



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Patricia Marçal da Costa

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL E ANTIANGIOGÊNICO DE
NOVOS ANÁLOGOS FTALIMÍDICOS DA TALIDOMIDA

FORTALEZA-CE

2011

Patricia Marçal da Costa

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL E ANTIANGIOGÊNICO DE
NOVOS ANÁLOGOS FTALIMÍDICOS DA TALIDOMIDA.**

Tese submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia
Pessoa**

Fortaleza

2011

Apoio Técnico e Financeiro

Universidade Federal do Ceará

Universidade Federal de Pernambuco

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -CAPES

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa – FUNCAP

Banco do Nordeste do Brasil - BNB

Instituto Claude Bernard – InCb

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

C875a Costa, Patricia Marçal da
Avaliação do potencial antitumoral e antiangiogênico de novos análogos ftalimídicos da talidomida/ Patrícia Marçal da Costa. - 2011.
147 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2011.
Orientação: Profa. Dra. Cláudia Pessoa

1. Talidomida 2. Inibidores da Angiogênese 3. Tiossemicarbazida 4. Neoplasias
I. Título.

CDD 615.1

Patricia Marçal da Costa

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL E ANTIANGIOGÊNICO DE
NOVOS ANÁLOGOS FTALIMÍDICOS DA TALIDOMIDA.**

Tese submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Data da aprovação: 09/12/2011

BANDA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Cláudia Pessoa (orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fachine Jamaru
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira
Universidade Federal do Piauí

Prof.^a Dr.^a Marcília Pinheiro da Costa
Universidade Federal do Ceará

Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Lima Leite
Universidade Federal do Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Eu Agradeço:

À Deus pela oportunidade de aumentar minha fé, frente aos desafios trilhados durante a produção deste trabalho.

Aos meus pais e irmãos pelo incentivo, compreensão e apoio familiar imprescindível. Em especial à minha mãe que sempre me auxiliou fazendo as vezes de mãe dos meus filhos, num esforço que sei, ir muito além de um simples favor, mas uma prova de amor.

Aos meus filhos, minhas valiosas produções não científicas, pelo brilho nos olhos estimulador e compreensão nos momentos de ausência.

À professora e amiga Dra. Cláudia Pessoa que me recebeu no Laboratório de Oncologia Experimental e me ofereceu a oportunidade inicial, acreditando no meu potencial mesmo sem me conhecer. Muito obrigada pelo incentivo inovador e relevante apoio, sempre, espero não ter lhe dado tanto trabalho!

Aos professores Manoel Odorico de Moraes e Letícia Lotufo pela oportunidade, apoio, ensinamentos e amizade durante toda minha pós-graduação no LOE;

Ao professor Dr. Vagnaldo Fachine, pela co-orientação e por ter me apresentado aos pormenores da encantadora área da angiogênese experimental, pela dedicação, colaboração e amizade;

Às professoras Dra. Conceição Dornelas e Dra. Ana Paula Negreiros pelas dicas valiosas, dedicação e apoio técnico nos experimentos de imunohistoquímica; bem como ao Dr. Valdeci por ter cedido, além de suas instalações para a realização deste experimento, toda sua sabedoria científica.

Aos professores Roberto César, Márcio Pereira e Cláudia pelo auxílio e dedicação na decifragem dos experimentos de atividade imunomodulatória;

À empresa CIALNE® pelo fornecimento dos ovos usados no ensaio da membrana corioalantóide e aos estudantes de iniciação científica Rafael Sucupira, Mariana Maia e Vanessa Canamary pelo auxílio experimental durante os procedimentos, bem como Miller Barreto, Igor Cabral, Sérgio Barros e Deisy Lima.

Ao Dr. Heitor de Sá Gonçalves, chefe do Centro Dermatológico do Hospital Dona Libanha, pela doação dos comprimidos de Talidomida.

Às minhas “maridas” **Gabriela Cunha** (terra) e **Aline Martins** (água) pela preciosa amizade e companheirismo nos momentos de saúde e doença, alegria e tristeza, riqueza e pobreza, como manda o figurino. OBS: eu sou o céu...rs.

Ao grande amigo **Prof. Dr. Paulo Michel**, pela parceria e empatia gerada desde os tempos de “bichos da pós-graduação” quando ele, recém vindo de Milhã, então redescobriu a molécula do óxido nítrico na aula do professor Ronaldo. Pela honra em participar de suas publicações científicas e pela realidade cotidiana sempre demonstrada através de seu adorável humor negro.

Aos companheiros de jornada e amigos do LOE, **Washington Araújo**, “o homem com o coração maior que o corpo”, **Felipe Rocha**, “macho alfa do LOE”, **Bruno Coelho**, sempre uma ótima companhia para eventuais visitas ao Pirão, logicamente regadas de opiniões científicas de grande valia para esta tese, **Danilo Rocha**, presente descoberto desde os tempos da graduação, **Adriana Carvalho**, companheira de HUVECs e outras batucadas, **Delano** e “**Jérsica**”, **Paula Abreu**, **Paula Jimenez**, **Diego Veras**, **Bruno Soares** (tão querido...), até hoje não sei como te pagar... **Arinice**, **Eveline**, **Cecília** e **Assuero** “slave”, para os que possuem dificuldades de dicção, **Ojuara** ou **Mansueto**, a melhor aquisição de 2011. **Meus amigos**, todos vocês são extremamente competentes e merecem sim um lugar ao sol.

A amiga **Aline Sbardelotto** vinda de “Brasília”, pelo incentivo, dedicação e apoio técnico e moral nas horas de aflição durante os experimentos da membrana corioalantóide e imunohistoquímica.

Aos antigos e não por isso, caídos no esquecimento “Loeanos”, **Carla Sombra**, **Ivana Dantas**, **Gardênia Militão**, **José Roberto**, **Daniel Pereira**, **Hemerson Iury**, **Kristiana Mousinho**, **Marne Vasconcelos** e **Raquel Montenegro**.

Às preciosas técnicas e colaboradoras: **Silvana França**, **Socorro França**, **Erivanda França**, **Eveline**, **Adelânia**, “**Sheila/Maria Clara**”, **Rogéria** e **Gracinha** pelo apoio “emocional-técnico-científico”. Aos funcionários da Secretaria do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, **Áurea Rhanes**, **Márcia** e **Rômulo**, pelo apoio técnico e facilitador.

Aos componentes da família **Braga Aires**, em especial “**Tony**”, por me receberem como uma “dos seus” e me reforçarem os valores familiares aprendidos com meus pais que tanto almejo para meus filhos. Vocês são um exemplo!

Enfim, à todos, o meu muito, mas muito, obrigada!

*“A mente que se abre para uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

RESUMO

A talidomida, anteriormente usada para aliviar desconfortos gástricos da gravidez, atualmente é usada para tratamento do câncer e de doenças inflamatórias. Vários análogos ftalimídicos da talidomida tem sido pesquisados quanto a sua atividade antiangiogênica e imunomodulatória. Em estudos prévios, estes análogos mostraram ausência de atividade imunossupressora. O trabalho determinou, inicialmente, a atividade citotóxica, de oito análogos ftalimídicos da talidomida, frente a linhagens tumorais e de células mononucleadas isoladas de sangue periférico (CMSP) após 72h de incubação. Nenhum dos compostos desencadeou atividade citotóxica *in vitro*, indução de hemólise em eritrócitos e potencial em induzir dano à fita de DNA, portanto não foram genotóxicos em CMSP humanas. O efeito antitumoral (*in vivo*) da talidomida e dos oito análogos foi analisado em camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180 e tratados na dose 50mg/Kg/7 dias, via i.p. A inibição do crescimento tumoral foi significativa apenas para talidomida (53,5%) e análogos SC-10 e SC-11 (67,9% e 67,4%, respectivamente), $p < 0,05$. A análise histopatológica dos órgãos dos animais mostrou que a talidomida e seus análogos provocam efeitos tóxicos moderados, principalmente no fígado, mas esses podem ser considerados como reversíveis. Os estudos acerca do mecanismo de ação foram aprofundados usando células isoladas do Sarcoma 180, após 72 horas de incubação, nas doses de 10, 50 e 100 μ g/mL, por citometria de fluxo, através dos seguintes ensaios: 1- Avaliação da integridade de membrana, viabilidade celular e concentração de células; 2- Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula. Todos os compostos induziram a perda de integridade de membrana celular e fragmentação internucleossomal do DNA nas maiores concentrações, indicando presença de células apoptóticas em estágios finais ou em processo de necrose secundária. A avaliação do potencial antiangiogênico, pelo ensaio do *Wound Healing* revelou que para a linhagem endotelial (HUVEC) o análogo SC-10 causou uma inibição maior (65,28% \pm 1,58), enquanto que na linhagem tumoral o efeito maior foi do análogo SC-11 (98,51% \pm 0,25). A talidomida não foi capaz de reduzir a migração celular em nenhuma das linhagens testadas. No ensaio da membrana corioalantóide (CAM), potencial antiangiogênico foi observado para os análogos SC-10 e SC-11 (5mg/mL), que inibiram o número de vasos (12, 88% \pm 2,3 e 14,81% \pm 3,3), a área de neovascularização (13,14% \pm 1,7 e 14,26% \pm 1,7) e o comprimento total de vasos em mm² (9,19% \pm 1,5 e 9,86% \pm 1,9). A talidomida, não foi capaz de inibir a vascularização embrionária. O efeito antitumoral (*in vivo*) da talidomida e análogos SC-10 e SC-11 foi analisado em camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180, tratados na dose 50mg/Kg/10 dias, via i.p. A inibição do crescimento tumoral para a talidomida (56.6%) e para os análogos SC-10 e SC-11 (48,2% e 41,3%, respectivamente), $p < 0,05$. A imunocoloração de células endoteliais intratumorais com CD-31, revelou-se, na forma de densidade microvascular, diminuída nos grupos tratados com análogos SC-10 e SC-11 (64,59% e 46,51%), mas não nos grupos tratados com a talidomida. Estes resultados, unidos a estudos prévios de imunomodulação sugerem imunidade antitumoral e antiangiogênica, dependente de células T, para os análogos ftalimídicos.

Palavras-chave: Talidomida; Inibidores da Angiogênese; Tiossemicarbazida; Câncer.

ABSTRACT

TITLE: EVALUATION OF THE ANTITUMOR AND ANTIANGIOGENIC POTENTIAL OF NEW FTALIMIDES THALIDOMIDE ANALOGUES.

