensation and DNA fragmentation were observed in all treated cells when

stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Fig. 6). These results suggest that the reduction of cell survival after treatment with thiosemicarbazones occurred, at least in part, due to apoptosis induction.

Although DAPI is a commonly used assay for detection of apoptosis, this method cannot rule out other kinds of cell death and it is very important to analyze cell death using other fluorescent DNA binding dyes as acridine orange/ethidium bromide.³¹

Figures. 5 and 6 show, as examples, breast and glioma cells treated with compound 7.

2.7. Acridine orange–ethidium bromide (AO/EB) double staining assay

Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining can be used to differentiate live, apoptotic and necrotic cells. Moreover, acridine staining is very useful to show cytoplasmic acidic vacuoles characteristics of autophagy. Under AO/EB staining untreated control breast and glioma cells showed cytoplasm and nucleus with homogeneous green with minimal orange fluorescence indicative of healthy cells. On the other hand, cells treated with the thiosemicarbazones presented chromatin condensation, visible as bright green fragments, and absence of EB fluorescence, indicating preserved membrane. All of these characteristics are typical of early apoptosis. Moreover, treated cells presented large acidic compartments in the cytoplasm, and visible red fluorescence suggesting the presence of autophagolysosomes, considered a characteristic feature of cells engaged in autophagy.³² However, more specific tests, like the quantification of mammalian autophagy protein (LC3),³³ are necessary to confirm this hypothesis. Further studies should be performed in order to determine the exact mechanism of cell death triggered by these compounds.

Chemotherapeutics like cisplatin and etoposide can induce apoptosis and autophagy in tumor cells.^{34,35} Taken together, our results suggest that, like cisplatin and etoposide, the studied

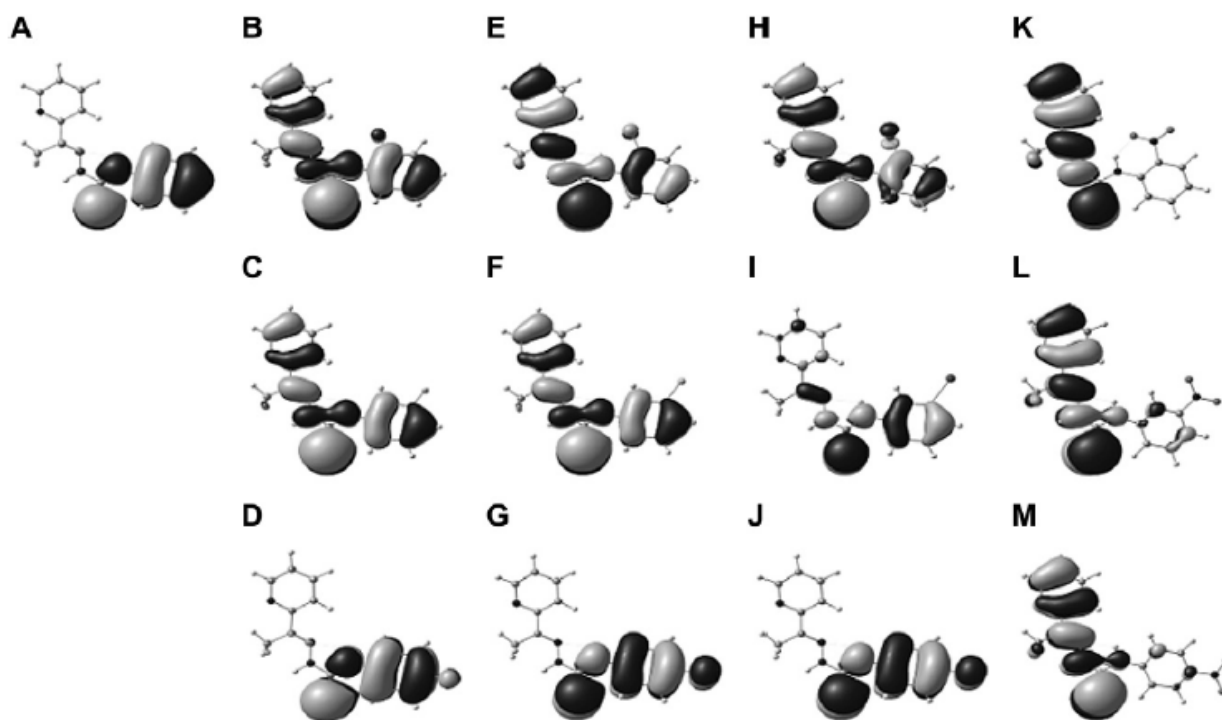


Figure 4. HOMO density distributions of: 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H), 9 (I), 10 (J), 11 (K), 12 (L) and 13 (M). Contour value = 0.018.

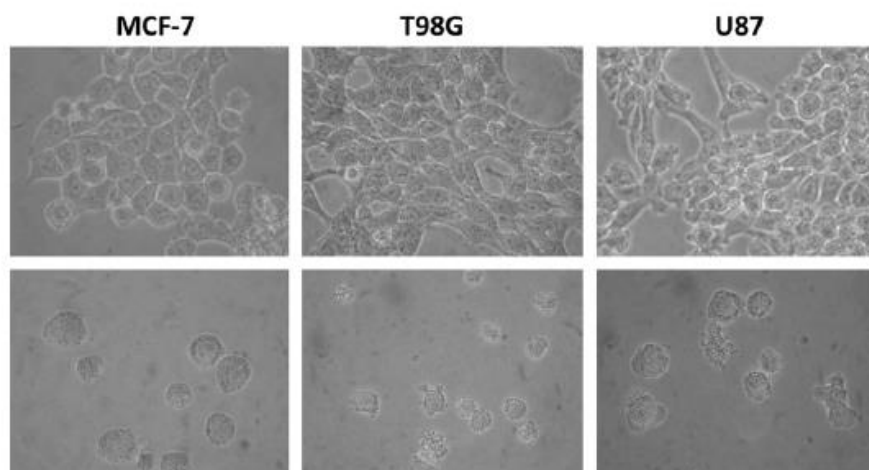


Figure 5. Compound 7 induces morphological changes on MCF-7 breast and T98G and U87 glioma tumor cell lines. Tumor cells were treated with 7 (1 μ M) for 48 h. Cell shrinkage and irregularity in cellular shape were seen in cells treated with 7. Photomicrographs from phase-contrast microscopy. Control cells are represented above and treated cells below. Magnification: 400 \times .

