

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL *IN VITRO* E DA ATIVIDADE
IMUNOMODULADORA DO COMPOSTO MESOIÔNICO
5-(4-CLOROFENIL)-3-METIL-4-FENIL-1,3-TIAZÓLIO-2-TIOLATO (MI-2)

BÁRBARA FERNANDA PESSOA DE ANDRADE

BÁRBARA FERNANDA PESSOA DE ANDRADE

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL *IN VITRO* E DA ATIVIDADE
IMUNOMODULADORA DO COMPOSTO MESOIÔNICO
5-(4-CLOROFENIL)-3-METIL-4-FENIL-1,3-TIAZÓLIO-2-TIOLATO (MI-2)

Monografia apresentada ao
Curso de Licenciatura Plena em
Ciências Biológicas/UFRPE,
como requisito parcial para
obtenção do grau de Licenciada
em Ciências Biológicas.
Orientadora: Profa. Dra.
Elayne Cristine Soares da Silva.
Coorientadora: Profa. Dra. Jeyce
Kelle Ferreira de Andrade.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A565a Andrade, Bárbara Fernanda Pessoa
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL IN VITRO E DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO
COMPOSTO MESOIÔNICO 5-(4-CLOROFENIL)-3-METIL-4-FENIL-1,3-TIAZÓLIO-2-TIOLATO (MI-2) /
Bárbara Fernanda Pessoa Andrade. - 2020.
42 f. : il.
- Orientadora: Elayne Cristine Soares da Silva.
Coorientador: Jeyce Kelle Ferreira de Andrade.
Inclui referências e anexo(s).
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Licenciatura em Ciências Biológicas, Recife, 2020.
1. atividade antitumoral. 2. câncer. 3. compostos heterocíclicos. 4. imunossupressão. I. Silva, Elayne
Cristine Soares da, orient. II. Andrade, Jeyce Kelle Ferreira de, coorient. III. Título

BÁRBARA FERNANDA PESSOA DE ANDRADE

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL *IN VITRO* E DA ATIVIDADE
IMUNOMODULADORA DO COMPOSTO MESOIÔNICO
5-(4-CLOROFENIL)-3-METIL-4-FENIL-1,3-TIAZÓLIO-2-TIOLATO (MI-2)

Comissão avaliadora:

Prof^a. Dr^a. Elayne Cristine Soares da Silva
Orientadora

Dr^a. Luciana Amaral de Mascena Costa
Titular

Prof^a. Dr^a. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares
Titular

MSc. Ericka Fernanda Ferreira de Queiroz
Suplente

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me concedeu o dom da vida e que está ao meu lado todos os dias, sendo minha fortaleza e cuidando de mim.

Em segundo lugar agradeço a minha família, que sempre me apoia e incentiva a não parar nunca, mesmo quando a caminhada se torna exaustiva. Em especial meus pais, Imaculada e Antônio; meu irmão, Fernando; minhas avós, Dona Nina e Dona Menininha. Gratidão também aos meus tios e tias, primas e cunhada.

Sou extremamente grata às professoras Elayne Cristine e Jeyce Kelle por me ensinarem tanto; colocarem-me no mundo da pesquisa científica; serem inspiração diária pelo amor e dedicação ao trabalho; pelas oportunidades oferecidas e por todas as experiências compartilhadas. Além delas, agradeço aos demais professores da Rural, que marcaram minha formação e são também importantes fontes de inspiração para mim.

Por fim, agradeço aos meus amigos de faculdade, que estiveram ao meu lado em cada dificuldade do curso, principalmente Allane Cosmo, Ana Beatriz Aragão, Willian Lopes, Nara Rafaella, Inayse Andrade, Morgana Aquino e Jaqueline Moura. E ainda às minhas amigas de vida, Aline Lima, Débora Taline, Vitória Ayala, Ana Beatriz Fonseca e Natália Catarina.

DEDICATÓRIA

Dedico essa monografia a minha tia Edileuza Suely (*in memoriam*), que por alguns anos lutou contra o câncer com toda força e esperança possível; e a todas as pessoas que eu conheci na ala oncológica do hospital, em que estive com minha tia, tanto profissionais quanto pacientes e familiares. Dedico essa monografia como forma de esperança, para que um dia o câncer não faça mais parte da vida das pessoas e que o mundo não sofra mais desse mal, como hoje.

SUMÁRIO

1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
1.1	CÂNCER.....	13
1.2	MESOIÔNICOS.....	18
2	INTRODUÇÃO	21
3	OBJETIVOS	23
3.1	OBJETIVO GERAL.....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	OBTENÇÃO DO COMPOSTO.....	24
4.2	CÉLULAS... ..	24
4.3	ANIMAIS... ..	24
4.4	CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS TUMORAIS.....	25
4.5	ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	26
4.6	ANÁLISE DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA (DNA LADDER).....	26
4.7	CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMC).....	27
4.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	28
5	RESULTADOS	28
5.1	ANÁLISE CITOTÓXICA DO COMPOSTO.....	28
5.2	ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	29
5.3	ANÁLISE DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA (DNA LADDER).....	30
5.4	ANÁLISE DO EFEITO CITOTÓXICO DO MI-2 EM CÉLULAS MONONUCLEADAS (PBMC).....	31
6	DISCUSSÃO	32
7	CONCLUSÃO	34
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
9	ANEXOS	42

LISTA DE ABREVIATURAS

Ácido Desoxirribonucleico (DNA)

Ácido Etilenodiamino Tetra-acético(EDTA)

Adenocarcinoma colorretal (HT29) Adenocarcinoma retal (SW707)

B-cell lymphoma protein 2 (BCL-2)

Câncer de bexiga (HCV29T)

Câncer de mama (T47D)

Carcinoma de pulmão de células não pequenas (A549)

Ciclina E1 (CCNE1)

Ciclo de divisão celular (CDC6)

Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio (MTT)

Câncer de mama (MCF-7)

Carcinoma mucoepidermóide de pulmão (NCI-H292)

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Cinases dependentes de ciclina (CDK)

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Concentração inibitória 50% (IC50)

Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA)

Dimetilsulfóxido PA (DMSO)

Dióxido de Carbono (CO₂)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Fosfato-salino (PBS)

Gene Rat Sarcoma Vírus (RAS)

LISTA DE ABREVIATURAS

Gene do Myelocytomatosis Virus (MYC)

Instituto Nacional de Câncer (INCA)

Leucemia promielocítica (HL-60)

Macrófagos associados ao tumor (TAM)

Matriz Extracelular (MEC)

Murine double minutes (MDM2)

M-phase inducer phosphatase (CDC25)

National Cancer Institute (NCI)

Organização Mundial de Saúde (OMS)

Pares de bases (bp)

Potencial Hidrogeniônico (pH)

Proteína de peso 53kDA (p53)

Proteína de peso 16kDA (p16)

Proteína de peso 21kDA (p21)

Proteína Retinoblastoma (pRB)

Roswell Park Memorial Institute (RPMI)

Solução Tampão Fosfato (PBS)

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

4-fenil-5-(4-nitrocinaoíl)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D)

5-(4-clorofenil)-3-metil-4-fenil-1,3-tiazólio-2-tiolato (MI-2)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Análise do percentual (%) de inibição de crescimento das células tumorais realizado pelo teste do MTT em dose única de 25µg/mL após 72h de exposição ao fármaco... ..	28
TABELA 2	Análise da concentração inibitória 50% (IC50) e intervalo de confiança de 95%, realizado a partir de diluições seriadas do composto no teste do MTT em 72h de exposição ao fármaco... ..	29

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Fórmula estrutural do composto mesoiônico 5-(4-clororfenil)-3-metil-4-fenil-1,3-tiazólio-2-tiolato (MI-2).24
- FIGURA 2 Análise morfológica realizada por coloração por coloração diferencial (panótico rápido). A - controle negativo, B - Doxorrubicina 0,5µg/mL, C e D - MI-2 2,0µg/mL. Objetiva 100x. As setas em preto contínuo mostram as células em processo de morte por apoptose (formação de corpos apoptóticos). As setas pretas tracejadas apresentam indícios de morte por apoptose (condensação da cromatina). As setas pretas com duplo tracejado apresentam indícios de morte por apoptose (fragmentação nuclear). As setas em vermelho apresentam indícios de morte por autofagia (formação de corpos autofágicos).30
- FIGURA 3 Análise da fragmentação do DNA das células de HL-60. Teste do DNA ladder induzido pelos compostos através do gel de agarose a 2% corados com Blue green loading dye I (LGC - Biotecnologia), visualizado em transluminador de ultravioleta, comparados com o marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen, USA) e fotodocumentados. M - Marcador de peso molecular, C - Controle negativo, D - Doxorrubicina (0,5µg/mL), MI-2 (2µg/mL)..... 31
- FIGURA 4 Percentual de células mononucleares (PBMC) viáveis dos ratos após 72h de exposição ao composto MI-2 em seis concentrações diferentes...31