The thalidomide was previously used to relieve gastric discomforts during pregnancy, and currently it is used for cancer treatment and inflammatory illnesses. Various phthalimides analogues of thalidomide have been researched for its antiangiogenic and immunomodulatory activity. In previous studies, these analogues showed absence of immunosuppressor activity. In this context, this work initially determined the cytotoxic activity of eight phthalimides analogues of thalidomide, in a series of cancer cell lines and of isolated peripheral mononuclear blood cells (PMBC) after 72h of incubation. None of compounds revealed cytotoxic activity *in vitro* in cancer cell lines and hemolytic activity towards of PBMC. They also showed no potential damage to the DNA strand, therefore they were not considered genotoxic towards human PMBC. The antitumor effect (*in vivo*) of thalidomide along with eight analogues was analyzed in mice transplanted with the Sarcoma 180 tumor and treated in a dose of 50mg/Kg/7 days, i.p. The inhibition of the tumor growth was only significant in mice treated with thalidomide (53.5%) and the analogues SC-10 and SC-11 (67.9% and 67.4%, respectively), $p < 0,05$. The histopathological analysis of the animals' organs showed mainly that thalidomide and its analogues cause moderate toxic effects, mostly in the liver, but these can be considered reversible. The studies concerning the mechanism of action were deepened using isolated cells from the Sarcoma 180, after 72 hours of incubation, in the doses of 10, 50 and 100 μ g/mL. The following flow cytometry assays were carried out: 1- Evaluation of the membrane integrity, cellular viability and concentration of cells; 2- Determination of the nuclear DNA content. All the compounds led to the loss of membrane cell integrity and it was found internucleosomal DNA fragmentation in the higher concentrations, indicating the presence of cells with late stage apoptotic characteristics or in the process of secondary necrosis. The evaluation of the antiangiogenic potential, with the Wound Healing assay revealed that for the endothelial cell line (HUVEC) the analogue SC-10 caused a greater inhibition (65.28% \pm 1,58), whereas in the tumor cell line the highest effect was of the analogue SC-11 (98.51% \pm 0,25). The thalidomide was not capable of reducing cellular migration in none of the tested cell lines. In the chorioallantoic membrane assay (CAM), an antiangiogenic potential was observed with analogous SC-10 and SC-11 (5mg/mL), where there was an inhibition in the number of vessels (12, 88% \pm 2,3 and 14.81% \pm 3,3), the area of neovascularization (13.14% \pm 1,7 and 14.26% \pm 1,7) and the total length of vessels in mm² (9.19% \pm 1,5 and 9.86% \pm 1,9). The thalidomide was not capable of inhibiting embryonic vascularization. The antitumor effect (*in alive*) of thalidomide and the analogues SC-10 and SC-11 was analyzed in mice transplanted with the Sarcoma 180 tumor, treated with the dose of 50mg/Kg/10 days, i.p. It was observed inhibition of the tumor growth in the thalidomide treatment (56,6%) and for analogues SC-10 and SC-11 (48.2% and 41.3%, respectively), $p < 0,05$. The immunostaining of intratumor endothelial cells with CD-31, showed, in the form of microvascular density, reduction in the groups treated with analogues SC-10 and SC-11 (64.59% and 46.51%), but not in the groups treated with thalidomide. These results, along with previous studies of immunomodulation suggest antitumor and antiangiogenic immunity, T cells dependent, for the phthalimides analogues.

Keywords: Thalidomide; Angiogenesis Inhibitors; Thiosemicarbazones; Cancer.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Analysys of Variance (Análise de Variância)
CAM	Membrana Coriolantóide
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMV	Densidade Microvascular
EGF/EGFR	Fator de Crescimento Epidermal/ Receptor
E.P.M.	Erro Padrão da Média
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FGFb	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
HTS	High Throughput Screening
IC₅₀	Concentração Inibitória Média
ICAM	Molécula de Adesão Intracelular
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IL	Interleucina
INF	Interferon
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
NO	Óxido Nítrico
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PECAM-1	Molécula de Adesão Celular Plaquetária Endotelial
pH	Potencial Hidrogênionico
RPMI	Roswell Parrk Memorial Institute Medium
SAMM	Sistema de Análise Morfométrica
SQAN	Sistema de Quantificação de Angiogênese
US-NCI	United States National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
VCAM	Molécula de Adesão Celular Vascular
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

LISTA DE FIGURAS

1:	Estabelecimento do processo da vasculogênese embrionária.....	19
2:	Estabelecimento da angiogênese tumoral.....	21
3:	<i>The Hallmarks of Cancer</i> . Adaptado de HANAHAN e WEIBERG, 2011.....	23
4:	Membrana corioalantóide de embrião de galinha.....	29
5:	Estrutura da alfa-N-(ftalidomida) glutarimida [C13 O4 N2 H9], talidomida.....	30
6:	Principais efeitos imunomodulatórios da Talidomida.....	35
7:	Estrutura química da Talidomida, enfatizando o grupamento farmacofórico Ftalimida.....	36
8:	Estrutura genérica de semicarbazonas e tiosemicarbazonas.....	37
9:	Desenho experimental da Tese.....	43
10:	Estrutura genérica de 4-tiazolinonas, tiosemicarbazonas, ftalimidas e a estrutura química da Talidomida.....	45
11:	Esquema de hibridização molecular para obtenção dos análogos ftalimídicos.....	46
12:	Obtenção das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) por meio de gradiente de densidade estabelecido pelo Ficoll®-Hypaque.....	48
13:	Padrão de dano ao DNA para o ensaio cometa.....	57
14:	Sistema de incubação para ovos férteis, modelo IP-35.....	63
15:	Imagens da membrana corioalantóide após injeção da solução de tinta branca.....	64
16:	Telas iniciais do SQAN. O operador interage com o sistema ativando botões apropriados. Adaptado de FECHINE-JAMACARU, 2006.....	66
17:	Fases de pré-processamento, segmentação e pós-processamento do SQAN.....	67
18:	Fase final da análise do SQAN.....	68
19:	Anticorpos primários e secundários usados na imunohistoquímica.....	70
20:	Rim de rato imunocorado com capilares glomerulares marcados por anti- PECAM-1 (anti-CD31) controle positivo – aumento de 400 x.....	71
21:	Ambiente do <i>software</i> SAMM.....	73
22:	Histologia dos tumores Sarcoma 180 removidos dos camundongos submetidos ao tratamento de sete dias com os análogos ftalimídicos e a talidomida.....	80
23:	Fotomicrografia mostrando as principais alterações histológicas renais.....	82
24:	Fotomicrografia mostrando as principais alterações histológicas esplênicas.....	83

25:	Fotomicrografia mostrando as principais alterações histológicas hepáticas.....	84
26:	Efeito da talidomida e dos análogos 10 e 11 sobre a densidade celular em cultura primária de Sarcoma 180, analisada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 72 horas de incubação.....	86
27:	Efeito da talidomida e dos análogos 10 e 11 sobre a integridade de membrana celular da cultura primária de Sarcoma 180, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 72 horas de incubação.....	87
28:	Efeito da talidomida e dos análogos 10 e 11 sobre a fragmentação de DNA em células da cultura primária de Sarcoma 180, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 72 horas de incubação.....	88
29:	Efeito da talidomida e seus análogos sobre a proliferação de células endoteliais humanas (HUVEC), antes e depois da adição dos compostos (50µg/mL).....	90
30:	Efeito da talidomida e seus análogos sobre a proliferação de células tumorais humanas (MDA MB-435), antes e depois da adição dos compostos (50µg/mL).....	91
31:	Efeito da talidomida e dos análogos 10 e 11 sobre a migração celular no ensaio <i>Wound Healing</i> , 24 horas após adição dos compostos, (50 µg/mL).....	92
32:	Efeito da talidomida e dos análogos 10 e 11 sobre a angiogênese embrionária, no ensaio da membrana corioalanoide (CAM) <i>in ovo</i> , 24 horas após adição dos compostos, (5mg/mL).....	94
33:	Fotografia de uma zona quente (<i>hot spot</i>) obtida no microscópio de inversão com auxílio do programa AXION VISION.....	96
34:	Comparação da densidade microvascular entre os grupos tratados com a talidomida e seus análogos.....	99

LISTA DE TABELAS

1:	Exemplos de inibidores de Cinases usados na terapia antiangiogênica atual. Adaptado de COOK e FIGG, 2010.....	26
2:	Células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade e/ou genotoxicidade.....	47
3:	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> da Talidomida e seus análogos sintéticos. Ensaio do MTT usando células tumorais.....	76
4:	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> da Talidomida e seus análogos sintéticos. Ensaio do <i>Alamar Blue</i> usando células de cultura primária – <i>Sarcoma 180</i> e <i>CMSP</i>	77
5:	Efeito da talidomida e seus análogos ftalimídicos na doses de 50 mg/Kg/dia i.p. sobre a proliferação tumoral de camundongos (<i>Mus musculos</i>) Swiss transplantados com <i>Sarcoma 180</i> , após 7 dias de tratamento.....	79
6:	Avaliação do potencial genotóxico da talidomida e dos análogos SC-10 e SC-11 em <i>CMSP</i> humanas (células mononucleares do sangue periférico) pelo ensaio do cometa, após 24 h de incubação.....	85
7:	Efeito da talidomida e seus análogos ftalimídicos na doses de 50 mg/Kg/dia i.p. sobre a proliferação tumoral de camundongos (<i>Mus musculos</i>) Swiss transplantados com <i>Sarcoma 180</i> , após 10 dias de tratamento.....	96
8:	Densidade Microvascular pela densidade de área das três zonas quentes, eleitas para cada lâmina/tumor, calculada pelo SAMM.....	98

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Angiogênese: conceitos e fisiopatologia.....	18
1.2	O câncer e a terapia antiangiogênica.....	22
1.3	Vascularização relacionada ao desenvolvimento tumoral e seus métodos de detecção.....	26
1.4	Talidomida: passado e presente.....	31
1.5	Análogos ftalimídicos como importantes protótipos de fármacos antitumorais imunomoduladores e antiangiogênicos.....	36
2	OBJETIVOS.....	40
2.1	Geral.....	41
2.2	Específicos.....	41
2.2.1	<i>Ensaio in vitro.....</i>	41
2.2.2	<i>Ensaio in vivo.....</i>	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
	Desenho Experimental.....	43
3.1	Materiais Utilizados.....	44
3.2	Metodologia Experimental.....	44
3.2.1	<i>Obtenção da talidomida e dos análogos ftalimídicos.....</i>	44
3.2.2	<i>Avaliação da atividade citotóxica in vitro.....</i>	47
3.2.2.1	<i>Atividade antiproliferativa em células tumorais humanas – Teste do MTT.....</i>	49
3.2.2.2	<i>Atividade antiproliferativa em células Sarcoma 180 e células mononucleares do sangue periférico – Ensaio do Alamar Blue.....</i>	50
3.2.2.3	<i>Atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos swiss (mus musculus).....</i>	51
3.3	Avaliação da atividade antitumoral in vivo em camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	52