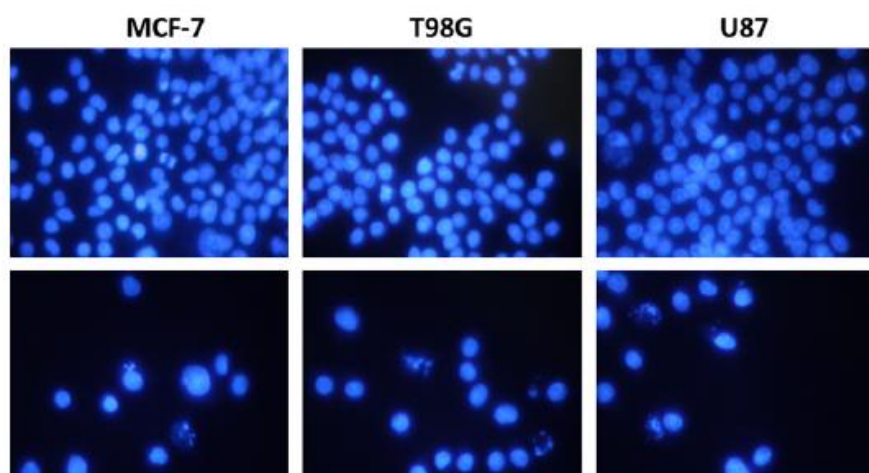


Figure 6. Compound 7 induces nuclear changes on MCF-7 breast and T98G and U87 glioma tumor cell lines. Tumor cells were treated with 7 (1 μ M) for 48 h. After treatment cells were stained with DAPI. Nuclear condensation and formation of apoptotic bodies were seen in cells treated with 7. Photomicrographs from fluorescence microscopy. Control cells are represented above and treated cells below. Magnification: 400 \times .

thiosemicarbazones were able to induce these two types of programmed cell death. Figure 7 shows, as example, breast and glioma cells treated with compound 7 and stained with acridine orange/ethidium bromide.

2.8. Effects on tubulin assembly

Interference with either assembly or disassembly of microtubules in rapidly dividing cells results in cell cycle arrest, triggering signals that induce apoptosis.³⁶ In light of the finding that cytotoxic thiosemicarbazones induce apoptosis, we investigated whether the mechanisms of either cytotoxicity or apoptosis were related to inhibition of tubulin assembly or microtubule stabilization. Four twofold concentrations of 7 were screened for their effects on *in vitro* tubulin polymerization (Fig. 8). As it can be seen, at high concentrations 7 seemed to cause a partial concentration-dependent inhibition of tubulin assembly. Although 2.5 μ M of colchicine completely abolished tubulin polymerization, total inhibition of tubulin assembly in the presence of 7 was not observed

even at concentrations close to the limit of solubility of the compound.

2.9. High content analysis of mitotic arrest

Microtubule interacting agents characteristically provoke cell cycle arrest and cellular microtubule perturbations.³⁷ The fact that 7 apparently inhibited *in vitro* polymerization of purified tubulin motivated the investigation on the effects of this compound on cellular microtubule perturbation and mitotic arrest. The cellular phenotypic changes associated with mitotic arrest caused by 7 were investigated as previously described.^{37,38} Asynchronously growing HeLa cells were treated with the assayed compounds and incubated with primary antibodies for tubulin and the mitotic marker protein phosphohistone H3, followed by fluorescein-isothiocyanate (FITC) and Cy3-conjugated secondary antibodies, respectively. Cells were detected by nuclear counterstaining with Hoechst 33342, which also provided information about chromatin condensation and cell density as markers of cell death.

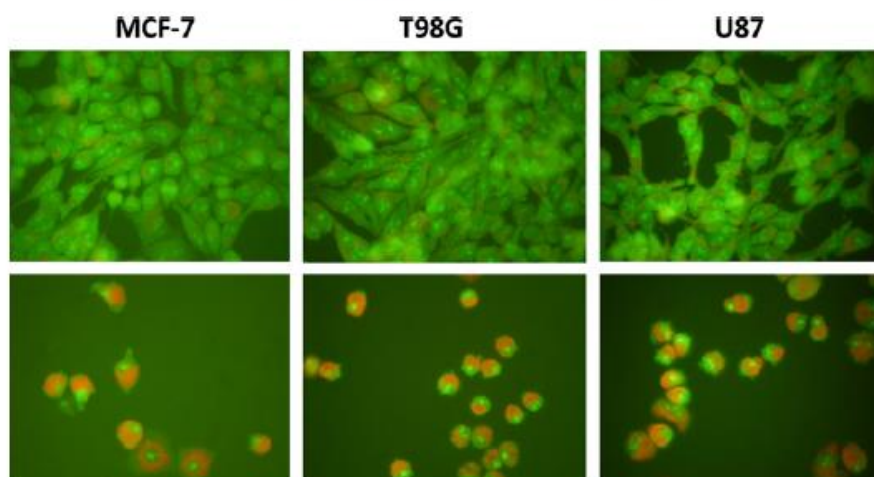


Figure 7. Detection of thiosemicarbazone-induced acidic autophagosomes and apoptosis. MCF-7 breast and T98G and U87 glioma tumor cell lines were treated with **7** (1 μ M) for 48 h. After treatment cells were stained with acridine orange/ethidium bromide. Photomicrographs from fluorescence microscopy. Control cells are represented above and treated cells below. Magnification: 400 \times .

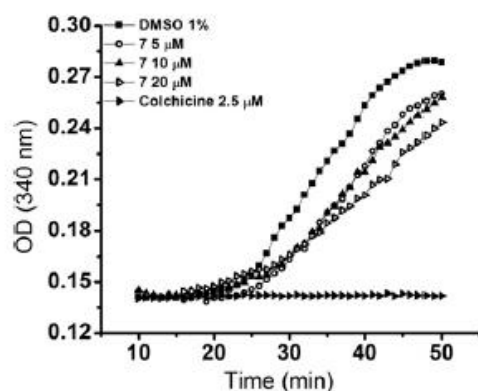


Figure 8. *In vitro* inhibition of tubulin assembly. Electrophoretically homogeneous bovine brain tubulin (final concentration 10 μ M; 1 mg mL⁻¹) was pre-incubated with the studied compounds dissolved in DMSO (1% v/v final concentration) and monosodium glutamate (0.8 M final concentration) at 30 $^{\circ}$ C in 96-well plates. The reaction mixtures were cooled to 0 $^{\circ}$ C for 10 min and guanosine-5'-triphosphate (GTP, 0.4 mM final concentration) was added. The absorbance at 350 nm was immediately followed in a spectrophotometer. Baselines were established and temperature was quickly raised to 37 $^{\circ}$ C. At high concentrations compound **7** partially inhibits tubulin polymerization in an apparent concentration-dependent manner.