RESUMO

O câncer é classificado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um grupo de doenças, que pode se desenvolver em qualquer parte do corpo, a partir do crescimento descontrolado de células geneticamente alteradas, que apresentam a capacidade de invadir tecidos adjacentes e instalar-se simultaneamente em mais de um órgão. É considerado pela OMS como a segunda maior causa de morte no mundo, matando cerca de 9,6 milhões de pessoas. Já no Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima-se que em 2020 serão registrados 309.750 novos casos de câncer para homens e cerca de 316.280 novos casos para as mulheres. Os pacientes oncológicos geralmente são tratados com quimioterapia, radioterapia, intervenção cirúrgica e em alguns casos, imunoterapia. Tendo em vista o alto custo e a notável toxicidade apresentada pela grande maioria dos tratamentos disponíveis atualmente, tais como perda de peso e cabelo, além da anemia, leucopenia, trombocitopenia e da imunossupressão que os tornam extremamente vulneráveis; a busca por novas possibilidades terapêuticas se faz necessária para aumentar as chances de cura e qualidade de vida. Os compostos mesoiônicos são um grupo de substâncias definidas como betaínas heterocíclicas, em sua maioria de origem sintética, biologicamente ativas e que têm sido amplamente estudadas por suas características químicas e diversas funções, entre as quais destaca-se o potencial antitumoral, que vem sendo objeto de inúmeras pesquisas. O composto usado no presente trabalho (MI-2) é um dos derivados dos mesoiônicos da classe dos tiadiazóis, denominado de 5-(4-clorofenil)-3-metil-4-fenil-1,3-tiazólio-2-tiolato. Objetivou-se com este trabalho, analisar o potencial antitumoral deste composto, avaliando a citotoxicidade em linhagens de células tumorais, características morfológicas dessas células, fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA); além da análise de citotoxicidade em células do sistema imune de ratos (*Rattus norvegicus*). Os resultados apresentados até o momento, demonstram respostas satisfatórias em testes de avaliação antitumoral, em especial para leucemias; e uma provável baixa toxicidade em linfócitos isolados de ratos. Este composto faz parte de um projeto de pesquisa que ainda está em andamento.

Palavras-chave: atividade antitumoral; câncer; compostos heterocíclicos; imunossupressão.

ABSTRACT

Cancer is classified by the World Health Organization (WHO) as a group of diseases, which can develop anywhere in the body, from the uncontrolled growth of genetically altered cells and which have the ability to invade adjacent tissues and can therefore, if installed simultaneously in more than one organ. It is considered by WHO as the second leading cause of death in the world, killing about 9.6 million people. In Brazil, according to the National Cancer Institute (INCA), it is estimated that in 2020 309,750 new cases of cancer will be registered for men and about 316,280 new cases for women. Cancer patients are usually treated with chemotherapy, radiation therapy, surgical intervention and in some cases, immunotherapy. In view of the high cost and the remarkable toxicity presented by the vast majority of treatments currently available, such as weight loss and hair, in addition to anemia, leukopenia, thrombocytopenia and immunosuppression that make them extremely vulnerable; the search for new therapeutic possibilities is necessary to increase the chances of cure and quality of life. Mesoionic compounds are a group of substances defined as heterocyclic betaines, mostly of synthetic origin, biologically active and which have been widely studied for their chemical characteristics and diverse functions, among which the antitumor potential, which has been the object of prominence, stands out of numerous surveys. The compound used in the present work (MI-2) is one of the derivatives of the thiazole class mesoionics called 5-(4-chlorophenyl)-3-methyl-4-phenyl-1,3-thiazolium-2-thiolate. The objective of this work was to analyze the antitumor potential of this compound, evaluating the cytotoxicity in tumor cell lines, morphological characteristics of these cells, DNA fragmentation; in addition to the analysis of cytotoxicity in cells of the immune system of rats (*Rattus norvegicus*). The results presented so far, demonstrate satisfactory responses in antitumor evaluation tests, especially for leukemias; and a probable low toxicity in isolated rat lymphocytes. This compound is part of an ongoing research project.

Keywords: antitumor activity; cancer; heterocyclic compound; immunosuppression

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Câncer

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo, sendo responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes, ou uma em cada seis mortes, em 2018. Câncer de pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado são os tipos mais comuns de câncer em homens, enquanto o de mama, os cânceres colorretal, pulmonar, cervical e de tireoide são os mais comuns entre as mulheres (OMS, 2020). O número de novos casos, bem como os de óbitos por câncer têm crescido, sendo um problema de saúde pública. Esse aumento nos números e estatísticas do câncer estão relacionados com o envelhecimento, hábitos de vida (exposição aos fatores de risco), aspectos socioeconômicos como acessibilidade a medidas preventivas, diagnósticas e terapêuticas.

Existem mais de 100 tipos diferentes de câncer e subtipos de tumores, que podem ser encontrados em órgãos específicos (HANAHAN et al. 2000). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), para o Brasil, a estimativa de cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil novos casos (450 mil excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil).

O câncer caracteriza-se pelo crescimento anômalo e desordenado de células, sem finalidade e sem controle do organismo através do qual se nutre; mantendo essa capacidade, mesmo cessado o estímulo que desencadeou seu aparecimento e pode surgir em qualquer órgão do corpo, sendo mais prevalente em alguns. Vários são os fatores envolvidos na transformação de uma célula normal em uma célula neoplásica, incluindo agentes químicos, físicos ou biológicos que podem alterar direta ou indiretamente, de forma irreversível o genoma celular. O processo de carcinogênese começa na fase de iniciação marcada pela ação dos agentes cancerígenos sobre o material genético, seguindo pela promoção em que as células iniciadas sofrem a ação dos agentes oncopromotores e por fim o estágio de progressão, no qual o câncer já está instalado no corpo e dando início aos sintomas clínicos (INCA, 2019). A proliferação celular é um componente necessário a

carcinogênese, pois sem ela os danos ao DNA não são expressos e replicados para todo o corpo (ALBERTS et al. 2004).

Baseando-se em informações do INCA (2018), o câncer não ocorre a partir de causa única, mas por um conjunto de fatores externos e internos, os quais podem interagir propiciando o surgimento da doença. Cerca de 90% dos casos de câncer são provocados por questões externas, capazes de alterar a estrutura do DNA, sendo chamadas de cancerígenas, tais como o excesso de radiação solar, fumo e alimentação inadequada. Já as causas internas estão relacionadas a hormônios, condições imunológicas e mutações genéticas. Mesmo com o fator genético na formação de tumores, através dos oncogenes, poucos casos se devem unicamente a hereditariedade, aspectos familiares e étnicos. Além disso, algumas pessoas apresentam maior predisposição ao desenvolvimento da patologia sendo dessa forma, mais vulneráveis que outras ainda que expostas ao mesmo produto carcinogênico.

De acordo com Souza et al. (2015), o ciclo celular é constantemente controlado em diversas etapas por moléculas, como as ciclinas, cinases dependentes de ciclinas, fatores de crescimento e proteínas reguladoras. Algumas enzimas atuam durante o ciclo celular revisando as sequências de nucleotídeos presentes no material genético da célula em divisão. A medida em que os erros são encontrados, tentam repará-los e quando não é possível corrigir, a célula é encaminhada para apoptose, a fim de prevenir que as defeituosas proliferem dando origem ao câncer. Dessa forma, alterações no funcionamento do ciclo celular podem propiciar o desenvolvimento de tumores malignos.

Erros no material genético são os principais responsáveis pela ativação de moléculas que atuam como supressores tumorais, tais quais a p53, p16, p21 e pRB. A proteína p53 é sintetizada quando há dano no DNA e atua como fator de transcrição induzindo a produção de outras proteínas como a p21 e p16, que por consequência bloqueiam a replicação do DNA (SOUZA et al. 2015).

O surgimento do câncer pode ocorrer a partir de alterações epigenéticas ao longo do tempo e mutações em genes específicos, chamados proto-oncogenes, nas células que passam a receber comandos inadequados (SOTTO-MAYOR, 2002; INCA, 2019). A epigenética relaciona ambiente e estresse oxidativo durante o

processo de carcinogênese e objetiva explicar fenótipos celulares originados a partir de um único genótipo. Dessa forma, o ambiente pode ser responsável por essas alterações. Alguns dos mecanismos da epigenética são mudanças químicas na cromatina, metilação do DNA (adição de um grupamento metila no carbono 5) e modificações pós-traducionais em histonas (SILVA et al. 2014). Inúmeros processos com efeitos a longo prazo na expressão gênica, sem mudar a sequência do DNA, atuam iniciando e mantendo a diferenciação celular. Muitas pesquisas têm focado na produção de drogas epigenéticas desmetilantes (DELCUVE et al. 2009).

Os proto-oncogenes são atuantes em células normais e, quando convertidos em oncogenes e realizam o processo de carcinogênese em todas as suas etapas de desenvolvimento (SOTTO-MAYOR, 2002; INCA, 2019). Dessa forma, tornou-se consenso durante muito tempo, que o câncer seria uma doença de origem genuinamente genética, visto que mudanças no DNA são os responsáveis pela causa das proliferações descontroladas, tendo como premissa a teoria das mutações somáticas (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Segundo Knudson (1993), o câncer é fortemente influenciado pela predisposição genética das pessoas e afirma que a forma mais marcante dessa vulnerabilidade genética individual envolve herança mendeliana dominante com alta penetrância.

Alguns estudos demonstram que a mutação de oncogenes induz o estresse de replicação em sítios genômicos mais vulneráveis. Os oncogenes agem de diferentes formas. O RAS oncogênico tem sido associado ao estresse de replicação do DNA como consequência do estresse oxidativo e a sua expressão provoca aumento da transcrição global, a hiperproliferação e aumento da velocidade de bifurcações de replicação. O MYC promove o estresse de replicação, gerando colisões entre a maquinaria de replicação e transcrição, além de ativar o complexo Ciclina E/ CDK 2. Outros oncogenes atuantes na promoção dos mecanismos de estresse de replicação do DNA são CCNE1, CDC6, CDC25, MDM2 e BCL-2 (PRIMO et al. 2020).