3.4	Ensaio do cometa.....	55
3.5	Estudos por citometria de fluxo com células de Sarcoma 180.....	58
3.5.1	<i>Verificação de viabilidade e morfologia celular.....</i>	58
3.5.2	<i>Análise de conteúdo e fragmentação de DNA.....</i>	59
3.6	Avaliação do potencial antiangiogênico.....	60
3.6.1	<i>Teste de migração com células endoteliais - Ensaio de Wound Healing.....</i>	60
3.6.2	<i>Ensaio de angiogênese na membrana corioalantóide de embrião de galinha</i>	61
3.6.3	<i>Avaliação molecular da angiogênese tumoral por imunohistoquímica.....</i>	68
4	RESULTADOS.....	74
4.1	Estudo da Atividade Citotóxica.....	75
4.1.2	<i>Atividade antiproliferativa in vitro em células tumorais humanas - Teste do MTT.....</i>	75
4.1.3	<i>Atividade antiproliferativa in vitro em células Sarcoma 180 e Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) - Teste do Alamar Blue.....</i>	76
4.2	Atividade hemolítica em eritrócitos de camundongo Mus músculos swiss.....	77
4.3	Avaliação da atividade antitumoral da talidomida e seus análogos em camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	77
4.3.1	<i>Análise histopatológica dos órgãos.....</i>	81
4.4	Avaliação do potencial genotóxico em células mononucleadas de sangue periférico (CMSP): Ensaio do Cometa.....	85
4.5	Estudos por citometria de fluxo.....	85
4.5.1	<i>Integridade de membrana celular e concentração de células por citometria de fluxo.....</i>	86
4.5.2	<i>Análise de fragmentação de DNA.....</i>	88
4.6	Ensaio de migração de células endoteliais – Wound Healing.....	89
4.7	Ensaio de angiogênese na membrana corioalantóica do embrião de galinha...	93
4.8	Avaliação da angiogênese por imunohistoquímica.....	95

5	DISCUSSÃO.....	100
5.1	Considerações Finais.....	115
6	CONCLUSÃO.....	117
7	REFERÊNCIAS	118
8	ANEXOS.....	130

1. INTRODUÇÃO

1.1 Angiogênese: conceitos e fisiopatologia

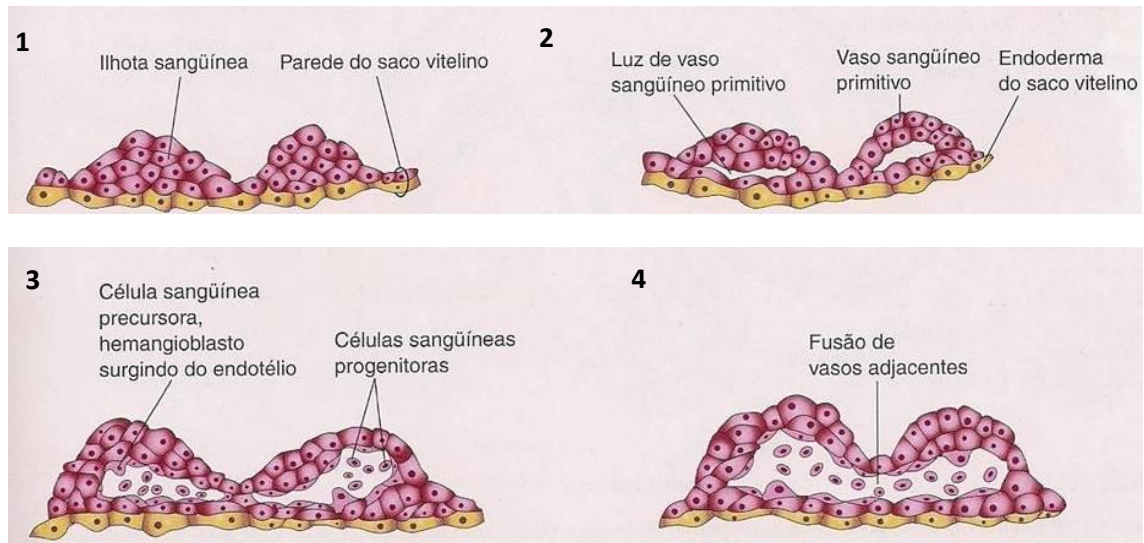
Câncer (do grego *karkinos* – caranguejo) é um termo que descreve um conjunto de mais de uma centena de doenças, que apresentam em comum a proliferação desordenada e a incapacidade de diferenciação celular normal. A progressão tumoral é o processo pelo qual as células adquirem características de malignidade, como crescimento progressivo, invasão e formação de metástases (NOWELL, 1986).

Tumores crescem e desenvolvem metástases por meio da formação de vasos sanguíneos (neovangiogênese). Um banco de dados desenvolvido nas últimas três décadas documenta que as investigações sobre os mecanismos envolvidos na angiogênese patológica converteram-se em uma abordagem potencialmente importante na terapia do câncer (HANAHAH; FOLKMAN, 1996; CALIXTO; CABRINI, 1997). A busca por diretrizes voltadas ao aprimoramento de terapias não convencionais passa pelo entendimento das diferenças em relação aos mecanismos de angiogênese fisiológica e tumoral (REDDY et al., 2003). Quando as drogas atingem a massa tumoral, elas podem atuar diretamente sobre as células tumorais ou ainda, atuar indiretamente modulando, por exemplo, a vascularização, uma estrutura essencial para a sobrevivência da massa tumoral.

A terapia antiangiogênica atual refere-se ao uso clínico de agentes antiangiogênicos em condições caracterizadas pela presença de vascularização excessiva, como o câncer, a degeneração macular relacionada a idade e retinopatia diabética, artrite reumatóide, psoríase e endometriose (CARVALHO et al., 2011).

A angiogênese é um processo fisiológico que envolve a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (MAKRILIA et al., 2009). Durante o desenvolvimento embrionário, o sistema cardiovascular é o primeiro sistema de órgãos que alcança o estado funcional. Este processo envolve primeiramente a vasculogênese, onde há formação de novos canais vasculares pela reunião, em forma de ilhotas sanguíneas, de suas células precursoras, os angioblastos. Num segundo momento a angiogênese se estabelece, envolvendo mecanismos celulares de proliferação, migração e diferenciação (MOORE & PERSAUD, 2008; BOUIS et al., 2006). Desta forma, o estabelecimento inicial de novos vasos no embrião obedece ao que se vê ordenado na **figura 1**:

Figura 1: Estabelecimento do processo da vasculogênese embrionária.



Fonte: Adaptado de MOORE; PERSAUD, 2008.

A formação de vasos sangüíneos é mantida sob rígido controle no organismo do adulto, sendo a angiogênese usualmente desprezível após ter sido alcançada essa fase da vida (FOLKMAN, 1971; FOLKMAN; SHING, 1992). Apesar disso, a neovascularização desempenha na vida adulta papel fundamental em inúmeros processos fisiológicos, como nos ciclos reprodutivos femininos e na cicatrização (FOLKMAN; KLAGSBRUN, 1987; BERGERS; BENJAMIN, 2003).

Na angiogênese fisiológica, novos vasos sofrem maturação rápida e se tornam estáveis, enquanto nos tumores - ferimentos que jamais cicatrizam (DVORAK et al., 1986) - o crescimento de vasos sangüíneos é mantido constante, sem alcance da estabilidade. O estabelecimento de fluxo sangüíneo no vaso neoformado constitui um fator essencial para maturação vascular, mas quando o estímulo angiogênico é insuficiente o neovaso torna-se frágil e dilatado, sujeito a rupturas com conseqüente redução do fluxo e regressão (CARMELIET et al., 2000, 2003). Geralmente células tumorais apresentam fluxo sangüíneo lento e oscilante, apresentando extravasamento de proteínas plasmáticas (MUNDHENKE et al., 2002).

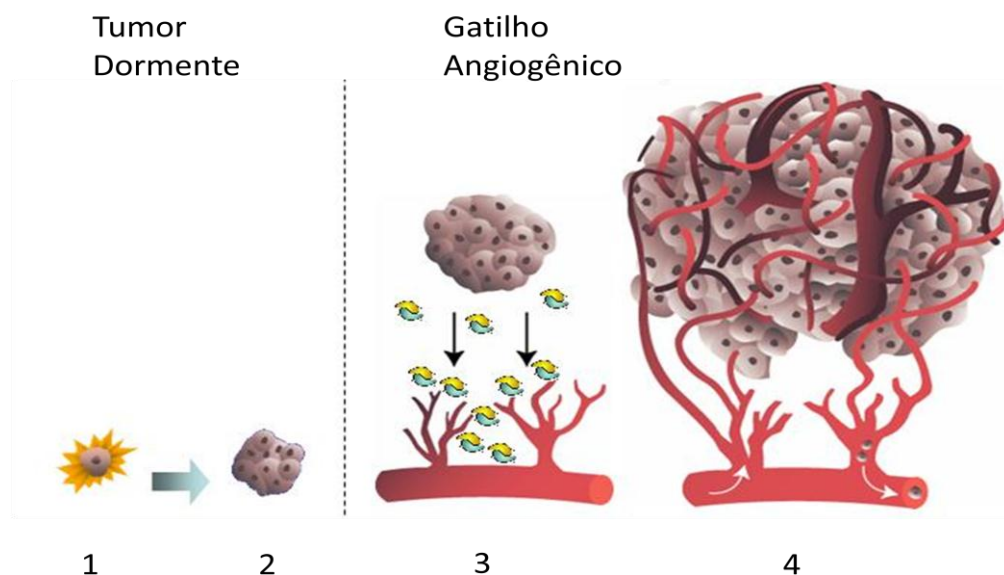
A angiogênese fisiopatológica (neovascularização) também é característica em diversas doenças desprovidas de malignidade, incluindo a artrite reumatóide, a endometriose, a psoríase e retinopatias proliferativas (FOLKMAN, 1995a; JONES et al., 2001).

As propriedades biológicas de vasos que são relevantes na embriogênese também o são para o crescimento de tumores. Embora uma pequena percentagem de células indiferenciadas – células precursoras endoteliais – possa ser incorporada aos vasos do tumor, a maior parte da neovascularização de tumores parece ocorrer via angiogênese (FOLKMAN, 1995; HENDRIX et al., 2003).

O papel da angiogênese na biologia do câncer foi descrito inicialmente por Folkman na década de 70, que postulou e descreveu o fenômeno da dormência do tumor, na ausência de vascularização (**figura 2**).