Fluorescence micrographs of nuclei (blue), tubulin (green) and phosphohistone H3 (red) staining demonstrated that vehicle-treated cells have highly organized microtubules and a low percentage of mitotic cells, while nanomolar concentrations of colchicine induced cellular microtubule disorganization and mitotic arrest (Fig. 9A and B). Cells treated with low micromolar cytotoxic concentrations of **7** had a phenotype of generally disorganized microtubules with seemingly lower overall tubulin content. Moreover, the general cellular structure was lost (Fig. 9C). Hoechst 33342 staining revealed the presence of condensed and fragmented nuclei characteristic of apoptosis (Fig. 9B and C). However, in contrast to colchicine, which caused an increased number of phosphohistone H3-positive cells, the same phenotype was not observed with **7**, suggesting that **7** did not arrest cells in mitosis.

The multi-parametric mitotic arrest assay also showed that both colchicine and **7** caused cell loss, either through detachment or lysis. Although we had previously demonstrated that **7** inhibited cell growth of different cancer cell lines at nanomolar doses, higher doses (in the micromolar range) were required to inhibit attachment and survival of HeLa cells (Table 7).²⁵ The EC₅₀ values were obtained from the dose-response cell density curves. The form of the chromatin condensation, microtubule density and mitotic index graphs precluded IC₅₀ determinations. Accordingly, we determined

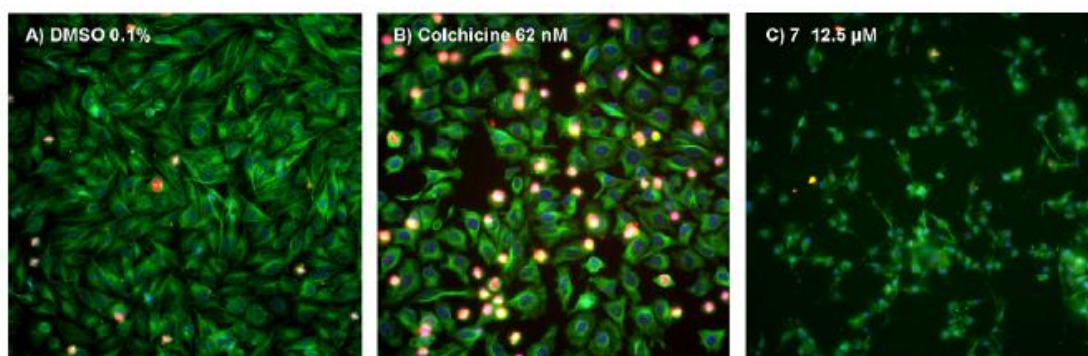


Figure 9. Immunofluorescence staining for markers of mitotic arrest in HeLa cells. HeLa cells were treated with (a) vehicle (DMSO 0.1%), (b) colchicine (62 nM) or (c) **7** (12.5 μ M), followed by simultaneous immunostaining of α -tubulin (green), phosphohistone H3 (red), and Hoechst 33342 (blue). Vehicle-treated cells have highly organized microtubules and a low percentage of mitotic cells. Colchicine and **7** caused a heterogeneous response of tubulin disorganization, chromatin condensation, and nuclear fragmentation. Typical apoptotic morphology is observed for **7**. Images are representative fields from a single experiment repeated three times with similar results. Magnification: 200 \times .

Table 7
Results of high-content analysis of mitotic arrest in HeLa cells^a

Compound	EC ₅₀ (μM) cell density	MDEC (μM) ^b		
		Nuclear condensation	Tubulin intensity	Mitotic index ^c
Colchicine	0.03	0.01	0.01	0.02
7	9.2 ± 0.8	5.8 ± 2.0	3.6 ± 0.1	> 50

^a Average ± SD of four independent experiments, performed in quadruplicate.

^b Minimum detectable effective concentration.

^c Percentage of phosphohistone H3-positive cells.

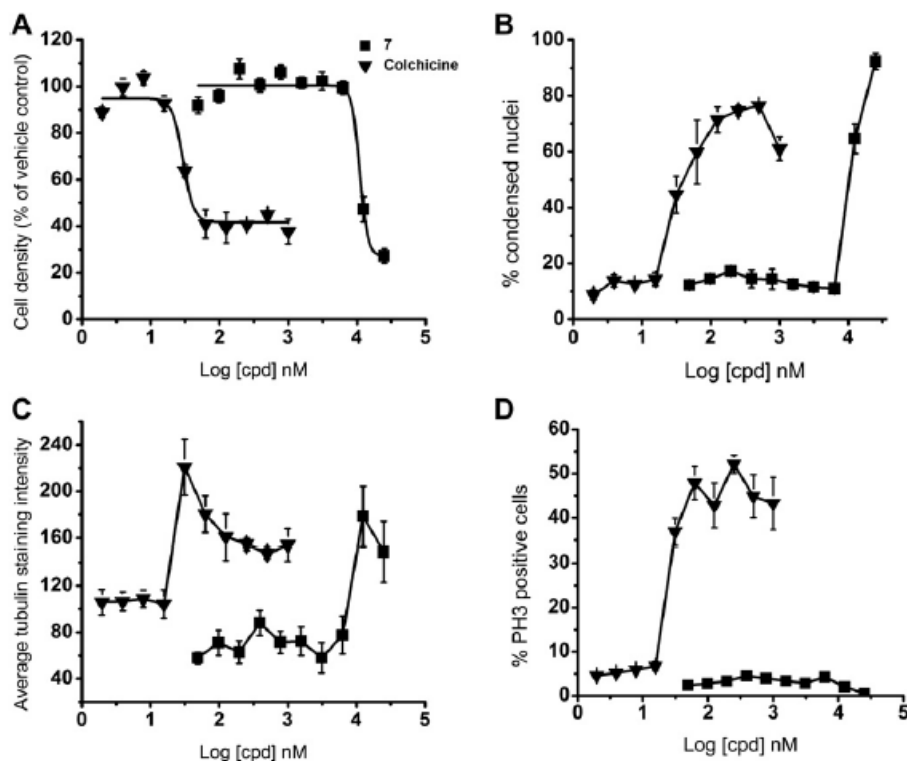


Figure 10. High-content analysis of mitotic arrest profiles in cells treated with the compounds being investigated. Cells were treated in 384-well plates with 10 twofold dilutions of either colchicine and 7 and analyzed by high-content analysis for (A) cell density, (B) chromatin condensation, (C) microtubule density and (D) mitotic index. All agents caused cell loss, enhanced nuclear condensation and induced cellular microtubule perturbations. Colchicine increased mitotic index, but this effect was not observed for 7.

the minimum detectable effective concentration (MDEC) as an alternative measurement of 7 and colchicine activities.³⁷

Cells treated with colchicine and 7 showed chromatin condensation and microtubule alterations (Fig. 10B, C and Table 7). Colchicine also provoked a concentration-dependent increase in the percentage of cells with elevated phosphohistone H3 levels, whereas 7 did not (Fig. 10D and Table 7). Therefore, despite its ability to partially inhibit tubulin assembly at high concentrations and to provoke cellular microtubule disorganization, 7 does not appear to cause mitotic arrest. As a consequence, direct interaction with tubulin is probably not responsible for the cytotoxic and pro-apoptotic effects of this compound.