Hanahan e Weinberg (2000) sugerem que a diversidade de genótipos das células cancerosas é resultado de alterações na fisiologia celular, que atuam em conjunto no crescimento e proliferação das células malignas. A célula cancerosa apresenta algumas características marcantes como a autossuficiência para sinais de

crescimento, assim como a insensibilidade aos sinais que induzem à inibição dos sinais de crescimento, capacidade de evadir-se do processo apoptótico, potencial de replicação celular ilimitado e fora do controle; além de angiogênese sustentada e habilidade de invadir tecidos, formando metástases em outras partes do corpo que não o local de origem do câncer. Hanahan e Weinberg (2011) acrescentam quatro características aos marcos do câncer, chamados de marcos emergentes, sendo eles a instabilidade genômica e mutações, desregulamentação energética celular, promoção da inflamação do tumor, além da capacidade de evitar a destruição imune.

Além disso, as células cancerosas são constantemente expostas a condições adversas como hipóxia, perda de adesão ao substrato (célula - célula e célula - matriz extracelular), estresse inflamatório e metabólico, desregulação da produção energética; além do estresse farmacológico, provocado durante o tratamento da doença, em especial na quimioterapia (DHILLON et al. 2007). Por conta da heterogeneidade clonal, muitos tumores são histopatologicamente diversos, com inúmeros graus de diferenciação, proliferação, vascularização, inflamação e/ou capacidade de invadir novos tecidos (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Todas essas peculiaridades encontradas nas células com câncer contribuem para a falta de sucesso dos mecanismos de defesa anticâncer, que são apresentados pelo sistema imunológico e acredita-se que essas características são compartilhadas por todos os tipos de tumores humanos (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Além da complexidade natural intrínseca da doença, observa-se também a evolução mutacional ocorrida a partir do avanço constante da patologia, assim como devido ao tratamento no qual os pacientes são continuamente expostos e que contam com diversas substâncias químicas (COOPER et al. 2013).

Hanahan e Weinberg (2000), descreveram o microambiente tumoral como uma reunião de diferentes tipos celulares, tanto na região parenquimatosa da célula quanto no estroma, que incluem células endoteliais, células imunes inflamatórias, pericitos e fibroblastos associados ao câncer. As células do estroma proporcionam uma variedade de microambientes tumorais, os quais passam por modificações a medida em que o tumor invade novos tecidos. Características como a abundância,

diversidade histológica e aspectos fenotípicos das células encontradas no estroma tumoral, assim como na matriz extracelular (MEC), propiciam o crescimento do tumor primário e posterior desenvolvimento do processo metastático. O microambiente tumoral conta com células infiltradas do sistema imunológico que atuam com leucócitos, podendo se apresentar tanto como antagonistas quanto como promotores tumorais, em quase todos os casos de neoplasias. O fator antagonista e promotor pode ser compreendido pela diversidade de funções do sistema imunológico. Os fibroblastos associados ao câncer estão presentes na grande maioria dos carcinomas, sendo considerados em muitos casos como a população celular dominante no estroma tumoral (HANAHAAN e WEINBERG, 2011).

Acredita-se que as células tumorais prejudicam o funcionamento do sistema imunológico através de vários mecanismos, incluindo a produção de citocinas de imunossupressão, a inibição da função das células do sistema imunológico, a proteção contra a atividade lítica de efetores imunitários e ativação de macrófagos associados ao tumor (TAM). Com isso, a imunossupressão é uma das consequências do câncer (AGARWAL et al. 2010; VASIEVICH; HUANG, 2011; ZAMARRON; CHEN, 2011).

O diagnóstico precoce é fundamental para aumentar a sobrevida dos pacientes oncológicos e ampliar suas chances de cura. Os exames normalmente utilizados estão em constante evolução, a fim de melhorar sua eficiência na detecção do câncer. Ácidos nucleicos, proteínas e lipídios são macromoléculas que podem ser usadas como marcadores para detecções tumorais (LIMA, 2015). Muitas características descritas previamente na etapa clínica, somadas ao diagnóstico histopatológico, auxiliam na classificação e busca do tratamento mais adequado e eficiente para cada caso (SCHULZ, 2007).

Cirurgia, quimioterapia e radioterapia são as abordagens mais frequentes na terapia do câncer. Além desses tratamentos, também é possível realizar transplante de medula óssea, em casos de leucemias e linfomas (INCA, 2019). Embora a ressecção cirúrgica e radioterapia sejam, muitas vezes, bem sucedidas na erradicação de tumores primários; um problema comumente encontrado é a recidiva da doença, devido à presença de células tumorais residuais e/ou metástases (VANNEMAN; DRANOFF, 2014). O INCA informa que a quimioterapia pode ser

realizada de modo ambulatorial ou com internação do paciente e geralmente ocorre associada a outras abordagens terapêuticas, tendo sido muito utilizada nos tratamentos atuais, mas seus efeitos colaterais são preocupantes. Algumas das possibilidades de reações são a queda de cabelo e perda de peso, feridas na boca, cansaço aos pequenos esforços, falta de ar, sangramento e aparecimento de manchas roxas ou avermelhadas na pele. O microambiente tumoral influencia de forma significativa na resposta terapêutica e o desfecho clínico. A resistência aos fármacos está relacionada a liberação de substâncias pelo tumor ou pelo estroma, onde, a adesão de células tumorais a fibroblastos do estroma ou a componentes da matriz extracelular pode influenciar na resposta terapêutica. Atualmente, as novas abordagens de combate a cânceres resistentes envolvem a reprogramação da resposta imune, e o desenvolvimento de combinações racionais de fármacos que possam simultaneamente direcionar as células tumorais e o microambiente, influenciando na resposta terapêutica (WU; DAY, 2017).

Nem todo tratamento é acessível aos pacientes oncológicos. Zafar e colaboradores (2013) trabalharam em seus estudos com o conceito chamado de toxicidade financeira, referente aos impactos financeiros negativos causados aos pacientes, que precisam custear o tratamento contra o câncer, de modo que algumas pessoas podem estar mais predispostas que outras. Esse estudo sugere que para muitos pacientes, cortar despesas em prol do tratamento contra o câncer é muito desgastante; adquirindo dívidas ao longo do processo e precisando optar entre algumas necessidades básicas do cotidiano, a fim de conseguir pagar o tratamento necessário.

Com isso, a busca por alternativas terapêuticas de menor custo, acessíveis a população e com menores efeitos colaterais têm sido motivo para pesquisas na área oncológica.

1.2 Mesoiônicos

Os compostos mesoiônicos fazem parte do cenário das pesquisas oncológicas. Sintetizados desde 1882, tiveram seu conceito e os métodos de síntese modificados; sendo definidos como betaínas heterocíclicas que se estabilizam

através da deslocalização de elétrons e cargas (BALABAN et al. 2004; FILHO, 2006). O potencial valor dos compostos mesoiônicos como substâncias biologicamente ativas está no seu caráter betaínico e planar, na variação de densidades de cargas eletrônicas no anel heterocíclico, sendo uma exocíclica, atribuindo assim propriedades anfífilas (ATHAYDE -FILHO et al. 1999); sendo capazes de interagir com biomoléculas, tais como, DNA e/ou proteínas por serem semelhantes a compostos que são farmacologicamente ativos (SENFF-RIBEIRO et al. 2004; FILHO, 2006). Apesar de serem normalmente sintéticos, apresentam também em sua composição anéis heterocíclicos de ocorrência natural como é o caso do tiazol, oxazol, tiadiazol, oxadiazol e triazol (BADAMI, 2006).

Podem ser representados por estruturas polares híbridas, com caráter aromático no anel carregado positivamente, o qual é contrabalanceado por um átomo exocíclico negativo. Apresentam ainda, capacidade de interagir eletrostaticamente com duas posições complementares e solubilidade em solventes apróticos. Características como o caráter elétrico carregado, neutro e suas propriedades químicas são ativos importantes para fazer dos mesoiônicos possíveis agentes medicinais em muitas funções biológicas diferentes (BADAMI, 2006; FILHO, 2006; KAWASE et al. 2007). Eles apresentam dois ou mais heteroátomos, tal qual o oxigênio e nitrogênio (BADAMI, 2006). Muitos compostos mesoiônicos são capazes de passar por interconversões a fim de tornarem-se mais estáveis. Existem inúmeros métodos para sintetizar derivados dos compostos mesoiônicos (FILHO, 2006).

O anel heterocíclico apresenta duas cargas balanceadas e correspondentes, sendo uma positiva e uma negativa em um átomo unido por ligação covalente (COSTA et al. 2020). Eles são totalmente neutros o que possibilita a interação com membranas biológicas, permitindo sua permeabilidade em barreiras lipídicas (FERREIRA et al. 2008).

Inspiradas nesse contexto, as pesquisas farmacêuticas têm constantemente desenvolvido novos compostos heterocíclicos (BALABAN et al. 2004; KAWASE et al. 2007). A primeira classe de compostos mesoiônicos para qual se observou importantes atividades biológicas foram as sidnona, as quais foram manipuladas pela primeira vez em 1935 e em 1992 foram analisadas quanto às suas possíveis atividades anticâncer (BROOKES & WALKER, 1957; KAWASE et al. 2007). A partir

daí estudos foram realizados e várias atividades biológicas foram atribuídas aos compostos mesoiônicos. Dentre essas, destacam-se a atividade antifúngica (PAIVA et al. 2015), antimicrobiana (ATHAYDE-FILHO et al. 1999; DESHPANDE; PAI, 2010; OLIVEIRA, 2011; DUBEY et al. 2014), antineoplásica (GRYNBERG et al. 1992; DUNKLEY; THOMAN, 2003; SENFF-RIBEIRO et al. 2004), antidepressivo (ANDERZHANOVA et al. 2001), anti-inflamatória (DESHPANDE; PAI, 2010), anticonvulsivante, antiepiléptica (VIDA et al. 1975; CORTES et al. 1985), antiarrítmico cardíaco, esquistosomicidas (WERBEL et al. 1977), inseticida (DUBEY et al. 2014) e sedativo (KAWASE et al. 2007).