A fase vascular neoplásica é caracterizada pela rápida proliferação celular neoplásica. O crescimento tumoral necessita de novos capilares, e a perfusão advinda desses novos vasos passa a ser o mecanismo de nutrição, oxigenação e eliminação de metabólitos. A maioria dos tumores torna-se detectável clinicamente somente a partir dessa fase (FOLKMAN, 1995b).

Figura 2: Estabelecimento da angiogênese tumoral.



1. Mutação somática adquirida;
2. Pequeno tumor avascular;
3. Tumor secretando fatores angiogênicos;
4. Neovasos nutrendo e tornando rápido o crescimento tumoral.

Fonte: Adaptado de CARMELIET; JAIN, 2000; BERGERS; BENJAMIN, 2003.

Um número convincente de evidências indica que a ativação do “interruptor” ou “gatilho” angiogênico é governada por fatores de compensação que podem induzir ou opor-se

a angiogênese (BERGERS; BENJAMIN, 2003). Alguns destes reguladores de sinalização angiogênicos são proteínas que se ligam a receptores de superfície celular estimulatórios ou inibitórios, dispostos em células endoteliais vasculares. Os mais bem conhecidos protótipos de indutores e inibidores da angiogênese são o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) e a trombospondina-1 (TSP-1), respectivamente (BAERISWYL; CHRISTOFORI, 2009).

Além disso, outros sinais pró-angiogênicos tais como os membros da família do fator de crescimento de fibroblastos (FGF), têm sido implicados na manutenção da angiogênese tumoral quando a sua expressão é cronicamente supra-regulada (BAERISWYL; CHRISTOFORI, 2009).

A angiogênese é induzida surpreendentemente cedo durante os estágios de desenvolvimento de cânceres invasivos, tanto em humanos como em modelos animais, permitindo assim que o uso de procedimentos experimentais de análise *in vivo* sirvam como ferramentas de pesquisa úteis e fidedignas. A análise histológica de lesões pré-malignas não-invasivas, incluindo displasias e carcinomas *in situ* decorrentes de uma variedade de órgãos, tem revelado a celeridade e comprovado a rapidez do início do disparo do “gatilho” angiogênico (RAICA et al., 2009).

Historicamente, a importância da angiogênese foi idealizada para ser levada em conta somente nos casos de onde rápido crescimento de tumores macroscópicos tivesse surgido, mas, dados mais recentes indicam que a angiogênese também contribui para as fases pré-malignas microscópicas de progressão neoplásica, consolidando ainda mais seu *status* como uma marca crucial, integrante da progressão do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Em resumo, pode-se afirmar que a angiogênese desempenha um papel importante no crescimento, progressão e metástase de um tumor. A inibição do processo angiogênico ou mesmo da segmentação de vasos tumorais existentes pode ser utilizada para o tratamento de tumores, como uma alternativa ou em paralelo com a quimioterapia convencional (MAKRILIA et al., 2009).

1.2 O câncer e a terapia antiangiogênica

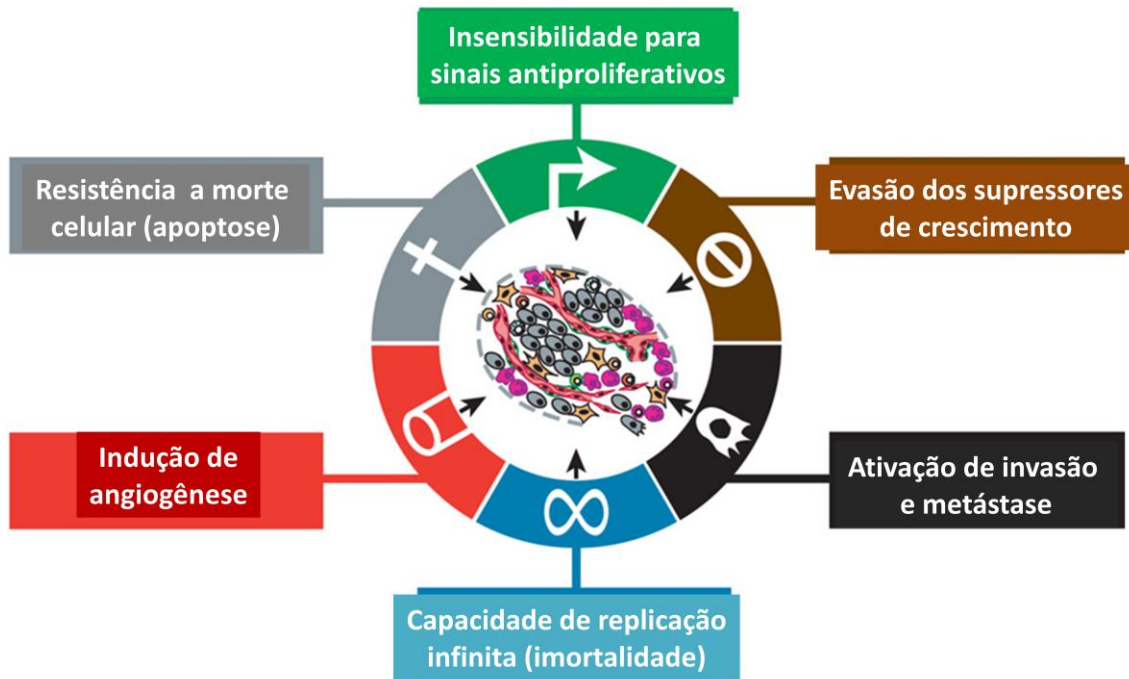
Os tumores malignos são responsáveis por um número expressivo e crescente de pacientes em todo o mundo, e representam a segunda causa de morte da população. No Brasil, as estimativas, para o ano de 2010, são válidas também para o ano de 2011, e apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer (INCA, 2009).

O tratamento do câncer baseia-se, de forma geral, na ressecção cirúrgica de tumores sólidos localizados, radioterapia para tumores em pacientes sem condições clínicas ou possibilidades técnicas de ressecção completa, e quimioterapia nos casos de tumores não sólidos ou de tumores sólidos disseminados. Estas indicações clássicas sofreram alterações significativas, com a introdução do conceito de tratamentos adjuvantes. A quimioterapia antiangiogênica, radioterapia e cirurgia tornaram-se métodos terapêuticos de emprego intensivo e associado em muitos pacientes portadores de neoplasias, melhorando desta forma os resultados obtidos (INCA, 2009).

O processo de transformação de uma célula normal em uma célula tumoral envolve uma série de alterações genéticas e epigenéticas. Durante o ano 2000, numa revisão de literatura bastante influente, Hanahan e Weinberg enumeraram seis "marcas" essenciais, necessárias a esta transformação celular (**figura 3**). Esses processos incluem, de maneira geral: a auto-suficiência para sinais de crescimento, a insensibilidade à sinais de supressão de crescimento, a evasão da apoptose, infinito potencial de replicação, a invasão de tecidos e metástases e a indução da angiogênese.

A "HallMark" citada por último, que provê o suprimento eficiente de sangue, tão crucial para o crescimento tumoral, bem como para a formação de metástases, foi elucidada no início da década de 70, e a partir de então o impedimento da irrigação sanguínea tumoral, começou a ser proposta como uma opção terapêutica bastante atrativa (FOLKMAN, 1971).

Figura 3: *The Hallmarks of Cancer.*



Fonte: Adaptado de HANAHAN; WEIBERG, 2011.

O primeiro caso de sucesso da terapia antiangiogênica foi observado no tratamento de hemangiomas infantis com INF-alfa (EZEKOWITZ et al., 1992). Os avanços alcançados ao longo dos anos acerca da compreensão dos mecanismos moleculares e celulares do processo angiogênico possibilitaram o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para combater as doenças dependentes de angiogênese, entre as quais, o câncer, degeneração macular relacionada à idade, retinopatia diabética, artrite reumatóide, psoríase e endometriose.

Nessas doenças, ocorre uma produção exacerbada de fatores pró-angiogênicos, como VEGF e FGF-2, que sobrepujam os efeitos dos inibidores endógenos, como angiostatina, endostatina e trombospondina (CARMELIET, 2003; GASPARINI et al., 2005). Em virtude de tais descobertas, reconheceu-se enfim que a intervenção no processo de formação vascular constitui uma abordagem terapêutica interessante para o manejo clínico das doenças decorrentes de angiogênese insuficiente ou exacerbada (PANDYA et al., 2006).

Várias pesquisas indicam que a proteína VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) possui potente ação angiogênica, sendo sempre considerada sua importante ação

mitogênica sobre as células endoteliais e relacionada atualmente a uma importante linha terapêutica antineoplásica.

A terapia direcionada contra a vascularização tumoral pode ser eficaz contra uma gama de tipos de câncer. Os conhecimentos recolhidos na última década sobre a neovascularização de tumores levou ao desenvolvimento de compostos que interferem no processo angiogênico por diferentes mecanismos. Em particular, algumas vias têm recebido atenção considerável, como a via do fator de crescimento vascular endotelial A (VEGF-A) e seu receptor VEGFR2, as angiopoietinas e também seu receptor (Tie2), a via do PDGF-B e seu receptor PDGFR-b, bem como a via Notch1 Dll-4 (ROODINK; LEENDERS, 2010).

A angiogênese é um processo complexo de várias etapas que, induzido pelo VEGF-A, se inicia basicamente com a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular de capilares pré-existentes ou vênulas pós-capilares. O aumento da permeabilidade vascular permite que o extravasamento de proteínas plasmáticas, como fibrinogênio, que é posteriormente convertido em fibrina servindo como uma matriz provisória para a migração de células endoteliais. Este processo é acompanhado pelo deslocamento dos pericitos mediado pela angiopoietina 2 (HOLASH et al., 1999).

Para permitir que as células endoteliais possam migrar, estímulos quimiotáticos angiogênicos são liberados na matriz extracelular e na membrana basal vascular em torno dos capilares pré-existentes, para que sejam degradados por proteases secretadas pelas células tumorais. Posteriormente, células endoteliais proliferam e invadem a matriz extracelular, aderindo umas às outras a fim de formar “tubos ocos”, que imitam vasos, um processo induzido por diferenciação, que envolve o ligante Delta- (Dll4) 4/Notch. Este processo é por sua vez acompanhado pela ativação da Angiopoietina 1 e do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas-B (PDGF-B) que induzem o recrutamento das células perivasculares e a formação de nova membrana basal em torno dos vasos recém-formados (ROCA; ADAMS, 2007).