3. Conclusion

Compound 1 and its *N*⁴-*ortho*-*meta*- and -*para*-phenyl substituted derivatives presented cytotoxicity in nanomolar doses against malignant MCF-7 breast tumor cells and against U87 and

T98G glioma cells, with good therapeutic index, as shown by their reduced haemolytic activity. In general, among the *N*⁴-phenyl substituted derivatives, the *ortho* derivatives proved to be more cytotoxic than their *meta*- and *para* congeners.

Our results suggest that the studied thiosemicarbazones were able to induce programmed cell death in tumor cells. The results described thus far suggest that these compounds induce both apoptosis and autophagy in the studied malignant tumor cells.

Despite their abilities to partially inhibit tubulin assembly at high concentrations and to provoke cellular microtubule disorganization, the thiosemicarbazones did not behave as mitotic arresters. As a consequence, direct interaction with tubulin is probably not primarily responsible for their cytotoxic and pro-apoptotic effects. The high cytotoxic activity of the studied compounds, together with their good therapeutic index, indicates that they are promising as antitumor drug candidates for the treatment of breast tumors and malignant gliomas.

4. Material and methods

4.1. Chemicals

2-Acetylpyridine, hydrazine dihydrate, *o*-fluorophenyl-, *m*-fluorophenyl-, *p*-fluorophenyl-, *o*-chlorophenyl-, *m*-chlorophenyl-, *p*-chlorophenyl-, *o*-iodophenyl-, *m*-iodophenyl-, *p*-iodophenyl-, *o*-nitrophenyl-, *m*-nitrophenyl- and *p*-nitrophenyl-isothiocyanate were purchased from Aldrich or Alfa Aesar and were used as received. **1** and its fluoro (**2–4**), chloro (**5–7**) and nitro (**11–13**) derivatives were prepared as previously described.²⁹

4.2. Physical measurements

Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using KBr plates (4000–400 cm⁻¹). NMR spectra were obtained at room temperature with a Bruker DRX-400 Avance (400 MHz) spectrometer using DMSO-*d*₆ as the solvent and tetramethylsilane (TMS) as internal reference. Melting Points were determined on a Mettler FP 90 equipment. Compound's purities were established by HPLC (HPLC Agilent Technologies 1200) with an UV detector at 314 nm, using Supelcosil C18 column (5 μm particle size, 25 cm × 4.6 mm) and eluting with methanol. HPLC data indicated purity >98% for all compounds except for compounds **6** and **7** (purities = 97 and 94%, respectively). High resolution MS measurements were performed on a Shimadzu LCMS-IT-TOF mass spectrometer.

4.3. Synthesis of 2-acetylpyridine *N*⁴-*ortho*-(**8**), *N*⁴-*meta*-(**9**) and *N*⁴-*para*-iodophenyl (**10**) thiosemicarbazones

Hydrazine dihydrate (39 mmol, 30% of excess) was added to 2-acetylpyridine (30 mmol) in methanol under stirring at room temperature. After 24 h, the product 2-acetylpyridine hydrazone was filtered off. The thiosemicarbazones were prepared by stirring 2-acetylpyridine hydrazone with *o*-, *m*- or *p*-iodophenyl isothiocyanate in 1:1 molar ratio under reflux in ethanol for 6 h. The solids were filtered off, washed with ethanol followed by diethyl ether, and dried in vacuo.

4.3.1. 2-Acetylpyridine *N*⁴-*ortho*-iodo-phenyl thiosemicarbazone (**8**)

White powder. Yield: 70%; Melting point: 173.0–173.9 °C; IR (KBr, cm⁻¹): 3306, 3208 (ν(NH)), 1582 (ν(C=N)), 782 (ν(C=S)), 621 (ν(py)); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm, *E* isomer (95%)) = 10.90 (s, 1H, N³-H), 10.14 (s, 1H, N⁴-H), 8.61 (d, *J* = 6.06 Hz, 1H, H6), 8.57 (d, 1H, *J* = 8.35 Hz, H3), 7.82 (t, 1H, *J* = 7.99 Hz, H4), 7.55–7.35 (m, 1H, H5), 2.49 (s, 3H, H15); δ (ppm, *Z* isomer (5%)) = 14.66 (s, 1H, N³-H), 10.21 (s, 1H, N⁴-H), 8.81 (d, *J* = 5.59 Hz, 1H, H6), 8.11 (t, *J* = 8.00 Hz, 1H, H4); ¹³C NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm, *E* isomer (95%)) 177.43 (C8), 154.42 (C2), 148.39 (C6), 141.07 (C7), 136.33 (C4), 121.07 (C3), 148.87 (C9), 124.01 (C5), 12.44 (C15); HRMS *m/z* [M-H]⁻ calcd for C₁₄H₁₂N₄SI: 394.9833, found: 394.9837.

4.3.2. 2-Acetylpyridine *N*⁴-*meta*-iodo-phenyl thiosemicarbazone (**9**)

Yellow powder. Yield: 94%; Melting point: 175.9–177.9 °C; IR (KBr, cm⁻¹): 3264 (ν(NH)), 1595 (ν(C=N)), 786 (ν(C=S)), 616 (ν(py)); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm, *E* isomer (87%)) = 10.83 (s, 1H, N³-H), 10.22 (s, 1H, N⁴-H), 8.62 (d, *J* = 4.68 Hz, 1H, H6), 8.55 (d, 1H, *J* = 8.04 Hz, H3), 7.84 (t, 1H, *J* = 7.64 Hz, H4), 7.42 (t, 1H, *J* = 5.32 Hz, H5), 2.49 (s, 3H, H15); δ (ppm, *Z* isomer (13%)) = 14.69 (s, 1H, N³-H), 10.37 (s, 1H, N⁴-H), 8.80 (d, *J* = 4.24 Hz, 1H, H6); ¹³C NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ

(ppm, *E* isomer (87%)) 177.01 (C8), 154.32 (C2), 148.39 (C6), 140.43 (C7), 136.28 (C4), 121.21 (C3), 149.54 (C9), 124.08 (C5), 12.55 (C15); HRMS *m/z* [M-H]⁻ calcd for C₁₄H₁₂N₄SI: 394.9833, found: 394.9835.