O National Cancer Institute (NCI) considera a resistência às drogas como uma das principais justificativas para fracassos no tratamento contra o câncer; em média mais de 90% dos pacientes com câncer metastático, bem como com células tumorais micro metastáticas, apresentam problemas quanto à resistência desenvolvida para alguns compostos. Dessa forma, um tratamento que a princípio foi eficaz pode ao longo do tempo tornar-se ineficiente, permitindo que o tumor volte a se desenvolver. Considera-se que além da resistência que pode ser adquirida no decorrer do tratamento, existe a possibilidade dos tumores serem naturalmente resistentes à quimioterapia, visto que não se tornam resistentes apenas às drogas, as quais tiveram contato no tratamento, mas também a outros medicamentos com diferentes mecanismos de ação (LONGLLEY et al. 2005).

Alguns estudos já foram realizados com derivados dos compostos mesoiônicos quanto a sua atividade antitumoral, como os da classe 1,3,4-tiadiazóis, que demonstraram citotoxicidade em diferentes linhagens tumorais humanas, incluindo câncer de próstata, pulmão, mama, útero, bexiga, fígado, além de cânceres retal, neuronal e colorretal (JAIN et al. 2013). Também derivados do composto 2-amino-5-(2,4-dihidroxifenil)- 1,3,4-tiadiazóis, após incubação de 72h, apresentaram alta capacidade citotóxica para carcinomas de bexiga (HCV29T), mama (T47D) e de pequenas células de pulmão (A549), além de adenocarcinoma retal (SW707) (MATYSIAK, 2006).

Senff-Ribeiro et al. (2004) concluíram em seu estudo, que o composto mesoiônico cloreto de 4-fenil-5-(nitrocinamoil)-1,3,4-tiadiazóis-2-fenilamina (MI-D) apresentou resultados positivos tanto nos testes *in vitro* quanto nos testes *in vivo*

para o câncer melanoma murino. Observaram ainda que além do potencial citotóxico e antiproliferativo na linhagem celular do melanoma humano, o MI-D afeta características celulares relacionadas à progressão da patologia. Badami (2006) analisou em seu artigo sobre os mesoiônicos que os compostos heterocíclicos se apresentam como substâncias promissoras no estudo e desenvolvimento farmacológico inclusive para possibilidades de drogas antitumorais.

A habilidade dos derivados dos tiadiazóis no controle da atividade anticancerígena está relacionada ao DNA alvo, que no câncer está com sua replicação descontrolada. Os heteroátomos desses compostos fazem interações com as pontes de hidrogênios e com enzimas que participam na tumorigênese, como as anidrases carbônicas IX e XII (LI et al. 2013). Szeliga (2020) percebeu em seu trabalho muitas possibilidades dos derivados de tiadiazólio. Essas substâncias podem atuar inibindo a atividade da anidrase carbônica, por inibição de glutaminase e inibição de histonas desacetilase, que atuam removendo grupamentos acetil das proteínas histonas do DNA de ligação.

2. INTRODUÇÃO

O câncer apresenta-se como um conjunto de doenças, que anualmente mata milhares de pessoas em todo o mundo. Dispõe de características peculiares que o torna extremamente eficaz no seu processo de desenvolvimento patológico, muitas vezes autossuficiente e capaz de afetar diferentes partes do corpo, independentemente de aspectos como idade, classe social ou etnia sendo dessa forma muito difícil de tratar. Dentre algumas das características das células cancerosas, têm-se os chamados marcos do câncer como a capacidade de escapar da apoptose, produção dos próprios fatores de crescimento e o potencial metastático (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

O tumor maligno pode se desenvolver a partir de alterações genéticas e epigenéticas, que são multiplicadas constantemente através do processo de divisão celular, quando este não apresenta pontos de checagem plenamente eficientes, os quais em situações típicas direcionariam as células mutadas para o processo natural de morte celular, não permitindo a proliferação delas. Além disso, questões habituais

e ambientais de cada indivíduo, também influenciam o desenvolvimento do câncer, os chamados fatores carcinogênicos. Dentre esses, são exemplos as relações sexuais desprotegidas, alcoolismo, tabagismo e radiação solar excessiva. Com isso, pessoas com predisposição quando expostas aos fatores, darão início ao processo de carcinogênese, tornando-se mais vulneráveis ao desenvolvimento da doença.

De acordo com informações do National Cancer Institute (NCI, 2020), anualmente nos Estados Unidos, cerca de 89.000 jovens entre 25 e 39 anos são diagnosticados com câncer e os tipos mais comuns de cânceres causando mortes entre adolescentes e jovens adultos são os de mama, leucemia, colorretal e cerebral. Os números do Instituto Nacional de Câncer (INCA) indicam cerca de 117.477 óbitos de homens no Brasil em 2018 causados por alguma neoplasia, sendo o de traqueia, brônquios e pulmões com maior representatividade (13,9%) e 107.235 óbitos de mulheres no Brasil em 2018 sendo o de mama com maiores números (16,4%).

As formas de tratamentos disponíveis atualmente representam uma solução com muitos prejuízos, dado o alto custo e a toxicidade na qual os pacientes precisam ser constantemente expostos. Por isso, novas possibilidades precisam ser estudadas a fim de promover além do aumento da sobrevida, melhor qualidade de vida, com drogas que apresentem menos efeitos colaterais.

Os compostos mesoiônicos são considerados como betaínas heterocíclicas e têm sido estudados desde a década de 30, devido às suas características químicas e moleculares; apresentando-se como substâncias promissoras no desenvolvimento farmacológico em muitas áreas, inclusive na oncologia, citada em alguns trabalhos. Com isso, pesquisas ainda precisam ser realizadas, na tentativa de confirmar o potencial desses compostos, se realmente serão eficientes no tratamento do câncer, possibilitando menor toxicidade, comparada às drogas já disponíveis no mercado.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antitumoral *in vitro* e atividade imunomoduladora do composto mesoiônico 5-(4-clorofenil)-3-metil-4-fenil-1,3-tiazolio-2-tiolato (MI-2).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

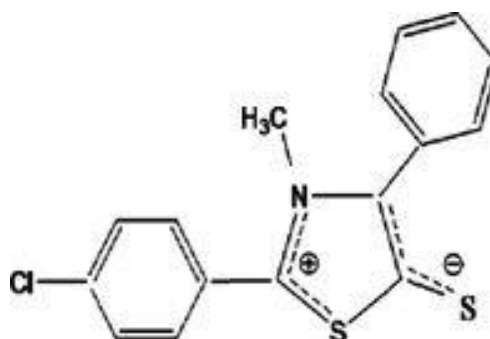
- Determinar a concentração inibitória 50% (IC50) do composto nas linhagens celulares humanas (NCI-H292, HT-29, HL-60 e MCF-7);
- Realizar análise morfológica das células tumorais humanas de HL-60 em contato com o composto MI-2;
- Analisar a fragmentação do DNA nas células tumorais humanas de HL-60 em contato com o composto MI-2;
- Avaliar o efeito citotóxico do MI-2 em células mononucleadas (PBMC) de ratos (*Rattus norvegicus*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO COMPOSTO

O composto 5-(4-clorofenil)-3-metil-4-fenil-1,3-tiazolio-2-tiolato (MI-2) foi cedido pelo Professor Doutor Petrônio Filgueiras de Athayde Filho, do Departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Figura 1. Fórmula estrutural do composto mesoiônico 5-(4-clorofenil)-3-metil-4-fenil-1,3-tiazolio-2-tiolato (MI-2).



4.2 CÉLULAS

As linhagens de células humanas utilizadas a princípio foram NCI-H292 (Carcinoma mucoepidermóide de pulmão), HL-60 (Leucemia promielocítica), HT29 (Adenocarcinoma colorretal) e MCF-7 (Câncer de mama); obtidas e mantidas no laboratório de cultura de células do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As linhagens utilizadas foram mantidas em meio DMEM - Minimum Essencial Medium Eagle modificado Dulbecco's (Sigma Aldrich) e RPMI - Roswell Park Memorial Institute suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO), e 1% de Lglutamina 200mM, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

4.3 ANIMAIS

Foram utilizados 12 ratos machos (*Rattus norvegicus*) variedade Wistar, 150 dias de idade, pesando em média 400g, obtidos do biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA/UFRPE). Todos foram mantidos nesse biotério em ambiente controlado (fotoperíodo de 12h claro/escuro, temperatura de 21 ± 2°C e umidade de 55 ± 10%), acondicionados em gaiolas de policarbonato, forradas com

maravalha de pinus; com acesso a água e ração (Labina, PURINA®), *ad libitum*. O experimento foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco - CEUA/UFRPE (n°106/2019).