Ensaio clínicos avaliaram ou estão avaliando a eficácia de diversos agentes antiangiogênicos no tratamento das doenças dependentes de angiogênese, sobretudo no que se refere à terapia anticâncer (LONGO et al., 2002). Relatos preliminares sugerem que a terapia antiangiogênica com um único agente é limitada, tendo em vista a complexidade do processo angiogênico (CARMELIET, 2003). Portanto, a combinação da terapia antiangiogênica com a

quimioterapia convencional parece mais promissora. Resultados positivos foram obtidos na combinação do bevacizumab, um anticorpo monoclonal anti-VEGF que inibe a atividade de todas as isoformas desse fator, com Irinotecam ou 5-FU, que fazem parte da quimioterapia tradicional para tratar o câncer de colorretal metastático (FAYETTE et al., 2005; GASPARINI et al., 2005). A adição do Bevacizumab neste ensaio gerou significativo aumento da sobrevida livre de progressão (PFS), bem como da sobrevida global mediana (OS), levando o Food and Drug Administration (FDA) a aprovar o Bevacizumab como o primeiro medicamento desenvolvido exclusivamente para uso como droga anticâncer inibidora da angiogênese em seres humanos (HURWITZ et al., 2004).

Sendo a angiogênese um processo chave para o crescimento do tumor, e ainda, um processo limitado em adultos saudáveis, o desenvolvimento de inibidores de angiogênese tem se mostrado um alvo anticâncer desejável, com poucos efeitos colaterais esperados.

O desenvolvimento de resistência a drogas anti-angiogênicas é também um mecanismo com poucas chances de ocorrência, ou no mínimo, numa taxa muito menor do que a observada com os quimioterápicos citotóxicos tradicionais, até porque, particularmente, acredita-se que o genoma de células endoteliais de tumores sejam normais e estáveis. Além disso, as células endoteliais se dividem bem mais rapidamente do que as células endoteliais não-tumorais, expressando ainda marcadores que as células endoteliais normais também não expressam (COOK; FIGG, 2010).

Avanços na compreensão dos mecanismos regulatórios que regem a angiogênese tumoral, continuam a agregar conhecimentos na descoberta e desenvolvimento de drogas que influenciem essa via, mais precisamente identificando novos alvos terapêuticos (COOK; FIGG, 2010).

É interessante saber, que muitos quimioterápicos convencionais usados no passado somente pelo mecanismo de ação citotóxico, possuem também atividade antiangiogênica até então desconhecida. Eles incluem desde quimioterápicos citotóxicos clássicos e drogas usados em terapia hormonal, como o 2-Metoxiestradiol (Panzem®) até inibidores de quinases (**tabela 1**). Talidomida, Paclitaxel e Herceptin são alguns exemplos deste tipo de drogas (KERBEL et al., 2000).

Os fármacos inibidores dos receptores de tirosina kinase (RTK) são particularmente úteis no tratamento do câncer por causa do duplo mecanismo de ação: a inibição das oncoproteínas de transdução de sinal e o bloqueio dos processos angiogênicos tumorais. Estas drogas também, muitas vezes, possuem como alvo mais de um tipo de receptor, afetando assim tanto as células endoteliais como as células cancerosas, já que os receptores são expressos em ambos os tipos. Uma vez que a especificidade da quinase com o seu alvo, dentre as drogas inibidoras, pode variar, compostos diferentes têm mostrado diferentes níveis de eficácia e de atividade na terapia do cancer, bem como diferentes perfis de efeitos colaterais celulares (STATON et al., 2009).

Outras drogas usadas na atualidade como antiangiogênicas incluem alguns anticorpos monoclonais como o Cetuxumab e o Bevacizumab, já citado. O Cetuximab (Erbix®) é um inibidor indireto de receptor de tirosina quinase. Quanto à sua atividade anti-angiogênica, estudos mostraram que os inibidores de EGF/EGFR parecem causar uma redução na síntese de citocinas pró-angiogênicas, em vez de uma inibição direta da angiogênese (PERROTTE et al., 1999).

Tabela 1: Exemplos de inibidores de Cinases usados na terapia antiangiogênica atual.

<i>INIBIDOR</i>	<i>Outros nomes</i>	<i>Inibe:</i>
Erlotinib	Tarceva®, OSI-774	EGFR/HER1
Sorafenib	Nexavar®, BAY 43-9006	Raf, VEGFR (-2 e -3), PDGFR-β e c-kit
Gefitinib	Iressa™	EGFR/HER1
Leflunomide	Arava, SU101	PDGFR (EGFR, FGFR)
Neratinib	HKI-272	EGFR e HER2
Vatalanib	PTK787	VEGFR, PDGFR-β e c-kit
Motesanib	AMG 706	VEGFR, PDGFR e c-kit

Fonte: Adaptado de COOK; FIGG, 2010.

1.3 Vascularização relacionada ao desenvolvimento tumoral e seus métodos de detecção

Há muitas décadas foi percebido que os tumores apresentam uma vascularização bastante proeminente em relação aos tecidos normais e existem suficientes evidências de que a presença de vascularização exacerbada é condição essencial para ocorrência da neoplasia (PINHO, 2005).

Em grande parte, o mérito referente ao atual estado de conhecimentos sobre a angiogênese é atribuído a Judah Folkman, que propôs na década de setenta a participação essencial do desenvolvimento de microcirculação no processo de crescimento tumoral e postulou ainda o fenômeno da dormência do tumor na ausência de vascularização (FOLKMAN et al., 1971).

O uso de tumores sólidos inoculados em animais, tenta de maneira experimental mimetizar os efeitos e consequências do seu crescimento *in vivo*, possibilitado a observação, da extensão do processo angiogênico que o cerca. O modelo do Sarcoma 180, também conhecido como tumor Crocker, cresce rapidamente na maioria dos animais (cerca de 90%) em que é inoculado, podendo regredir em 8-10% dos casos (SATO et al., 2005). A observação desta taxa de regressão, que pode ser aumentada pelo tratamento com certas substâncias químicas ou produtos biológicos, é bastante usada como ferramenta para investigação da atividade de novos protótipos candidatos a drogas antitumorais com potencial antiangiogênico ou não.

A marcação de tumores sólidos com anticorpos específicos para monitorar o surgimento de novos vasos ao redor desse tumor, é validada pelos tradicionais métodos de imunohistoquímica, onde a angiogênese do tumor é principalmente avaliada com base na medida da densidade microvascular (DMV), que pode ser medida usando vários marcadores endoteliais, como Fator de Von Willebrand (FvW), CD-34 e CD31 (PONCELET et al., 2002).

Para que uma célula evolua de seu estado normal e assuma as características de uma célula neoplásica, é necessária a ocorrência de uma série de mutações, envolvendo genes que expressem proteínas cuja ação esteja relacionada ao controle do ciclo celular. Seja por função anormalmente exacerbada dos oncogenes, que estimulam a divisão celular, ou por inibição dos supressores de tumor, o resultado será a obtenção de uma célula que apresentará um ganho proliferativo em relação às demais, tornando-se insensível aos estímulos apoptóticos (PINHO, 2005).

As relação entre a toxicidade e carcinogênese é bastante complexa, mas sabe-se que muitas das agressões celulares que levam à toxicidade podem também levar à tumorigênese (CHEN et al., 2008). A fragmentação do DNA e a perda integridade de membrana, são exemplos de fatores de agressão que podem ser avaliados juntamente com as condições de viabilidade celular ,contribuindo para elucidação de um possível efeito antiangiogênico.

A viabilidade celular está relacionada à função mitocondrial da célula, podendo ser avaliada por diferentes métodos descritos na literatura. Uma das alternativas é uma técnica fotolorimétrica utilizando-se o 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT). O MTT é um sal de tetrazólio que reduzido a um derivado formazan de cor azulada, devido à atividade oxidativa, indica a existência de função mitocondrial e, por conseguinte, a viabilidade da célula (MOSMANN, 1983; CARMICHAEL et al., 1987).

A avaliação da interferência de compostos candidados a drogas antitumorais no ciclo e proliferação celular em culturas primárias de células tumorais e endoteliais, também pode ser usada como ferramenta de pesquisa do mecanismo de ação antiangiogênico, principalmente quando aliada a técnicas mais aprimoradas como a citometria de fluxo.

A primeira cultura de célula endotelial foi relatada pela primeira vez em 1973 por Jaffe e colaboradores. Desde então, as culturas primárias de células endoteliais derivadas da veia do cordão umbilical humano (HUVEC) têm sido a principal fonte de células endoteliais primárias, principalmente pela disponibilidade e fácil acesso aos cordões umbilicais.

As patologias vasculares endoteliais representam um paradigma central para uma variedade de doenças, como por exemplo, a aterosclerose, a angiogênese tumoral, metástases e a rejeição crônica de enxertos. Portanto, o isolamento de células endoteliais em culturas primárias se faz primordial quando se deseja estabelecer modelos *in vitro* a fim de estudar as propriedades do endotélio vascular e suas modificações decorrentes destas patologias (TAN et al., 2004).

É fato que recursos consideráveis para a biologia molecular e celular da angiogênese foram obtidos através de estudos *in vitro* utilizando células endoteliais, isoladas de capilares ou vasos de grande porte como as encontradas na veia umbilical humana. A maioria das etapas da cascata angiogênica podem ser analisadas *in vitro*, incluindo a proliferação das células endoteliais, migração e diferenciação (MONTESANO et al., 1992). No entanto, para descobrir e avaliar a potência de compostos antiangiogênicos, é crucial lançar mão de modelos *in vivo* apropriados (LIEKENS et al., 2001).

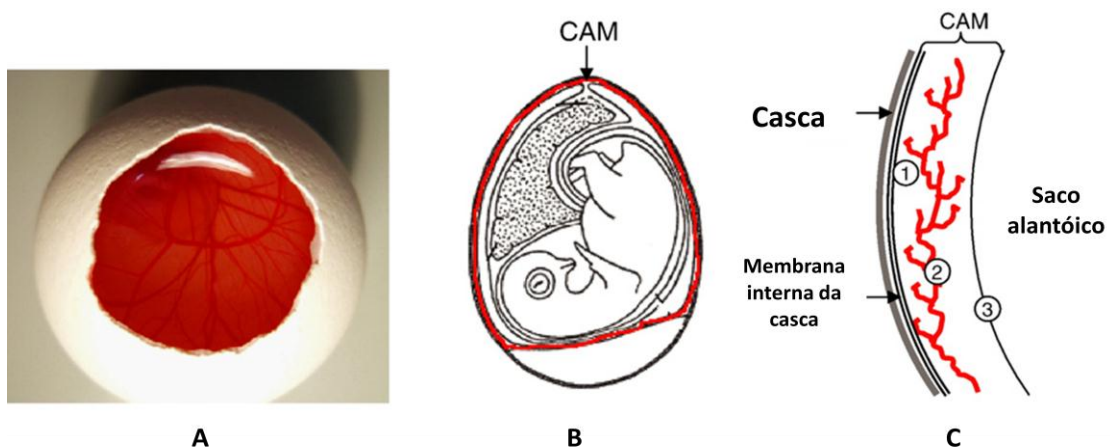
Os testes *in vivo* são conduzidos com os compostos selecionados nas etapas iniciais de *screening* para avaliar seu efeito antitumoral em animais de laboratório portadores de tumor. São propostos diversos esquemas de tratamento, alguns em combinação com outras drogas, particularmente aquelas já utilizadas na clínica que podem, também, ser usadas como controle positivo experimental. Os estudos pré-clínicos sobre toxicologia e farmacocinética do

composto são essenciais para se conhecer os seus padrões metabólicos e parâmetros fisiológicos assim como a dose tolerada e os efeitos adversos. Essas medidas são fundamentais para a interpretação dos possíveis efeitos em humanos, antes de prosseguir para a etapa dos ensaios clínicos (NEWMAN; CRAGG, 2007; JIMENEZ, 2009).