4.3.3. 2-Acetylpyridine *N*⁴-*para*-iodo-phenyl thiosemicarbazone (**10**)

Light yellow powder. Yield: 89%; Melting point: 205.0–206.1 °C; IR (KBr, cm⁻¹): 3294, 3232 (ν(NH)), 1581 (ν(C=N)), 783 (ν(C=S)), 621 (ν(py)); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm, *E* isomer (94%)) = 10.79 (s, 1H, N³-H), 10.19 (s, 1H, N⁴-H), 8.60 (d, *J* = 4.39 Hz, 1H, H6), 8.52 (d, 1H, *J* = 8.04 Hz, H3), 7.82 (t, 1H, *J* = 7.83 Hz, H4), 7.50–7.53 (m, 1H, H5), 2.47 (s, 3H, H15); δ (ppm, *Z* isomer (6%)) = 14.66 (s, 1H, N³-H), 10.33 (s, 1H, N⁴-H), 8.79 (d, *J* = 4.12 Hz, 1H, H6), 8.10 (t, *J* = 7.79 Hz, 1H, H4); ¹³C NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ (*E* isomer (94%)) 176.98 (C8), 154.34 (C2), 148.41 (C6), 149.51 (C7), 136.70 (C4), 121.19 (C3), 138.93 (C9), 124.07 (C5), 12.54 (C15); HRMS *m/z* [M-H]⁻ calcd for C₁₄H₁₂N₄SI: 394.9833, found: 394.9837.

4.4. Crystal structures determination

The crystal structures of **2–4**, **8**, **10** and **11** were determined by using single-crystal X-ray diffractometry. The measurements were carried out on an Oxford-Diffraction GEMINI-Ultra diffractometer using graphite-Enhance Source Mo K_α radiation (λ = 0.71073 Å) at 293(2) K. The data collection, cell refinements, and data reduction were performed using the CRYCALISPRO software.³⁹ Semi-empirical from equivalents absorption correction method was applied.³⁹

The structures were solved by direct methods using SHELXS-97.⁴⁰ Full-matrix least-squares refinement procedure on *F*² with anisotropic thermal parameters was carried on using SHELXL-97.⁴⁰ Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for all non-hydrogen atoms. Hydrogen atoms were placed geometrically and the positional parameters were refined using a riding model. Hydrogen atoms were placed geometrically and the positional parameters were refined using a riding model.

Molecular graphics and packing figures were plotted using ORTEP⁴¹ and PLATON,⁴² respectively.

4.5. Cell lines and culture conditions

Malignant human tumor cell lines MCF-7, U87 and T98G were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, USA) and maintained in Dulbeccos Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco), supplemented with 10% foetal bovine serum (Cultilab) and antibiotics (50 U mL⁻¹ penicillin/50 μM streptomycin), in a humidified atmosphere air/CO₂ (5%/95%) at 37 °C. For all experiments, cells were seeded in 96-well plates, at a density of 1–2 × 10³ cells/well.

4.6. Cytotoxic activity

Cytotoxicity was evaluated by the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay which measures the cellular metabolic viability.⁴³ The cells were cultured in 96-well plates and, 12 h after incubation, they were treated with different concentrations of test compounds (1 × 10⁻¹² M⁻¹ × 10⁻⁵ M). Another group of cells was treated with the same concentrations of etoposide (positive control), an antineoplastic agent that inhibits the enzyme topoisomerase II. Compounds were previously dissolved in DMSO and the final concentrations were adjusted, through an 8-fold serial dilution, in DMEM in such manner that the final DMSO concentration was lower than 0.5%.

After 48 h-treatment the cells were incubated with MTT (0.5 mg mL⁻¹), and formazan crystals were solubilised in DMSO.

Absorbance was measured in a microplate reader at 570 nm. Tests using DMSO (0.5% in DMEM) as negative control were carried out in parallel. IC₅₀ values were calculated as the concentration of compound that induced 50% of cytotoxicity. Data were presented as average ± standard deviation. All experiments were carried out in quadruplicates and repeated in at least three independent experiments with full agreement between the results. The statistical significance was assessed using Student's *t*-test (*p* < 0.05).

4.7. SAR studies

Conformational analysis of thiosemicarbazones was performed using the Merck Molecular Force Field (MMFF)⁴⁴ implemented in the Tinker Molecular Modeling Program.⁴⁵ For all compounds the *E* and *Z* isomers were analyzed. The minimum energy structures of the isomers obtained in the conformational analysis step were further optimized at the Density Functional Theory⁴⁶ level, employing the hybrid B3LYP^{47,48} exchange-correlation functional and using the cc-pVDZ⁴⁹ all electron basis set^{50,51} for all atoms. In order to have better properties and energetic results, single point energy calculations at the second order Møller-Plesset perturbation theory level^{52,53} were then performed on the optimized B3LYP/cc-pVDZ structures, using the same basis set (MP2/cc-pVDZ//B3LYP/cc-pVDZ). The inner shell electrons of iodine were treated by the effective core potential LANL2DZ⁵⁴ and its associated double- ζ basis set was used for the valence electrons (5s,5p). The charge distribution on the most stable conformers was computed using the Natural Bonding Orbital (NBO) formalism.^{55,56} All quantum mechanical calculations were performed using the Gaussian program.⁵⁷ HOMO and LUMO energies, dipole, NBO charges of sulfur and nitrogen from pyridine (N_{pyr}) and azomethine group (N_{azm}) were obtained after full optimization and were used as descriptors for further SAR studies. Superficial molecular area and logP were also used as descriptors for SAR studies. The three-dimensional structures obtained from optimization of thiosemicarbazones were used as input in the Marvin software⁵⁸ to calculate the superficial molecular area. Calculations of logP for the thiosemicarbazones were performed using ALOGPS 2.1 software, accessed via the Virtual Computational Chemistry Laboratory interface.⁵⁹

4.8. Morphological analysis of tumor cells

Cells were plated in 96-well plates and treated with test compounds 1–13 (1 μ M). Morphological changes were analyzed 48 h after the treatment by contrast-phase microscopy (Nikon).

DNA alterations were detected by DAPI staining. After 48 h-treatment with 1 μ M of test compounds, cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and fixed with 70% methanol at room temperature for 30 min. Cells were incubated with 0.4 μ g mL⁻¹ DAPI (Sigma) for 1 h in the dark after washing with PBS. DNA alterations such as condensation and fragmentation were observed by fluorescence microscopy (Nikon – 385–410 nm).

4.9. Acridine orange-ethidium bromide (AO/EB) doubling staining assay

Acridine orange, a cationic dye, has been the subject of extensive studies in recent years because of its metachromatic staining properties and can be used in conjunction with ethidium bromide to differentiate among alive, apoptotic, necrotic and autophagic cells.⁶⁰

Acridine orange/ethidium bromide doubling staining was performed according to Baskic et al.³⁴ with modifications. MCF-7, U87 and T98G cells were seeded in 96-well plates and treated with test compounds 1–13 (1 μ M) for 48 h. After treatment, cells were

incubated with serum-free medium, containing 1 μ g mL⁻¹ acridine orange (Sigma) and 1 μ g mL⁻¹ ethidium bromide (Sigma), for 15 min. The medium was removed and fluorescent micrographs were obtained using an inverted fluorescence microscope (Nikon – 530–650 nm). Viable cells presented uniform bright green nuclei; early apoptotic cells (which still have intact membranes and did not stain with ethidium bromide) have green nuclei, but chromatin condensation is visible as bright green fragments; late apoptotic cells have orange to red nuclei with condensed or fragmented chromatin and necrotic cells have uniformly orange to red nuclei.