4.4 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS TUMORAIS

A determinação das concentrações inibitórias médias (IC50) das amostras foi realizada através do método colorimétrico do MTT. As células tumorais (NCI-H292, HL-60, HT29 e MCF-7) foram semeadas (2×10^5 células x poço⁻¹) em placas de 96 poços (BD/Labware®). As linhagens NCI-H292, MCF-7 e HT29, foram semeadas 24h antes, para que as mesmas pudessem se aderir. Em seguida, o composto previamente dissolvido em DMSO, passou por diluição seriada no meio DMEM para as linhagens (HT29 e NCI-H292) e no meio RPMI para as linhagens (MCF-7 e HL-60), obtendo as concentrações ($0,048 - 50\mu\text{g/mL}^{-1}$) e adicionado em placas de 96 poços ($100\mu\text{L}$. Poço⁻¹). A doxorrubicina foi usada como droga padrão. Após 72h em estufa a 37 °C e 5% de CO₂, as placas contendo as células em contato com o composto, foram centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi aspirado e adicionado 150μL de solução de MTT (brometo (3-[5,4-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich®) na concentração de $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. As placas foram deixadas por 3h em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ e ao final desse período, 150μL de DMSO (Dimetilsulfóxido PA) (Synth®) foi adicionado a cada poço para dissolução dos cristais de formazan. O teste do MTT é o teste inicial de triagem de novos candidatos a fármacos antitumorais, sendo este teste preditivo na análise de crescimento celular através da investigação da função mitocondrial. O MTT de cor amarela é convertido em formazan de cor púrpura, na mitocôndria de células metabolicamente viáveis, esses cristais de formazan são então solubilizados utilizando o solvente (DMSO) (MOSMAM, 1983; ALLEY, 1998).

A absorbância foi medida em um leitor de microplacas (Modelo 3550 BIO-RAD, Inc.) no comprimento de onda de 595nm e o efeito do composto foi quantificado pela comparação com a absorbância do grupo controle.

4.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA

As células de HL-60 foram semeadas (2×10^5 células x poço⁻¹) em placas de 24 poços (BD/Labware®). A doxorubicina foi usada como droga padrão. Após 72h em estufa a 37 °C e 5% de CO₂, as placas contendo as células em contato com o composto MI-2, foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. Em seguida, realizou-se coloração por panótico rápido. As lâminas foram observadas em microscópio óptico com objetiva de aumento de 100x.

A coloração por panótico rápido permite a visualização das características morfológicas das células por meio de uma coloração diferenciada da membrana celular, citoplasma e núcleo. Essa técnica pode sugerir um possível mecanismo de morte celular por apoptose, necrose ou autofagia.

4.6 ANÁLISE DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA (DNA LADDER)

A extração do DNA foi realizada através do protocolo fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Em um tubo eppendorf de 1,5mL foi adicionado: 100µL das amostras de HL-60 (suspensos em 100µL de TE (tris 10 mM-EDTA 1mM pH 8,0) e 100µL de fenol equilibrado em pH 8,0. Posteriormente as amostras foram homogeneizadas por 1 minuto em Vórtex e centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo eppendorf devidamente identificado. A este tubo foi adicionado 50µL de fenol e 50µL de clorofórmio. As amostras foram novamente homogeneizadas por 1 minuto em Vórtex e centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo eppendorf e foi adicionado 100µL de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas por 1 minuto em Vórtex e centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos. Em um outro tubo eppendorf foi adicionado seguindo a ordem: 10µL de acetato de amônio 3 M, 100µL do sobrenadante do tubo anterior e 100µL de isopropanol absoluto gelado. As amostras foram mixadas em Vórtex por 1 minuto e incubadas no freezer por 60 minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos, depois o sobrenadante foi desprezado e o pellet lavado com 500µL de etanol a 70%, em seguida centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet seco em temperatura ambiente. Ao pellet seco foi adicionado 50µL de água ultrapura e as amostras foram

colocadas na geladeira por 10 minutos e levadas ao freezer por pelo menos 30 minutos.

Os padrões de banda foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com Blue green loading dye I (LGC - Biotecnologia), visualizado em transluminador de ultravioleta, comparados com marcador de peso molecular de 100bp (DNA Ladder, Invitrogen, USA) e fotodocumentados.

4.7 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)

Para o isolamento das células mononucleadas foi realizada eutanásia dos ratos, com utilização da associação anestésica em sobredose de sobredose de um anestésico dissociativo mais um agonista de adrenorreceptores de alfa-2, conforme Resolução Normativa nº37 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Foram utilizados Cetamina 80mg/Kg e Xilazina 60mg/Kg, intramuscular, conforme metodologia sugerida por Nunes et al. (1999). Coletou-se o sangue por punção cardíaca (obtendo-se em média 7mL por rato), sendo acondicionado em tubos contendo heparina.

Após a coleta, cada 6mL de sangue foram diluídos em 3mL de PBS e adicionados vagarosamente em um outro tubo contendo 2mL de Ficoll®-Hypaque (Sigma). Em seguida, o tubo foi centrifugado a 1500 rpm por 30 minutos para a separação das fases da solução. Devido a formação de um gradiente de densidade pelo Ficoll, as células mononucleares concentram-se na camada localizada ao meio, entre o plasma (fase clara) e os eritrócitos (fase escura). As PBMC foram transferidas para outro tubo ao qual foram acrescidos PBS até o volume final de 11mL, sendo então centrifugados a 1000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet da PBMC foi ressuscitado em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (para obter uma concentração final de 100 U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina). Fitohemaglutinina (Sigma) 2%, um agente mitogênico, foi adicionado ao meio para estimular a proliferação dos linfócitos. Os quais foram plaqueados (placas de 96 poços) na concentração de $2,0 \times 10^6$ células/poço e mantidos sob incubação por 48h a 37 °C e 5% de CO₂.

Para realização do teste do MTT, o composto mesoiônico previamente dissolvido em DMSO foi diluído em série, em meio DMEM para obtenção das concentrações finais (0,048 - 25µg/mL) e adicionado a placa contendo as células. Após um período de incubação de 72h, a placa foi retirada e centrifugada a 1500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi aspirado e adicionou-se 150µL de solução de MTT em DMEM, sendo a placa colocada na estufa a 5% de CO₂ por 3h. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, tendo o sobrenadante aspirado e seu precipitado ressuspenso em DMSO e agitado por 30 minutos, até completa dissolução dos cristais de formazan. A placa foi lida no espectrofotômetro de placa a um comprimento de onda de 595nm.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Nos ensaios de citotoxicidade foram calculadas as IC₅₀ a partir das curvas dose-resposta por regressão não linear utilizando o programa GraphPadPrism® (versão 5).

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE CITOTÓXICA DO COMPOSTO

O teste de MTT em dose única (25µg/mL) após 72h de exposição aos fármacos está representado na tabela 1. Os resultados demonstram que o composto induziu um percentual de inibição acima de 70% para a linhagem da Leucemia Promielocítica (HL-60). Os dados são apresentados com o percentual de inibição ± desvio padrão.

Tabela 1. Análise do percentual de inibição de crescimento (%) realizado pelo teste do MTT em dose única de 25µg/mL após 72h de exposição ao fármaco.

Substâncias/Linhagens	HL-60	HT29	NCI-H292	MCF-7
MI-2	71,1 ± 3,02	39,08 ± 4,6	59,48 ± 1,63	49,07 ± 0,95
Doxorrubicina	97,0 ± 0,88	95,0 ± 0,9	96,0 ± 0,86	95,0 ± 0,85

Na tabela 2 é possível verificar os resultados de IC50% (Concentração que inibe 50% do crescimento celular), após 72h de exposição aos compostos. Os dados são apresentados com o valor da IC50% e intervalo de confiança.

Tabela 2. Análise da concentração inibitória 50% (IC50) e intervalo de confiança de 95%, realizado a partir de diluições seriadas do composto no teste do MTT em 72h de exposição ao fármaco.