Nas últimas quatro décadas, significantes achados sobre a angiogênese têm sido realizados, principalmente tentando esclarecer como este processo fisiológico normal pode contribuir ou influenciar certos processos patológicos, sendo o de maior interesse o câncer. Muitos estudos de simples identificação da angiogênese estão correlacionados com uma longa cadeia de eventos. A proliferação endotelial é um ponto crucial para o início do processo de angiogênese, embora sua avaliação por si só não seja suficiente, e o uso de várias ferramentas experimentais numa pesquisa, *in vivo* e *in vitro*, somadas ao reconhecimento das limitações de cada método, fazem simbiose tanto para elucidar quanto para quantificar a angiogênese (MURRAY, 2001).

As estratégias clássicas *in vivo* incluem além do manejo e inoculação de tumores sólidos, injeções nas membranas de ovos de galinha doméstica (*Gallus domesticus*), entre as quais a câmara de ar da casca ou na membrana vitelínica (OPPENHEIM et al., 1973; SNEDDON et al., 1998) e o ensaio da membrana corioalantóica (CAM-assay) do embrião desta espécie (figura 4).

Figura 4: Membrana corioalantóide de embrião de galinha.



A: Imagem da CAM do topo do ovo após abertura e 10 dias de incubação;

B: Localização da CAM (vermelho) em torno do embrião em contato com a casca após 12 dias de incubação;

C: Secção da CAM com 10-12 dias de incubação (1. Epitélio coriônico; 2. Mesoderma com vasos sanguíneos em vermelho; 3. Epitélio alantóico delimitando o saco alantóico).

Fonte: Adaptado de VARGAS, 2007.

O embrião de galinha é um modelo animal bastante conhecido, que tem sido extensivamente estudado desde a época de Aristóteles, que abria ovos de galinha, um por dia, para examinar os estágios progressivos de sua embriogênese, até a moderna era molecular dos dias atuais. O crescente interesse no embrião de galinha como modelo para pesquisa de insumos biológicos e farmacêuticos está relacionado à sua simplicidade e baixo custo em comparação com modelos que utilizam mamíferos (VARGAS et al., 2007).

Leis vigentes que regulam a experimentação animal nos EUA, na União Europeia e Suíça passaram a permitir a experimentação com embriões de galinha sem autorização experimental de comitês de ética animal, com o fundamento de que os experimentos começam e terminam antes dos ovos chocarem. No entanto, a experimentação com embriões de galinha deve ser realizada de forma refinada a fim de reduzir o número de embriões utilizados através de um estudo experimental adequado (VARGAS et al., 2007).

A fisiologia, a genética e a embriologia da galinha, espécie *Gallus domesticus*, já está extensamente documentada. Cada embrião desenvolve-se em um ambiente próprio, livre de influência materna ou placentária, e o acesso aos vasos sanguíneos e ao embrião é facilitado, podendo os tratamentos ser realizados precocemente, com menos de 20 horas de incubação (MOURY; SCHENWOLF, 1995).

No ensaio da membrana corioalantóica, as substâncias em estudo são geralmente adsorvidas em suportes de colágeno, metilcelulose, poliestireno, etc (GAGLIARDI et al., 1993; DORDUNOO et al., 1995; SHIBLEY; PENNINGTON, 1998). No âmbito dos estudos de vascularização através dos ensaios da membrana vitelínica (MV) e da membrana corioalantóica (MC), a utilização de ovos de galinha fertilizados traz algumas vantagens aos laboratórios. A rotina de incubação em estufas é simples, econômica e oferece a possibilidade de manipulação de um número racional de unidades amostrais (SCHOENWOLF et al., 1994).

O primeiro indício da presença de vasos sanguíneos já pode ser observado (ilhotas sanguíneas) nos ovos de *Gallus domesticus* após 24 horas de incubação (EYAL- GILADI et al., 1991). As ilhotas sanguíneas consistem em agregados de células endoteliais que têm origem na camada germinativa intermediária do embrião (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; VALDES-DAPENA; AREY, 1974). No período de 33 horas de incubação, estrutura-se uma rede vascular, onde veias e artérias originadas no coração estabelecem uma circulação vitelínica (HOUILLOON et al., 1972; VALDES-DAPENA; AREY, 1974), sendo os vasos de menor calibre considerados o local ideal para a adição dos suportes de adsorção da droga ou composto de interesse.

1.4 Talidomida: passado e presente

Em 1954, uma pequena companhia farmacêutica alemã, *Chemie Grünenthal*, aproveitando o “boom” dos antibióticos ocorrido no pós-guerra produziram a ftaloilisoglutamina, um composto derivado do ácido glutâmico. A molécula que passou a ser denominada de talidomida, não possuía as características antibacterianas desejadas, no entanto nos testes realizados em animais, a droga não demonstrou efeitos anti-tumorais ou sedativos, bem como efeitos tóxicos. Já na fase dos ensaios clínicos, os investigadores da Grünenthal verificaram que a talidomida apresentava a capacidade de induzir sonolência profunda nos indivíduos testados (LENZ, 2011).

A talidomida foi introduzida no mercado no ano de 1956 com o nome comercial de Contergan®, que além de um potente efeito sedativo e hipnótico, apresentava também características anti-eméticas e por estas características farmacológicas, foi utilizada por mulheres grávidas no combate à insônia e também no alívio dos enjôos matinais atingindo grande popularidade na Europa e no Canadá, bem como na Ásia, Austrália, América e África (CERNY et al., 2003; PERRY; HSU, 2003).

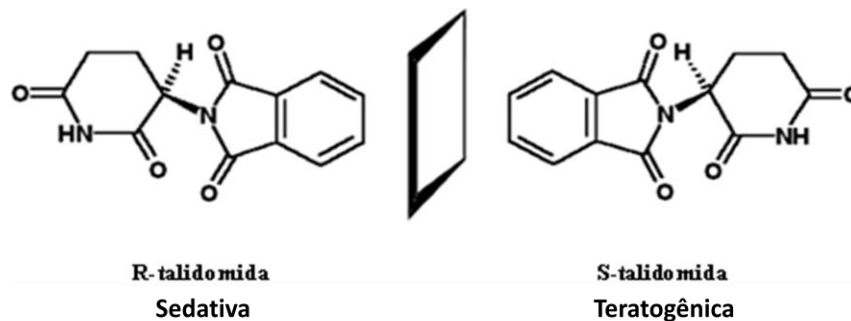
Apesar de não terem sido feitos estudos aprofundados sobre sua toxicidade reprodutiva que, aliás, não eram obrigatórios nessa ocasião, a talidomida chegou a ser descrita como o melhor medicamento antiemético para ser administrado a gestantes e lactantes (BORGES et al., 2005). Na campanha publicitária a empresa usou o slogan “Completamente atóxico, completamente seguro”. Após a campanha, houve um aumento colossal na venda da talidomida. Em nível mundial, cerca de vinte países foram licenciados para produzir e/ou distribuir a droga (RAJKUMAR et al., 2000).

No entanto, em 1958, a *Chemie Grünenthal* começou a receber notificações de neuropatia periférica, traduzida por intensas câibras, fraqueza muscular e perda de coordenação motora pelas pessoas que a tinham utilizado. Interessante notar que na época, na Alemanha, não foi claramente percebida a correlação entre o seu uso e o surgimento de focomelia nos filhos de mulheres que a haviam usado durante a gravidez (BORGES; FRÖEHLICH, 2003)

A talidomida é um derivado do ácido glutâmico e estruturalmente contém dois anéis amida e um único centro quirais, mas apesar de possuir extenso estudo químico de elucidação molecular o mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido, mas sabe-se que o

mesmo está relacionado com os seus efeitos imunomoduladores, ação anti-inflamatória e anti-angiogênica (CERNY et al., 2003; PERRY; HSU, 2003). sendo a compreensão do modo de atuação da talidomida *in vivo* dificultada dada a interconversão espontânea dos enantiómeros S e R, o que impossibilita a total separação dos seus respectivos efeitos (PRIDGEON; DRAKE 2005). Sabe-se que o enantiômero S está relacionado com os efeitos teratogênicos enquanto que o enantiômero R é responsável pelas propriedades sedativas (**figura 5**).

Figura 5: Estrutura da alfa-N-(ftalidomida) glutarimida [C13 O4 N2 H9], talidomida.



O composto existe na forma de mistura equivalente dos isômeros S(-) e R(-) que se interconvertem rapidamente em condições fisiológicas.

Fonte: Adpatado de RICHARDSON, 2002.

Nos EUA a FDA (Food and Drug Administration) jamais autorizou a sua introdução no mercado, devido à ocorrência dos efeitos neurológicos que apesar de raros, causavam perda de sensibilidade nas mãos e nos pés, durante os ensaios experimentais investigativos (CERNY et al., 2003). Provavelmente, o conhecimento da causa destes efeitos, mostrou-se obscuro e inconclusivo quanto à sua origem, impedindo assim a liberação da droga neste país.

Os primeiros relatos de crianças nascidas com malformações, que incluíam a ausência ou o encurtamento dos braços, pernas ou até mesmo de dedos, além de malformações em órgãos internos, surgiram ao fim da década de 50. Mas somente em novembro de 1961, quando foi provado o seu potencial teratogênico, a talidomida foi retirada do mercado em alguns países, continuando, porém a ser comercializada em países como Bélgica, Brasil, Canadá, Itália e Japão, por vários meses (CERNY et al., 2003; PERRY; HSU, 2003).