4.10. Direct haemolysis assay

The haemolytic activity of thiosemicarbazones was evaluated according to Fisher et al.⁶¹ Human blood, collected in tubes containing EDTA, was centrifuged at 700xg for 10 min. The pellet was washed three times with cold PBS pH 7.4 by centrifugation, and re-suspended in the same buffer. Thiosemicarbazones' solutions of different concentrations were added to the erythrocytes and were incubated for 1 h at 37 °C in a shaker water bath. The release of haemoglobin was determined after centrifugation by photometric analyses at 540 nm. Complete haemolysis was achieved using 5% Triton X-100 yielding the 100% control value.

4.11. Inhibition of tubulin assembly

Since all studied thiosemicarbazones induced cellular phenotypic changes characteristics of apoptosis in a similar way, the inhibition of tubulin assembly and microtubule stabilization assays were only performed for H2Ac4pClPh (7), one of the most cytotoxic compounds.

Electrophoretically homogeneous bovine brain tubulin (final concentration 10 μ M; 1 mg mL⁻¹) was pre-incubated with test agents (colchicine and compound 7) dissolved in DMSO (1% v/v final concentration) and monosodium glutamate (0.8 M final concentration) at 30 °C in 96-well plates. The reaction mixtures were cooled to 0 °C for 10 min and GTP (0.4 mM final concentration) was added. The absorbance at 350 nm was immediately followed in a spectrophotometer. Baselines were established and temperature was quickly raised to 37 °C. The turbidity value after 20 min at 30 °C for DMSO 1% was assigned as 100% assembly, and for colchicine 2.5 μ M as 0% assembly. To observe concentration-dependent effects of the tested compounds, four twofold dilutions of them were evaluated.

4.12. Automated high-content cellular analyses

The effects of colchicine and 7 on mitotic arrest, nuclear morphology and cellular microtubules were studied as previously described.^{37,38} HeLa human cervical carcinoma cells (8000/well) were plated in collagen-coated 384-well microplates and treated in quadruplicate with vehicle (DMSO 0.1% final concentration) or 10 twofold dilutions of test compounds within 4–6 h of seeding. Cells were incubated for 18 h at 37 °C and CO₂ 5%, fixed with formaldehyde, and labeled with 10 μ g mL⁻¹ Hoechst 33342 in Hank's balanced salt solution (HBSS). Cells were permeabilized with 0.5% (w/w) Triton-X100 for 5 min at room temperature and incubated with a primary antibody cocktail consisting of an HBSS solution containing rabbit polyclonal antiphosphohistone H3 (Ser10, 1:500, Upstate, Charlottesville, VA, USA), and mouse monoclonal anti- α -tubulin (1:3000, Sigma, St. Louis, MO, USA), followed by a mixture of FITC-labeled donkey anti-mouse IgG (1:500) and Cy3-labeled donkey anti-rabbit IgG (1:500) as secondary cocktail. Cells were rinsed once with HBSS and stored at 4 °C in HBSS until analysis. Microplates were analyzed with an ArrayScanII instrument (Cello-mics, Pittsburgh, PA, USA) using the Target Activation Bioapplication

(Cellomics, Inc.). Within the application, 1000 individual cells in each well were imaged at three different wavelengths using an Omega XF93 filter set (Omega Optical, Inc., Brattleboro, VT, USA) at excitation/emission wavelengths of 350/461 nm (Hoechst), 494/519 nm (FITC), and 556/573 nm (Cy3). The following parameters were used for data analysis: average nuclear intensity, nuclei per field, average nuclear FITC intensity, and average nuclear Cy3 intensity. A nuclear mask was generated from Hoechst 33342-stained nuclei. Microtubule density and histone H3 phosphorylation were measured in the FITC and Cy3 channel, respectively. Microtubule density was defined as the average green (FITC) pixel intensity in an area defined by the nuclear mask. For determination of mitotic index and nuclear condensation, thresholds for Hoechst 33342 and phosphohistone-H3 intensities were defined as the average Hoechst 33342 or Cy3 intensity plus 1 SD from 28 vehicle-treated wells placed in the center of the microplate. Cells were classified as positive if their average Hoechst 33342 or Cy3 intensity exceeded this threshold. To visually illustrate the effects of test agents on cellular microtubules and mitotic arrest, the identical 384-well plates were then used to acquire higher resolution images of selected wells.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CNEN (Comissão Nacional de Energia Nuclear), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), INCT-INOVAR (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos, Proc. CNPq 573.364/2008-6), INCT-MM (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Medicina Molecular, Proc. FAPEMIG: CBB-APQ-00075-09/CNPq 573.646/2008-2), INCT-Catálise (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Catálise em Sistemas Moleculares e Nanoestruturados) and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). The authors express sincere thanks to LabCRI (UFMG), particularly to Professor Nilvado L. Speziali for the X-ray facilities and measurements.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.027>.