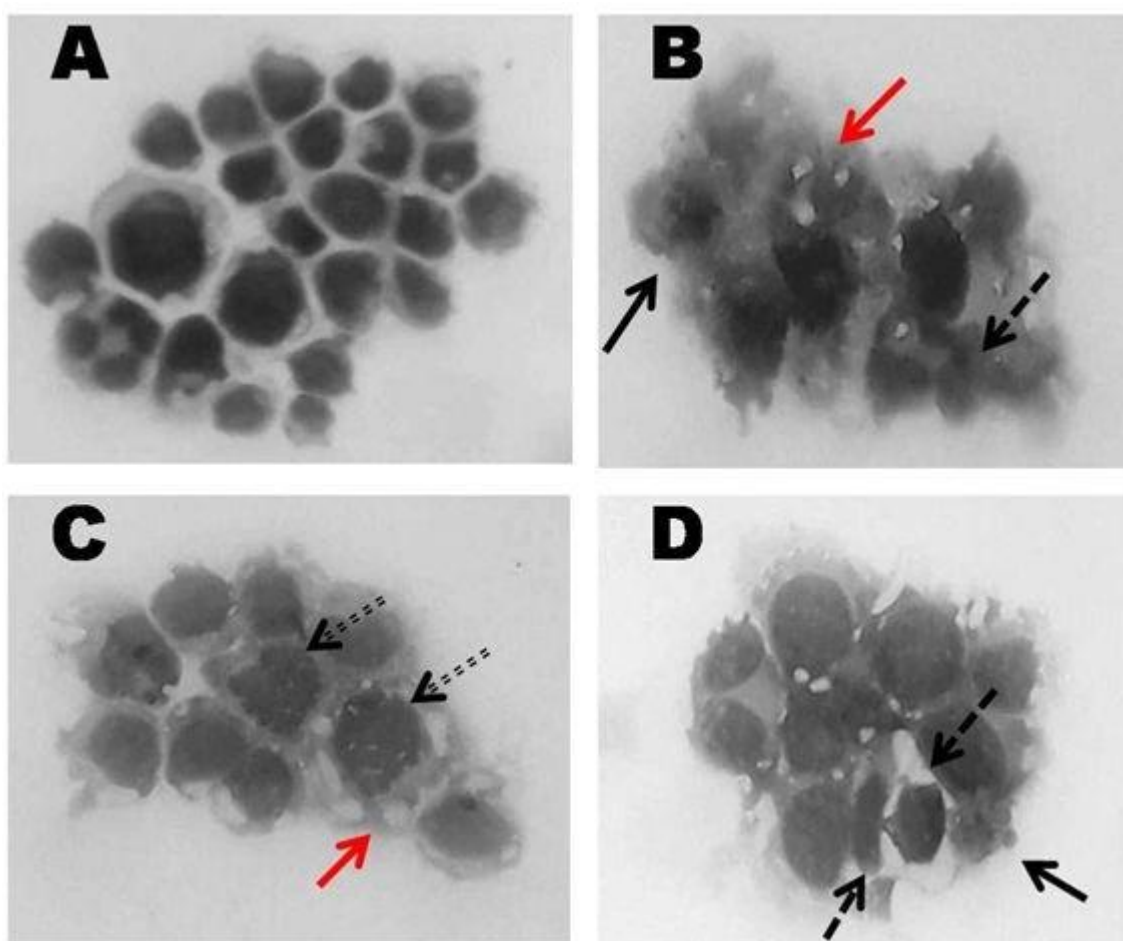
Substâncias/Linhagens	HL-60	HT29	NCI-H292	MCF-7
MI-2	2,03 1,5 - 3,9	>25	13,02 11,03 - 18,26	>25
Doxorrubicina	0,02 0,01 - 0,02	0,9 0,6 - 1,5	0,04 0,01 - 0,1	0,2 0,1 - 0,2

Os resultados demonstraram que a HL-60 permitiu ser calculada a IC50%, corroborando com o teste de percentual de inibição em dose única. Como a linhagem a apresentar percentual acima de 70% foi a HL-60, apenas esta apresentou a IC50 em valores calculáveis pelo programa estatístico GraphPadPrism®. Os testes mostraram também que o composto 5-(4-clorofenil)-3-metil-4-fenil-1,3-tiazolio-2-tiolato (MI-2) apresentou atividade citotóxica em 72h na linhagem HL-60. Portanto, esta foi a linhagem escolhida para dar continuidade ao estudo de avaliação do potencial antitumoral.

5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA

A análise morfológica demonstrou que as células tratadas com o composto 5-(4-clorofenil)-3-metil-4-fenil-1,3-tiazolio-2-tiolato (MI-2), apresentaram indícios de morte celular causadas por duas vias diferentes, apoptose e autofagia (figura 2).

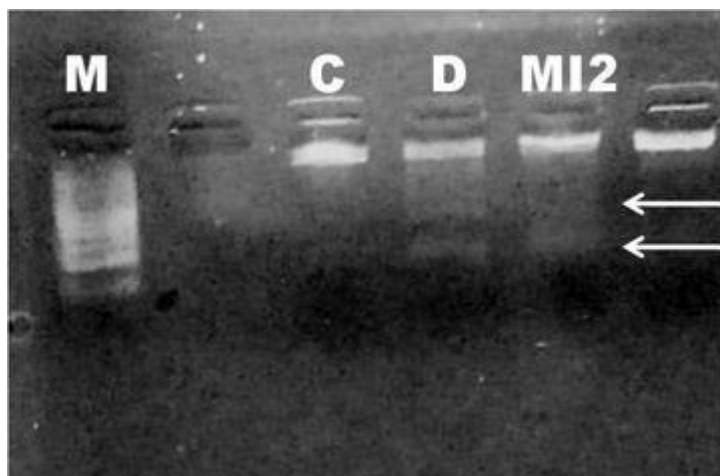
Figura 2. Análise morfológica realizada por coloração diferencial (panótico rápido). A - Controle negativo, B - Doxorrubicina 0,5µg/mL, C e D - MI-2 2,0µg/m. Objetiva 100x. As setas em preto contínuo mostram as células em processo de morte por apoptose (formação de corpos apoptóticos). As setas pretas tracejadas apresentam indícios de morte por apoptose (condensação da cromatina). As setas pretas com duplo tracejado apresentam indícios de morte por apoptose (fragmentação nuclear). As setas em vermelho apresentam indícios de morte por autofagia (formação de vacúolos autofágicos).



5.3 ANÁLISE DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA (DNA LADDER)

A figura 3 mostra a fragmentação do DNA associada ao composto MI-2. É possível observar que na concentração de 2,0µg/mL, houve fragmentação do DNA no padrão de escada, o que não ocorreria caso a via de morte celular fosse por via necrótica, pois nesta, o gel apareceria com um padrão de “arrastado”. A doxorubicina (0,5µg/mL) também induziu a fragmentação do DNA, confirmando assim os resultados da análise morfológica, que mostraram células em provável apoptose induzida pelo composto teste. O controle negativo apresentou uma banda íntegra, encontrada no DNA genômico.

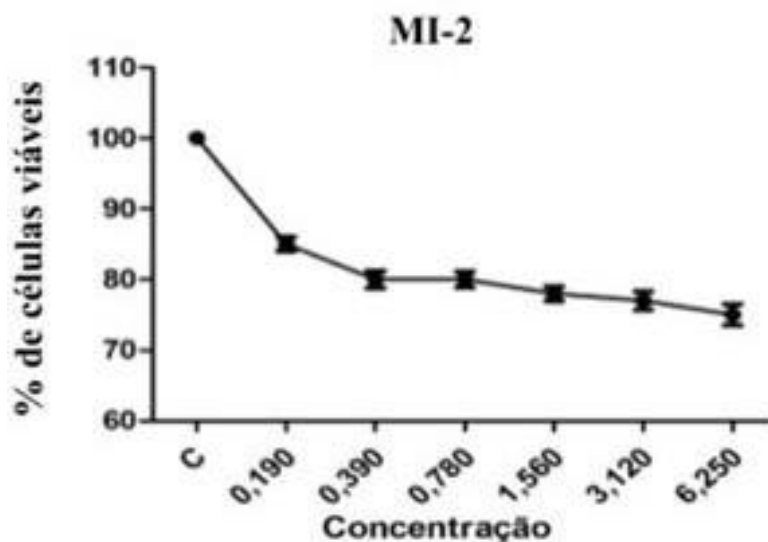
Figura 3. Análise da fragmentação do DNA das células de HL-60. Teste do DNA Ladder induzido pelos compostos através de gel de agarose a 2% corados com Blue green loading dye I (LGC - Biotecnologia), visualizados em transluminador de ultravioleta, comparados com o marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen, USA) e fotodocumentados. M - Marcador de peso molecular, C - Controle negativo, D - Doxorubicina (0,5µg/mL), MI-2 (2µg/mL).



5.4 ANÁLISE DO EFEITO CITOTÓXICO DO MI-2 EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)

Quanto à determinação do efeito citotóxico do composto MI-2 em células mononucleadas (PBMC) de ratos (*Rattus norvegicus*), os resultados demonstram que a IC50 não pode ser calculada em linfócitos dos ratos. O percentual de células viáveis variou entre 75% e 85% da menor para a maior concentração, como mostra a figura 4.

Figura 4. Percentual de células mononucleares (PBMC) viáveis dos ratos após 72h de exposição ao composto MI-2 em seis concentrações diferentes.



6 DISCUSSÃO

O teste do MTT realizado para análise da citotoxicidade em células tumorais humanas a partir da atividade mitocondrial, demonstrou resultados promissores para a linhagem HL-60 tanto no teste realizado em dose única, quanto no teste da concentração inibitória média através de uma diluição seriada do composto MI-2.

Durante os testes de investigação de ação antitumoral, para que novos fármacos sejam futuramente escolhidos é necessário que eles apresentem primeiramente valor acima de 70% no teste de percentual de inibição em dose única e uma concentração abaixo de 4µg/mL no teste do MTT para análise da concentração inibitória média (IC50) (NCI Instituto Nacional de Câncer, USA).

A HL-60 foi a linhagem celular tumoral em que o derivado mesoiônico estudado demonstrou atividade citotóxica no período de 72h baseado no resultado do teste realizado em dose única bem como no teste feito com diluições seriadas, por isso, a HL-60 foi escolhida para continuar sendo testada com o MI-2. Dessa forma, o MI-2 apresenta potencial de inibição de crescimento acima de 70% e necessita de uma concentração abaixo de 4µg/mL para inibir 50% do crescimento celular, conforme recomendações da NCI. Macêdo (2017) também obteve resultado positivo com o uso de derivados mesoiônicos para HL-60, trabalhando com o composto MIH 2.4BI (com base livre) e MIH2.4Zn (composto mesoiônico MIH 2.4 com zinco), observou melhor toxicidade nessa linhagem, ao se trabalhar com o composto acoplado ao zinco. Gozzi et al. (2015) também trabalharam em sua pesquisa com alguns derivados mesoiônicos como MI-J e MI-D, demonstrando em seus experimentos que tais composto não apresentaram atividade citotóxica para os hepatócitos não tumorais, do mesmo modo que o MI-2 estudado nesta pesquisa não se mostrou citotóxico para as células mononucleares.