A dificuldade inicial no diagnóstico do efeito teratogênico teria sido causada pelo fato de que diferentes espécies animais não apresentarem o mesmo comportamento frente à ação

da talidomida. Atualmente, sabe-se que a teratogenicidade da talidomida não afeta os ratos, enquanto que os coelhos e os humanos são muito suscetíveis aos efeitos desastrosos do fármaco (CHUNG et al., 2004; GORDON; GOGGIN 2003; RICHARDSON et al., 2002).

Apesar de ter sido totalmente proibida devido aos seus efeitos teratogênicos, a talidomida reapareceu anos mais tarde como uma alternativa no tratamento de várias doenças do foro dermatológico, apresentando grande eficácia no tratamento do eritema nodoso leproso (ENL), uma séria condição inflamatória em pacientes com Hanseníase. Esta descoberta foi o ponto de partida para novos estudos sobre os efeitos da talidomida, sendo a sua administração para o tratamento do ENL aprovada pela FDA em 1968 (PERRY; HSU, 2003). A liberação do fármaco acompanhou ao mesmo tempo uma série de restrições para a sua distribuição. Devido ao seu conhecido potencial em causar malformações em crianças, seu uso tem um controle muito rigoroso nos Estados Unidos.

Somente no ano de 2010 pesquisadores japoneses descobriram que a causa da ação teratogênica da talidomida estava ligada a uma proteína chamada cereblon (CRBN) que forma um complexo de ligase ubiquitinado E3 com a proteína 1 ligante de DNA danificado (DDB1) e Cul4A, sendo estas cruciais para a promoção do desenvolvimento e crescimento dos membros no embrião, bem como a expressão do fator de crescimento fibroblástico 8 (Fgf8) em zebras e galinhas. De forma resumida, a talidomida inicia seu efeito teratogênico com a ligação ao cerebelon, inibindo assim a atividade de ligase ubiquitina associada. (ITO et al., 2010)

A atividade antiangiogênica da talidomida, descoberta no final da década de 90, (SINGHAL et al., 1999) foi baseada na observação do aumento da angiogênese na medula óssea em pacientes com mieloma múltiplo (MM), e desde então Singhal introduziu a talidomida para tratar o MM recidivante e refratário, obtendo uma taxa de resposta de 32% incluindo duas remissões completas (MOREIRA et al., 1993). Além disso, tem sido relatado que a talidomida possui ação sinérgica com outros agentes antimieloma, como a dexametasona, e os outros agentes alquilantes. Outras aplicações possíveis são o tratamento de infecções graves e melhora da letargia e náusea dos pacientes submetidos a quimioterapia. (RICHARDSON et al., 2002).

Já os resultados dos estudos efetuados para conhecer os efeitos imunomoduladores da talidomida têm sido controversos. Muitas evidências apontam para que a talidomida não atue diretamente na diminuição da proliferação dos linfócitos. Contudo, observam-se diferentes

efeitos na estimulação de células T, bem como alterações nas respostas das células T (CERNY et al., 2003; DIGGLE, 2001).

Há também uma diminuição no número de linfócitos T-CD4⁺ circulantes, e um aumento nas células T-CD8⁺, o que se traduz numa diminuição na proporção CD4/CD8 (CERNY et al., 2003; PERRY; HSU, 2003). A talidomida parece também induzir uma mudança na resposta dos linfócitos T helper tipo 1 (Th1), para uma resposta do tipo Th2. A alteração no tipo de resposta verifica-se no sentido de deixar de ocorrer uma resposta imune mediada por células T citotóxicas (provocada pelo INF- γ), para ocorrer uma resposta imune mediada por anticorpos (provocada pela IL-4). Observa-se também uma inibição da proliferação de células T já estimuladas (CERNY et al., 2003).

Simultaneamente ocorrem alterações ao nível dos receptores das integrinas e de receptores de superfície dos leucócitos, incluindo os receptores CD44 e a molécula de adesão intracelular I (ICAM-I). As propriedades anti-inflamatórias são responsáveis pela a inibição da quimiotaxia de linfócitos e neutrófilos e da fagocitose mediada por neutrófilos e macrófagos. Os níveis de interleucinas (IL-12 e IL-6), TNF- α e INF- γ são diminuídos por ação da talidomida, e em contrapartida os níveis de IL-2 são aumentados. (CERNY et al., 2003; RICHARDSON et al., 2002).

A ação anti-angiogênica da talidomida é causada pelo seu potente efeito sobre o factor de crescimento vascular endotelial (VEGF- vascular endotelial growth factor) e sobre o factor de crescimento básico dos fibroblastos (b-FGF - basic fibroblast growth factor). A capacidade de inibir a formação de novos vasos sanguíneos confere-lhe elevada importância no tratamento de neoplasias (CERNY et al., 2003). Estudos *in vitro* têm sugerido que o efeito inibidor da angiogênese é causado por determinados metabolitos formados *in vivo* e não pelo composto pai (PRIDGEON; DRAKE, 2005). Outra hipótese existente sugere que a inibição do TNF- α poderá também ser responsável pela inibição da angiogênese, uma vez que o TNF- α tem um efeito pró-angiogénico (RICHARDSON et al., 2002).

Existem também evidências que provam um bloqueio na atividade do fator nuclear-kB (NF-kB), que é um fator de transcrição com um papel crucial no crescimento celular e nas respostas imunitárias. O papel do Ckp2C19 tem sido recentemente descrito como de extrema importância no metabolismo da talidomida, que sofrerá hidroxilação, originando um metabólito que interfere com a ativação do NF-kB. O NF-kB existe normalmente no citoplasma ligado a uma proteína inibitória (Ik B α), a dissociação deste complexo por acção da Ik B cinase, liberta o NF-kB que assim pode se translocar para o núcleo e regular a

expressão de vários genes, incluindo o gene que codifica para o TNF- α , mas também os genes que regulam a proliferação celular, a angiogênese e a inibição da apoptose (GORDON; GOGGIN 2003; PRIDGEON; DRAKE, 2005).

A inibição da produção de IL-6 provavelmente também se deve ao bloqueio do NF- κ B. Outra possível ação da talidomida envolve a modulação da atividade da cicloxigenase-2 (COX-2), uma enzima crucial na síntese de prostaglandinas, e presente em grande número em vários tipos de cancro, incluindo o cancro da próstata. Por ação da talidomida deverá ocorrer uma inibição da COX-2 e consequentemente da síntese da prostaglandina-E2 (PRIDGEON; DRAKE, 2005).

De maneira resumida, as principais ações da talidomina à nível de imunomodulação e seus consequentes efeitos antiangiogênicos, são mostrados no quadro a seguir (**figura 6**).

Figura 6: Principais efeitos imunomodulatórios da Talidomida.

- Inverter o perfil de produção de citocinas de Th1 para Th2
- Inibe a síntese do TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-12
- Estimula a produção da IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ
- Actua como co-estimulante das células T
- Diminui a expressão da ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1)
- Diminui a expressão da VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)
- Diminui a síntese do bFGF (basic fibroblast growth factor)
- Diminui a síntese do VEGF (vascular endothelial derived growth factor)

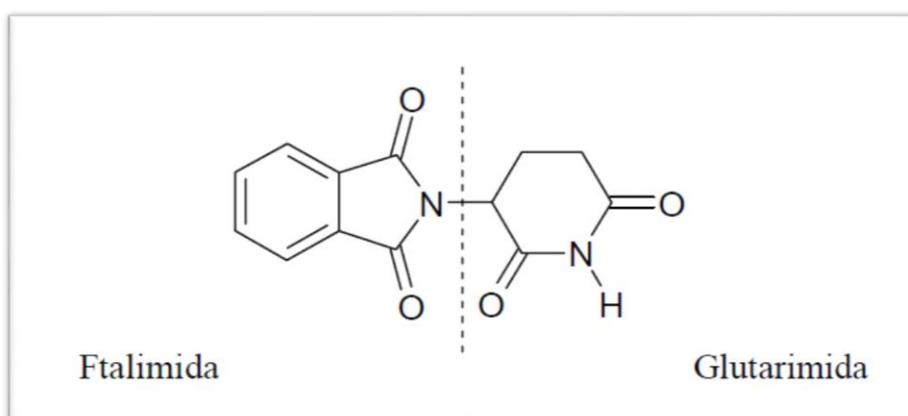
Fonte: Adaptado de GORDON, 2003.

1.5 Análogos ftalimídicos como importantes protótipos de fármacos antitumorais imunomoduladores e antiangiogênicos

A descoberta de novos agentes capazes de exercer modulação do sistema imune tem sido uma tarefa bastante atrativa atualmente, principalmente se o efeito imunomodulador for somado a uma ação proterora antitumoral. Dentre os candidatos a novas drogas anticâncer com atividade imunomoduladora que tenham entrado em ensaios clínicos ultimamente, tem sido observada a participação de vários análogos da talidomida, tais como a lenalidomida (Revlimid, CC-5013) e o Actimid (CC 4047). Estudos de estrutura-atividade relacionados (SAR) a análogos e metabólitos da talidomida mostram claramente a importância da presença da unidade farmacofórica ftalimídica (HASHIMOTO et al., 2002; 2008) (**figura 7**).

Seguindo esta linha de pesquisa, as moléculas com grupamento ftalimídico também tem sido comumente empregadas na concepção de candidatos a drogas com potencial anti-inflamatório, imunomodulador, antiangiogênico, e antitumoral (MENG et al., 2007; ALMEIDA et al., 2007; CAPITOSTI et al., 2004). Dada esta perspectiva promissora, a estratégia de hibridização molecular usando o grupamento ftalimídico como fragmento farmacofórico, tem figurado uma série de resultados bem sucedidos nos últimos anos (PESSOA, 2010).

Figura 7: Estrutura química da Talidomida, enfatizando o grupamento farmacofórico Ftalimida



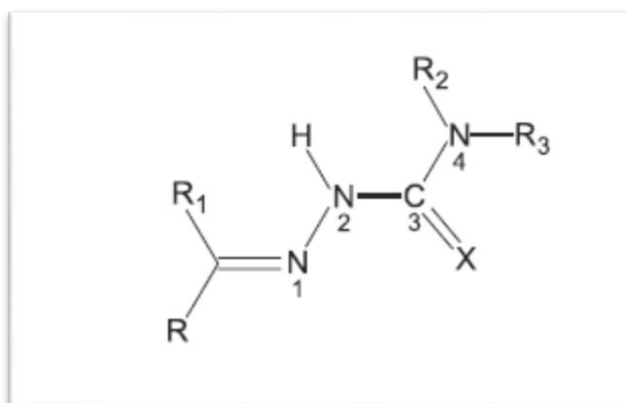
Fonte.: Adaptado de BORGES; FRÖEHLICH, 2003.