References and notes

1. "WHO—World Health Organization", <http://www.who.int/cancer> (Accessed June 2011).
2. Coughlin, S. S.; Ekwueme, D. U. *Cancer Epidemiol.* **2009**, *33*, 315.
3. Wardley, A. *Breast* **2008**, *17*, 285.
4. Louis, D. N.; Pomeroy, S. L.; Cairncross, J. G. *Cancer Cell* **2002**, *1*, 125.
5. Louis, D. N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O. D.; Cavenee, W. K.; Burger, P. C.; Jouvett, A.; Scheithauer, B. W.; Kleihues, P. *Acta Neuropathol* **2007**, *114*, 97.
6. Stupp, R.; Mason, W. P.; van den Bent, M. J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M. J.; Belanger, K.; Brandes, A. A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; Curschmann, J.; Janzer, R. C.; Ludwin, S. K.; Gorlia, T.; Allgeier, A.; Lacombe, D.; Cairncross, J. G.; Eisenhauer, E.; Mirimanoff, R. O. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 987.
7. van den Bent, M.; Chinot, O.; Cairncross, J. G. *Neuro-Oncol.* **2003**, *128*.
8. Parsons, D. W.; Jones, S.; Zhang, X.; Lin, J. C.; Leary, R. J.; Angenendt, P.; Mankoo, P.; Carter, H.; Siu, I.; Gallia, G. L.; Olivi, A.; McDendon, R.; Rasheed, B. A.; Keir, S.; Nikolskaya, T.; Nikolsky, Y.; Busam, D. A.; Tekleab, H.; Diaz, L. A., Jr.; Hartigan, J.; Smith, D. R.; Strausberg, R. L.; Marie, S. K. N.; Shinjo, S. M. O.; Yan, H.; Riggins, G. J.; Bigner, D. D.; Karchin, R.; Papadopoulos, N.; Parmigiani, G.; Vogelstein, B.; Velculescu, V. E.; Kinzler, K. W. *Science* **2007**, *311*, 321.
9. Colli, B. O.; Carlotti, C. G., Jr. *J. Bras. Neurocir.* **2001**, *12*, 36.
10. Beraldo, H.; Gambino, D. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 31.
11. Finch, R. A.; Liu, M.; Grill, S. P.; Rose, W. C.; Loomis, R.; Vasquez, K. M.; Cheng, Y.; Sartorelli, A. C. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 983.
12. Finch, R. A.; Liu, M.; Cory, A. H.; Cory, J. G.; Sartorelli, A. C. *Advan. Enzyme Regul.* **1999**, *39*, 3.
13. Gojo, I.; Tidwell, M. L.; Greer, J.; Takebe, N.; Seiter, K.; Pochron, M. F.; Johnson, B.; Szol, M.; Karp, J. E. *Leuk. Res.* **2007**, *31*, 1165.
14. Shao, J.; Zhou, B.; Chu, B.; Yen, Y. *Cancer Drug Targets* **2006**, *6*, 409.
15. Quiroga, A. G.; Pérez, J. M.; Montero, E. I.; Masaguer, J. R.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *J. Inorg. Biochem.* **1998**, *70*, 117.
16. Quiroga, A. G.; Navarro-Ranninger, C. *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 119.
17. Bal, T.; Atasever, B.; Solakoğlu, Z.; Erdem-Kuruca, S.; Ölküseven, B. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 161.
18. Ferrari, M. B.; Bisceglie, F.; Pelosi, G.; Tarasconi, P.; Albertini, R.; Bonati, A.; Lunghi, P.; Pinelli, S. *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *83*, 169.
19. Li, M. X.; Chen, C. L.; Ling, C. S.; Zhou, J.; Ji, B. S.; Wu, Y. J.; Niu, J. Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2704.
20. Ferraz, K. S. O.; Fernandes, L.; Carrilho, D.; Pinto, M. C. X.; Leite, M. F.; Souza-Fagundes, E. M.; Speziali, N. L.; Mendes, I. C.; Beraldo, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7138.
21. Rebollo, A. P.; Veites, M.; Gambino, D.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.; Zani, C. L.; Souza-Fagundes, E. M.; Teixeira, L. R.; Batista, A. A.; Beraldo, H. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 698.
22. Lessa, J. A.; Guerra, J. C.; Miranda, L. F.; Romeiro, C. F. D.; Da Silva, J. G.; Mendes, I. M.; Speziali, N. L.; Souza-Fagundes, E. M.; Beraldo, H. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 1729.
23. Rebollo, A. P.; Ayala, J. D.; Lima, G. M.; Marchini, N.; Bombieri, G.; Zani, C. L.; Souza-Fagundes, E. M.; Beraldo, H. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 467.
24. Reis, D. C.; Pinto, M. C. X.; Souza-Fagundes, E. M.; Wardell, S. M. S. V.; Wardell, J. L.; Beraldo, H. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3904.
25. Lessa, J. A.; Mendes, I. C.; da Silva, P. R. O.; Soares, M. A.; dos Santos, R. G.; Speziali, N. L.; Romeiro, N. C.; Barreiro, E. J.; Beraldo, H. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5671.
26. Kondo, Y.; Kondo, S. *Autophagy* **2006**, *2*, 85.
27. Akar, U.; Chaves-Reyes, A.; Barria, M.; Tari, A.; Sanguino, A.; Kondo, Y.; Kondo, S.; Arun, B.; Lopez-Berestein, G.; Ozpolat, B. *Autophagy* **2008**, *4*, 669.
28. Høyer-Hansen, M.; Jäättelä, M. *Autophagy* **2008**, *4*, 574.
29. Klayman, D. L.; Bartosevich, J. F.; Griffin, T. S.; Mason, C. J.; Scovill, J. P. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 855.
30. Bermejo, E.; Castiñeiras, A.; Dominguez, R.; Carballo, R.; Maichle-Moessmer, C.; Straehle, J.; West, D. X. *Anorg. Allg. Chem.* **1999**, *625*, 961.
31. Ribble, D.; Goldstein, N. B.; Norris, D. A.; Shellman, Y. G. *BMC Biotechnol.* **2005**, *12*, 1.
32. Yang, C.; Kaushal, V.; Shah, S. V.; Kaushal, P. G. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2008**, *294*, 777.
33. Klionsky, D. J.; Abeliovich, H.; Agostinis, P.; Agrawal, D. K.; Aliev, G.; Askew, D. S.; Baba, M.; Baehrecke, E. H.; Bahr, B. A.; Ballabio, A.; Bamber, B. A.; Baslam, D. C.; Bergamini, E.; Bi, X.; Biard-Piechaczyk, M.; Blum, J. S.; Bredesen, D. E.; Brodsky, J. L.; Brummell, J. H.; Brunk, U. T.; Bursch, W.; Camougraud, N.; Cecollero, E.; Cecconi, F.; Chen, Y.; Chin, L. S.; Choi, A.; Chu, C. T.; Chung, J.; Clarke, P. G.; Clark, R. S.; Clarke, S. G.; Clavé, C.; Cleveland, J. L.; Codogno, P.; Colombo, M. I. L.; Coto-Montes, A.; Cregg, J. M.; Cuervo, A. M.; Debnath, J.; Demarchi, F.; Dennis, P. B.; Dennis, P. A.; Deretic, V.; Devenish, R. J.; Di Sano, F.; Dice, J. F.; Difiglia, M.; Dinesh-Kumar, S.; Distelhorst, C. W.; Djavaheri-Mergny, M.; Dorsey, F. C.; Dröge, W.; Dron, M.; Dunn, W. A., Jr.; Duszenko, M.; Eissa, N. T.; Elazar, Z.; Eskelinen, A.; Eskelinen, E. L.; Fésüs, L.; Finley, K. D.; Fuentes, J. M.; Fuyo, J.; Fujisaki, K.; Galliot, B.; Gao, F. B.; Gewirtz, D. A.; Gibson, S. B.; Gohla, A.; Goldberg, A. L.; Gonzalez, R.; González-Estévez, C.; Gorski, S.; Gottlieb, R. A.; Häussinger, D.; He, Y. W.; Heidenreich, K.; Hill, J. A.; Høyer-Hansen, M.; Hu, X.; Huang, W. P.; Iwasaki, A.; Jäättelä, M.; Jackson, W. T.; Jiang, X.; Jin, S.; Johansen, T.; Jung, J. U.; Kadowaki, M.; Kang, C.; Kelekar, A.; Kessel, D. H.; Kiel, J. A.; Kim, H. P.; Kimchi, A.; Kinsella, T. J.; Kiselyov, K.; Kitamoto, K.; Knecht, E.; Komatsu, M.; Kominami, E.; Kondo, S.; Kovács, A. L.; Kroemer, G.; Kuan, C. Y.; Kumar, R.; Kundu, M.; Landry, J.; Laporte, M.; Le, W.; Lei, H. Y.; Lenardo, M. J.; Levine, B.; Lieberman, A.; Lim, K. L.; Lin, F. C.; Liou, W.; Liu, L. F.; Lopez-Berestein, G.; López-Otin, C.; Lu, B.; Macleod, K. F.; Malorni, W.; Martinet, W.; Matsuoka, K.; Mautner, J.; Meijer, A. J.; Meléndez, A.; Michels, P.; Miotto, G.; Mistiaen, W. P.; Mizushima, N.; Mograbi, B.; Monastyrska, I.; Moore, M. N.; Moreira, P. L.; Moriyasu, Y.; Motyl, T.; Münz, C.; Murphy, L. O.; Naqvi, N. I.; Neufeld, T. P.; Nishino, I.; Nixon, R. A.; Noda, T.; Nürnberg, B.; Ogawa, M.; Oleinick, N. L.; Olsen, L. J.; Ozpolat, B.; Paglin, S.; Palmer, G. E.; Papassideri, I.; Parkes, M.; Perlmutter, D. H.; Perry, G.; Piacentini, M.; Pinks-Kramarski, R.; Prescott, M.; Proikas-Cezanne, T.; Raben, N.; Rami, A.; Reggiori, F.; Rohrer, B.; Rubinsztein, D. C.; Ryan, K. M.; Sadoshima, J.; Sakagami, H.; Sakai, Y.; Sandri, M.; Sasakawa, C.; Sass, M.; Schneider, C.; Seglen, P. O.; Selevostov, O.; Settleman, J.; Shacka, J. J.; Shapiro, I. M.; Sibirny, A.; Silva-Zacarin, E. C.; Simon, H. U.; Simone, C.; Simonsen, A.; Smith, M. A.; Spaniel-Borowski, K.; Srinivas, V.; Steeves, M.; Stenmark, H.; Stromhaug, P. E.; Subauste, C. S.; Sugimoto, S.; Sulzer, D.; Suzuki, T.; Swanson, M. S.; Tabas, I.; Takeshita, F.; Talbot, N. J.; Tallóczy, Z.; Tanaka, K.; Tanaka, K.; Tanida, I.; Taylor, G. S.; Taylor, J. P.; Terman, A.; Tettamanti, G.; Thompson, C. B.; Thumm, M.; Tolkovsky, A. M.; Tozzo, S. A.; Truant, R.; Tumanovska, L. V.; Uchiyama, Y.; Ueno, T.; Uzcátegui, N. L.; Van der Klei, I.; Vaquero, E. C.; Vellai, T.; Vogel, M. W.; Wang, H. G.; Webster, P.; Wiley, J. W.; Xi, Z.; Xiao, G.; Yahalom, J.; Yang, J. M.; Yap, G.; Yin, X. M.; Yoshimori, T.; Yu, L.; Yue, Z.; Yuzaki, M.; Zabirnyk, O.; Zheng, X.; Zhu, X.; Deter, R. L. *Autophagy* **2008**, *4*, 151.
34. Baskić, D.; Popović, S.; Ristic, P.; Nebojsa, N.; Arsenijević, N. *Cell. Biol. Internat.* **2006**, *30*, 924.
35. Lee, S. B.; Tong, S. Y.; Kim, J. J.; Um, S. J.; Park, J. S. *DNA Cell Biol.* **2007**, *26*, 713.
36. Jordan, M. A. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2002**, *2*, 1.
37. Wang, Z.; McPherson, P. A.; Raccor, B. S.; Balachandran, R.; Zhu, G.; Day, B. W.; Vogt, A.; Wipf, P. *Chem. Biol. Drug Des.* **2007**, *70*, 75.
38. Vogt, A.; McPherson, P. A.; Shen, X.; Balachandran, R.; Zhu, G.; Raccor, B. S.; Nelson, S. G.; Tsang, M.; Day, B. W. *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*, 358.