A análise morfológica das células tumorais expostas ao MI-2, sugeriu que as células tenham morrido pela via apoptótica e autofágica. Segundo Betts e Kings (2001), a célula no processo de apoptose pode apresentar alterações como, condensação da cromatina, fragmentação do núcleo e presença de corpos apoptóticos; corroborando com os achados. Hwang e Baek (2010), citam que durante a autofagia, os constituintes do citoplasma são sequestrados dentro de vesículas de dupla membrana, chamados de autofagossomos, e são levados aos

lisossomos para que sejam degradados e reciclados; assim como foram encontrados nos resultados.

A análise morfológica por coloração diferencial, permite que substâncias sejam eleitas ou descartadas de testes mais específicos, por demonstrar os principais indícios de vias de morte celular, nesse contexto os nossos resultados sugerem que a indução da morte celular foi causada pelo composto, mas são necessários testes mais específicos para comprovar efetivamente esse resultado preliminar. Apoptose e necrose são duas vias diferentes de morte celular, sendo a primeira uma via conservada, ocorrendo por um processo sincronizado, dependendo de energia, que envolve a ativação de diversas caspases e de uma cascata de eventos biológicos com o objetivo de eliminar do corpo células infectadas, redundantes ou alteradas. Além disso, a apoptose difere do processo necrótico também, em características morfológicas como a fragmentação do DNA e condensação da cromatina. A necrose envolve a perda de integridade da membrana e distensão ou ruptura da mitocôndria, propiciando dessa forma um processo inflamatório que não ocorre na apoptose (RICHA et al. 2009).

A apoptose também é marcada pelo processo de fragmentação do DNA em fragmentos com 180 - 200 pares de base ou múltiplos integrais, produzindo o típico “padrão em escada” no gel de agarose. A fragmentação na apoptose ocorre através da ativação de endonucleases, diferentemente da necrose onde a fragmentação ocorre de forma aleatória produzindo assim um padrão de “arrastado” no gel (GOLD et al. 1993). Nagata (2000) sugere em sua revisão, que possivelmente outra função importante da fragmentação do DNA que ocorre na apoptose pode ser de reduzir a resposta autoimune, pois o DNA é um autoantígeno forte. Dessa forma, se a morte celular causada por via necrótica ocorrer além da capacidade dos fagócitos de limpar as células mortas, o DNA dessas células mortas pode induzir a resposta autoimune no corpo, por isso a apoptose é uma via imunologicamente ideal para indução de morte celular. No presente estudo, o teste de fragmentação do DNA realizado em gel de agarose, sugeriu que a via de morte induzida pelo MI-2 é a apoptose, formando o chamado padrão de escada (ANAZETTI et al. 2003; LIN; FUJII; HOU, 2003; BERTÃO et al. 2012).

Os resultados preliminares com o MI-2, sugerem baixa atividade citotóxica em linfócitos de ratos nas concentrações testadas. O teste da citotoxicidade nas células mononucleadas é muito importante, dentre outros fatores, para analisar se a droga possivelmente causará ao paciente tantos efeitos colaterais e adversos como as atualmente disponíveis no mercado. Derivados mesoiônicos do oxatriazol, mostraram efeito citotóxico e imunossupressor em linfócitos humanos com concentrações a partir de 1µg/mL (KOSONEN et al. 1997).

Assim como o MI-2, muitos derivados mesoiônicos também tem demonstrado resultados positivos como o (1,3,4-tiadiazolium-2-aminide {MI-HH e MI-4-OCH₃}) que apresentou potente atividade imunomoduladora, com baixa toxicidade em linfócitos de camundongos testados. Outros derivados desse grupo demonstraram toxicidade em *Leishmania amazonenses*, onde os autores sugerem esses compostos como potentes agentes leshmanicida e imunomodulador (RODRIGUES et al. 2011).

Da mesma forma, Galuppo et al. (2016) observaram efeito citotóxico antitumoral in vivo de um derivado mesoiônico, Syd-1 (75mg/Kg) apesar disso, na análise de parâmetros hematológicos, o composto não apresentou toxicidade em linfócitos e leucócitos dos animais tratados.

Tendo em vista que o composto tem se mostrado eficiente nos testes já realizados, inclusive de acordo com os parâmetros determinados pela NCI para estudos de novas possibilidades na terapia anticâncer, os trabalhos com o MI-2 continuarão, especialmente, para avaliação mais detalhada em linfócitos e esplenócitos de ratos. Pois, mesmo que os modelos murinos não possam ser diretamente extrapolados para os humanos, a oncologia atual ainda tem como base o conhecimento obtido com tais modelos.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos com a linhagem HL-60, nos testes de citotoxicidade, análise morfológica e fragmentação do DNA; bem como citotoxicidade em células mononucleares de ratos, pode-se observar que o composto MI-2 apresenta-se como um possível fármaco na terapia anticâncer,

demonstrando potencial antitumoral e baixa toxicidade em linfócitos de ratos. Ainda assim, outros testes precisam ser realizados com fins de complementação dos resultados já obtidos, para permitir que o composto avance da fase pré-clínica até a fase clínica de testes.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A.; AGARWAL U.; VERMA, S.; MOHANTY, N. K., SAXENA, S. Serum Th1 and Th2 cytokine balance in patients of superficial transitional cell carcinoma of bladder pre- and post-intravesical combination immunotherapy. *Immunopharma. Immuno T.* 32, 348-356. 2010.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. *Molecular Biology of the Cell.* USA 2004.

ALLEY, M. C.; SCUDIÈRE, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D. L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research.* 48: 589-601. 1988.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology.* 88: 261-274. 2003.

ANDERZHANOVA, E. et al. Effects of sydnocarb and D-amphetamine on the extracellular levels of amino acids in the rat caudate-putamen. *European Journal of Pharmacology, Amsterdã,* v. 428, n. 1, p. 87–95, 2001.

ATHAYDE-FILHO, P. F.; SIMAS, A.M.; MILLER, J.; CHIAPETA, K.X. Synthesis characterization and evaluation of the activity of ten mesoionic compounds against microorganism. *ActaFarmaceuticaBonaerense, Argentina,* v.18, n.1, p.17, 1999.

BADAMI, B. V. Mesoionic Compounds – Na unconventional class of aromatic heterocycles. *Resonance.* 2006.

BALABAN, A.T.; ONICIU, D. C.; KATRITZKY, A. R. Aromaticity as a Cornerstone of Heterocyclic Chemistry. *Chemical Reviews*, v. 104, n. 5, p.2777-2812, 2004.

BERTÃO, H.G.; SILVA, R.A.R.; BAPTISTA G.R.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A. Miltefosine, na alkylphosphocholine originally developed as an antitumoral, ia an affective compound against *Schistosoma mansoni*. *Molecules*. 1: 7-21. 2012.

BETTS, D.H., KING, W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology*, Los Altos, v.55, n.1, p.171-91, 2001.

BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Ministério da saúde. Acesso em 18 de setembro de 2020. Disponível em <https://www.inca.gov.br/>

BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Ministério da saúde. Acesso em 01 de outubro de 2020. Disponível em <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>

BRASIL. Ministério da Saúde. Acesso em 02 de setembro de 2020. Disponível em <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/cancer>

BROOKES, P.; WALKER, J. *Journal of the Chemical Society*, v. 4409, 1957.

COOPER, W. A.; LAM, D. C. L.; O'TOOLE, S. A.; MINNA, J. D.; Molecular biology of lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*. v.5. 2013.

CORTES, S., LIAO, Z.K., WATSON, D.; KOHN H. Effect of structural modification of the hydantoin ring on anticonvulsant activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, Washington, v.28, n.5, p. 601-606, 1985.

COSTA, L. A. M.; HARMON, A. C.; TEIXEIRA, A. A. C.; LIMA, F. C. S. L.; ARAÚJO, S. S.; PIERO, F. D.; SOUZA, H. D. S.; FILHO, P. F. A.; JUNIOR, S. A.; MAIA, M. M. D.; WISCHRAL, A.; FILHO, M. A. G.; MATHIS, J. M. Cytotoxic activity of the mesoionic compound MIH 2.4BI in breast cancer cell lines. *Breast cancer: basic and clinical research*. v. 14. 2020.

DELCUVE, G. P.; RASTEGAR, M.; DAVIE, J. R. Epigenetic control. *Journal of Cellular Physiology*. 2009.

DESHPANDE, S. R.; PAI, K. V. Synthesis and biological activities of certain mesoionicsydnone compounds containing chalcone moiety. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, v. 001, n. 003, p. 147–152, 2010.

DHILLON, AS.; HAGAN, S.; RATH, O.; KOLCH, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. Nature publishing group. 2007.

DUBEY, et al. Study of mesoionic compounds: synthesis and pharmacological evaluation of several 2-[[94-Substituted-1-sulphonyl) Sydnon-2-yl]]-1,3,4-thiadiazino(6,5-b)índoles as antimicrobial, insecticidal and antihelminticagentes. *Oriental Journal of Chemistry*, v. 30, n. 1, p. 271–278, 2014.

DUNKLEY, C. S.; THOMAS, C. J. Synthesis and biological evaluation of a novel phenyl substituted sydnone series as potential antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Oxford, v. 13, n. 17, p. 2899–2901, 2003.

EUA. National Cancer Institute (NCI). https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/methodology.htm . Acesso em 26 de março de 2019.

EUA. National Cancer Institute (NCI). <https://www.cancer.gov/types/aya>. Acesso em 9 de outubro de 2020.