39. CRYSLISPRO, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.34.34 (release 05-01-2010 CrysAlis171.NET).
40. Sheldrick, G. M. SHELXL-97: Program for Crystal Structures Analysis, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 1997.
41. Farrugia, L. J. *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 565.
42. Spek, A. L. *Acta Cryst.* **2009**, *D65*, 148.
43. Plumb, J. A.; Miloroy, R.; Kaye, S. B. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4435.
44. Dewar, M. J. S.; Zebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902.
45. TINKER Software Tools for Molecular Design, 5.0. Jay W. Ponder Lab, Dept. of Biochemistry & Molecular Biophysics, Washington University School of Medicine: St. Louis, **2009**.
46. Parr, R. G.; Yang, W. *Density-Functional Theory of Atoms and Molecule*; Oxford University Press: Oxford, 1989.
47. Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
48. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev.* **1988**, *37*, 785.
49. Dunning, T. H., Jr. *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 1007.
50. Ditchfield, R.; Hehre, W. J.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1971**, *54*, 724.
51. Hehre, W. J.; Ditchfield, R.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1972**, *56*, 2257.
52. Møller, C.; Plesset, M. S. *Phys. Rev.* **1934**, *46*, 618.
53. Szabo, A.; Ostlund, N. S. *Modern Quantum Chemistry, Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*; Dover Publication, Inc: New York, 1996.
54. Hay, P. J.; Wadt, W. R. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 284.
55. Reed, A. E.; Weinhold, F. *J. Chem. Phys.* **1983**, *78*, 4066.
56. Reed, A. E.; Weinstock, R. B.; Weinhold, F. *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 735.
57. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A.; Gaussian 03, Revision C.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.
58. MarvinSketch 5.5.1.0 Program. ChemAxon, <http://www.chemaxon.com/products.html>.
59. ALOGPS 2.1 Program. Available: <http://www.vclab.org/lab/alogps> (Accessed April 2011).
60. Beers, R. F. *J. Bacteriol.* **1964**, *88*, 1249.
61. Fisher, D.; Li, Y.; Ahlemeyer, B.; Krieglstein, J.; Kissel, T. *Biomaterials* **2003**, *24*, 1121.