EUA. National Cancer Institute (NCI). <https://www.cancer.gov/research/annual-plan/scientific-topics/what-is-drug-resistance-infographic>. Acesso em 17 de outubro de 2020.

FERREIRA, W. S.; LIMA, L. F.; SARAIVA, V. B.; SILVA, F. A.; PREVIATO, L. M.; PREVIATO, J. O.; ECHEVARRIA, A.; LIMA, M. E. F. Novel 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides derived from natural piperine as trypanocidal agents: Chemical and biological studies, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.16, p. 2984–2991, 2008.

FILHA, M. P. A. J.; Síntese, caracterização e avaliação biológica de novos compostos mesoiônicos de núcleo 1,3,4-tiadiazólio-5-tiolato e seus derivados ftalimidínicos. 2006. 101 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

GALUPPO, L. F.; LÍVERO, F. A. R.; MARTINS, G. G.; CARDOSO, C. C.; BELTRAME, O. C.; KLASSEN, L. M. B.; CANUTO, A. V. S.; ECHEVARRIA, A.; TELLES, J. E. Q.; KLASSEN, G.; ACCO, A. Sydnone 1: A mesoionic Compound with Antitumoral and Haematological Effects *In Vivo*. *Basic and Clinical Pharmacology & Toxicology*. v.119, 2016.

GOLD, R.; SCHMIED, M.; ROTHE, G.; ZISCHLER, H.; BREITSCHOPF, H.; WEKERLE, H.; LASSMANN, H. Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 41: 1023–1030. 1993.

GOZZI, G. J.; PIRES, A. R. A.; VALDAMERI, G.; ROCHA, M. E. M.; MARTINEZ, G. R.; NOLETO, G. R.; ACCO, A.; SOUZA, C. E. A.; ECHEVARRIA, A.; REIS, C. M.; PIETRO, A. D.; CADENA, S. M. S. C. Selective Cytotoxicity of 1,3,4- thiadiazolium Mesoionic Derivates on Hepatocarcinoma Cells (HepG2). *PLOS ONE*. 2015.

GRYNBERG, N. et al. Some new aryl-sydnones: effects on murine tumours. *Anticancer Research, Atenas*, v. 12, n. 3, p. 1025–1028, 1992.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A.; Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. v.144. 2011.

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

HWANG, M. S., BAEK, W. K. Glucosamine induces autophagic cell death through the stimulation of ER stress in human glioma cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 399, n. 1, p. 111-116, 2010.

JAIN, A. K. et al. 1,3,4-thiadiazole and its derivatives: a review on recent progress in biological activities. *ChemicalBiology & Drug Design*, v. 81, n. 5, p. 557-76, 2013.

KAWASE, M.; SAKAGAMI, H.; MOTOHASHI, N. The Chemistry of Bioactive Mesoionic Heterocycles. Springer-Verlag. 2007.

KNUDSON, A. G.; Antioncogenes and human cancer. Institute for Cancer Research. Fox Chase Cancer Center. Philadelphia. v.90, pp. 10914-10921, 1993.

KOSONEN, O.; KANKAANRANTA, H.; VUORINEN, P.; MOILANEN, E. Inhibition of human lymphocyte proliferation by nitric oxide-releasing oxatriazole derivates. European Journal of Pharmacology. 1997.

LI, Y.; GENG, J.; LIU, S.; ZHA, G. Thiadiazole – A promising structure in medicinal chemistry. ChemMedChem, v.8, p.27-41, 2013.

LIMA, C. A. Caracterização bioquímica de lesões neoplásicas via espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier. 2015. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologias Nuclear- Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo.

LIMA, H. C.; Fatos e Mitos sobre imunomoduladores. Educação Médica Continuada. 2007.

LIN, S.; MAKOTO, F.; DE-XING, H. Rhein induces apoptosis in HL-60 cells via reactive oxygen species-independent mitochondrial death pathway. Archives of Biochemistry and Biophysics. 418: 99-107. 2003.

LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Molecular mechanism of drug resistance. Journal of Pathology. 205, 275-292. DOI: 10.1002/path. 1706. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/path.1706>. Acesso em 17 de outubro de 2020. 2005.

MACÊDO, J. L. Avaliação do potencial antineoplásico dos compostos mesoiônicos MIH 2.4 BL e MIH 2.Zn, pertencentes ao grupo Tiolato, e seus possíveis mecanismos de ação. 2017. 123f. (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

MATYSIAK, J. Synthesis and antiproliferative activity of N-substituted 2-amino- 5-(2,4- dihydroxyphenyl)-1,3,4-thiadiazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 13, p. 4483-4489, 2006.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*.65: 55-63. 1983.

NAGATA, S. Apoptotic DNA Fragmentation. Japão, 2000.

NUNES, N.; MASSONE, F.; POMPERMAYER, L. G.; JOSMARI, P.; CAMACHO, A. A. Atividade antiaritmogênica da levomepromazina em cães submetidos à anestesia pela quetamina. *Ciência Rural*, v.29, n. 2, 1999.

OLIVEIRA, C.S.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; HARDING, D.P.; LIRA, B.F.; LORENZO, J.G.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ATHAYDE-FILHO, P.F. Drug Resistance Modulation in *Staphylococcus Aureus*, a New Biological Activity for Mesoionic Hydrochloride Compounds. *Molecules*, v.16, p.2023-2031, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Cancer. 2020.

PAIVA, et al. Mesoionic compounds with antifungal activity against *Fusarium verticillioides*. *BMC Microbiology*, v. 15, n. 11, p. 1–8, 2015.

PRIMO, L. M. F.; TEIXEIRA, L. K.; DNA replication stress: oncogenes in the spotlight. *Genetics and molecular biology*. V.43. n.1. 2020.

RICHA, R. P. R.; SINHA, R. P. Molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI Journal*. 2009.

RODRIGUES, R. F.; CHARRET, K. S.; CAMPOS, M. C.; AMARAL, V.; ECHEVARRIA, A.; REIS, C.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; LEON, L. L. The *in vivo* activity of 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide compounds in the treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 67, 182-190. 2011.

SCHULZ, W. A.; Molecular biology of human cancers – An advanced student's textbook. Ed. Springer. p. 17-21, 2007.

SEFFF-RIBEIRO, et al. Cytotoxic effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on cell lines of human melanoma. *British Journal of Cancer*, v. 91, p. 297–304, 2004.

SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G.; *Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer*. *Ciência e Cultura*. V.66. n.1. São Paulo. 2014

SOTTO-MAYOR, R.; *Biologia do câncer de pulmão: uma atualização*. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. v. 8, p. 655-679, 2002.

SOUZA, P. R. E.; SILVA, H. D. A.; LEITE, F. C. B.; MAIA, M. M. D.; GARCIA, A. C. L.; MONTES, M. A. *Genética geral para universitários*. 1. ed. Recife: Editora Universitária da UFRPE, cap.1, p. 13-24, 2015.

SZELIGA, M. *Thiadiazole derivatives as anticancer agents*. *Pharmacological reports*. Springer. 2020.

VANNEMAN, M.; DRANOFF, G. *Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment*. *Nature Reviews Cancer*, v. 12, p. 237-251, 2014.

VASIEVICH, E. A.; HUANG, L. *The suppressive Tumor Microenvironment: A Challenge in Cancer Immunotherapy*. *Molecular Pharmaceutics*. United States, 2011.

VIDA, J. A. et al. *Anticonvulsants*. 5. *Derivates of 5-ethyl-5-phenylhydantoin and 5, 5-diphenylhydantoin*. *Journal of Medicinal Chemistry*, Washington, v. 18, n. 4, p. 383–385, 1975.



WERBEL, L. M. et al. *Antischistosomal effects of 5-(2, 4, 5-trichlorophenyl) hydantoin and related compounds*. *Journal of Medicinal Chemistry*, Washington, v. 20, n. 12, p. 1569–1572, 1977.


WU, T; DAI, Y. *Tumor microenvironment and therapeutic response*. *Cancer Letters*, v. 387, p. 61-68, 2017.

ZAFAR, S. Y.; PEPPERCORN, J. M.; SCHRAG, D.; TAYLOR, D. H. GOETZINGER, A. M.; ZHONG, X.; ABERNETHY, A. P. *The financial toxicity of cancer treatment: A pilot Study Assessing Out-of-Pocket Expenses and the Insured Cancer Patient's Experience*. *The Oncologist*. *Economics of Oncology Practice*. 2013.

ZAMARRON, B. F.; CHEN, W. Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Development and Progression. International Journal of Biological Sciences. 7(5), p. 651-658, 2011.

9 ANEXOS

 UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE		 CEUA - UFRPE Aprovado em 21/08/2019 Validade 21/08/2021
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA F - 02 Licença para o uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.		
Número da licença	106/2019	
Número do processo	23082.011050/2019-73	
Data de emissão da licença	21 de agosto de 2019	
Título do Projeto	Avaliação da atividade imunomoduladora do composto mesoiônico 5-(4-clorofenil)-3-metil-4-fenil-1,3-tirazolio-2-tiolato (MI-2), e seu análogo acoplado ao zinco.	
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão).	Pesquisa	
Responsável pela execução do projeto	Elayne Cristine. Soares da Silva	
Colaboradores	Bárbara Fernanda Pessoa de Andrade, Jaqueline Moura do Nascimento, Jeyce Kelle Ferreira de Andrade, Manoel Adrião Gomes Filho	
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Rato heterogênico macho 20, fêmea 20. Total; 40	


 Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza - SIAPE - 1.929.164
 (Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA /UFRPE)