A atual Química Inorgânica Medicinal teve suas origens nos trabalhos de Alfred Werner e Paul Ehrlich, considerado o último o fundador da quimioterapia e responsável pela

introdução das primeiras idéias sobre relações estrutura-atividade e conceitos de índice terapêutico, fazendo ainda o uso de complexos metálicos, em especial os de arsênio, na preparação de drogas para o tratamento da sífilis (ORGIV; ABRAMS, 1999). Werner, por sua vez é considerado o pai da Química de Coordenação pelo desenvolvimento de sua teoria para explicar a estrutura e a ligação química nos complexos metálicos.

Tiossemicarbazonas e semicarbazonas (**figura 8**) apresentam um amplo perfil farmacológico e constituem uma importante classe de compostos cujas propriedades têm sido extensivamente estudadas na Química Medicinal Inorgânica, em razão de sua capacidade quelante e do papel da coordenação no seu mecanismo bioquímico de ação. Apesar da ampla versatilidade farmacológica desses compostos como uma classe, especificidades estruturais podem levar à manifestação de atividades específicas. Para os complexos metálicos, em alguns casos é possível modular a atividade através do desenho do ligante ou através da escolha do metal (BERALDO, 2004).

Figura 8: Estrutura genérica de semicarbazonas e tiossemicarbazonas. X = S,O. R, R₁, R₂, R₃, = H, grupos alquila ou arila.



Fonte: Adaptado de BERALDO et al., 2004.

O grupo das tiossemicarbazonas (**figura 8**), tem também participado de vasta pesquisa de desing estrutural para novos protótipos a agentes anticâncer. Alguns mecanismos bem conhecidos que envolvem tiossemicarbazonas evocam a inibição da ribonucleotídeo redutase, alteração da estrutura do DNA e ação quelante de metais endógenos (RICHARDSON et al., 2006; YU et al., 2009). Um exemplo desta versatilidade foi relatada recentemente por

Gottesman e co-trabalhadores, que utilizaram a hibridização molecular do esqueleto da β -isatina com tiosemicarbonas, levando a uma melhora das propriedades anticancer. A inserção de uma subunidade tiosemicarbona em modelos ideais direcionou e abriu caminhos para a descoberta de outros potentes e seletivos compostos anticancerígenos, como o composto 1-(5'-fluoroisatin)-4-(4'-metoxifenil)-3-tiosemicarbona (HALL et al., 2009).

Por causa desse perfil farmacológico único, a fixação de tiosemicarbonas tem sido empregada tanto no desenho de ligantes para complexação adicional com metais de transição, como também durante os processos *hit-to-lead* ou conversões *lead-to-drug* (BERALDO, 2004; YU et al., 2009).

Levando em conta todos os requisitos farmacofóricos moleculares e estruturais descritos anteriormente, o grupo de pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco isolou e descreveu a síntese e o design farmacológico inicial de 8 novos compostos com possível potencial antitumoral candidatos a agentes imunomoduladores por possuírem o grupamento farmacofórico ftalimídico. O projeto incorporou a abordagem de hibridização molecular sugerida pelas características estruturais dos respectivos protótipos, além de bioisosterismo molecular (PESSOA, 2010).

A existência dos mais diversos e severos efeitos colaterais associados clinicamente no tratamento com a talidomida *versus* as possibilidades de manejo estrutural de sua molécula química, tem levado a busca, concepção e síntese de análogos mais potentes com toxicidade reduzida. Vários análogos estão sendo caracterizados e atualmente pelo menos duas classes distintas tem recebido bastante atenção: as drogas inibidoras seletivas de citocinas (SelCIDs), e as drogas imunomoduladoras (IMiDs), cujo mecanismo de ação permanece em parte desconhecido (DREDGE et al., 2002). Ambos os grupos contêm compostos com potente atividade anti-TNF α , mimetizando de fato o mecanismo de ação da talidomida, muito embora a atividade de co-estimulação das células T seja limitada apenas para a classe IMiD (CORRAL et al., 1999; MARRIOTT et al., 2001). No entanto, muito pouco se sabe sobre as suas propriedades antiangiogênicas.

Em estudos prévios, um SelCID análogo (CC-1069) tem mostrado maior habilidade de inibição da proliferação de células endoteliais humanas *in vitro* do que a talidomida, sugerindo a possível descoberta de um novo agente antiangiogênico (MOREIRA et al., 1999).

Embora a talidomida apresente sérios efeitos teratogênicos, ela possui significativas e comprovadas atividades imunomodulatórias (especialmente a inibição do TNF- α),

considerável esforço tem sido dispendido no desenvolvimento de análogos com toxicidade reduzida (HUANG et al., 2008). Esta tese se propõe a caracterizar por metodologias *in vitro* e *in vivo* a atividade antitumoral de 8 análogos químicos inéditos da talidomida e determinar se este efeito se correlaciona com as suas propriedades anti-angiogênicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar o potencial antitumoral e antiangiogênico, em modelos *in vitro* e *in vivo*, de novos derivados ftalimídicos da talidomida.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Ensaaios *in vitro*

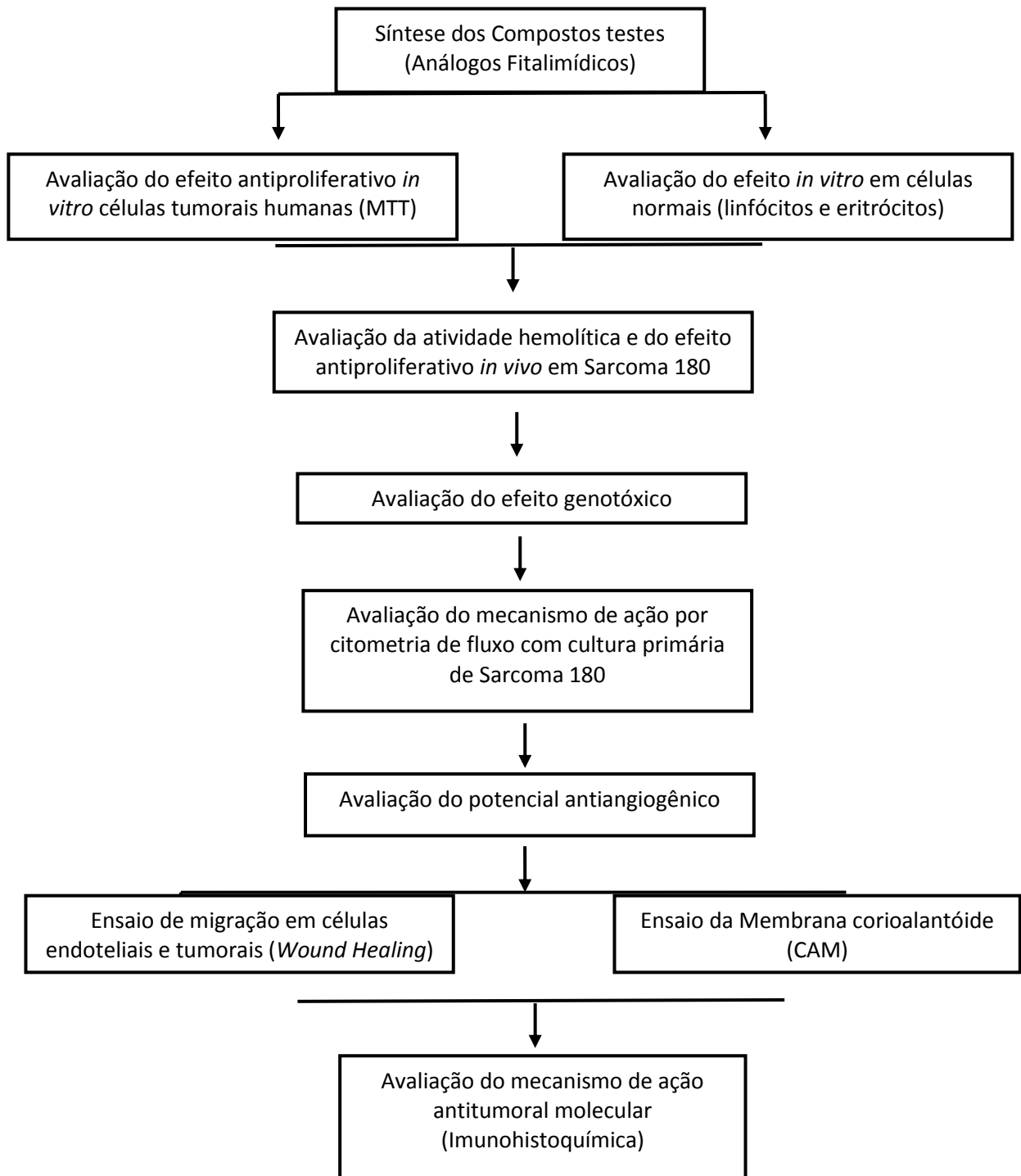
- Avaliar a atividade citotóxica da talidomida e seus análogos num painel de células tumorais e em células mononucleadas isoladas de sangue periférico humano;
- Avaliar os efeitos da talidomida e dos seus análogos no ciclo celular usando técnicas de citometria de fluxo em modelo experimental de cultura primária do Sarcoma 180;
- Avaliar o potencial genotóxico da talidomida e dos análogos selecionados usando o ensaio do cometa, em células mononucleadas isoladas de sangue periférico humano;
- Avaliar a atividade da talidomida e dos análogos selecionados sobre a migração (ensaio *Wound Healing*) em células endoteliais humanas (HUVEC).

2.2.2 Ensaaios *in vivo*

- Avaliar o efeito da talidomida e dos análogos selecionados nos testes *in vitro*, na formação de vasos sanguíneos primordiais no modelo da membrana corioalantóide, caracterizando *in vivo* a atividade sobre os processos de vasculogênese e angiogênese;
- Avaliar a atividade antitumoral da talidomida e dos análogos em camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com o tumor Sarcoma 180 (tratamento de 7 dias);
- Analisar as características histopatológicas dos órgãos (rim, fígado e baço) de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com o tumor Sarcoma 180, tratados durante 7 dias com a talidomida e os análogos;
- Avaliar a atividade da talidomida e dos análogos selecionados nos testes *in vivo* sobre a angiogênese tumoral utilizando modelo murino do Sarcoma 180 (tratamento de 15 dias), pela quantificação da densidade microvascular (DMV) intratumoral com marcação por imunohistoquímica para CD-31.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 9: Desenho experimental da Tese.



3.1 Materiais Utilizados

A especificação dos equipamentos, dos softwares de aquisição e análise dos dados, bem como o fabricante dos reagentes utilizados estão detalhadas junto à descrição das metodologias, bem como as soluções preparadas e a descrição dos componentes dos kits utilizados.

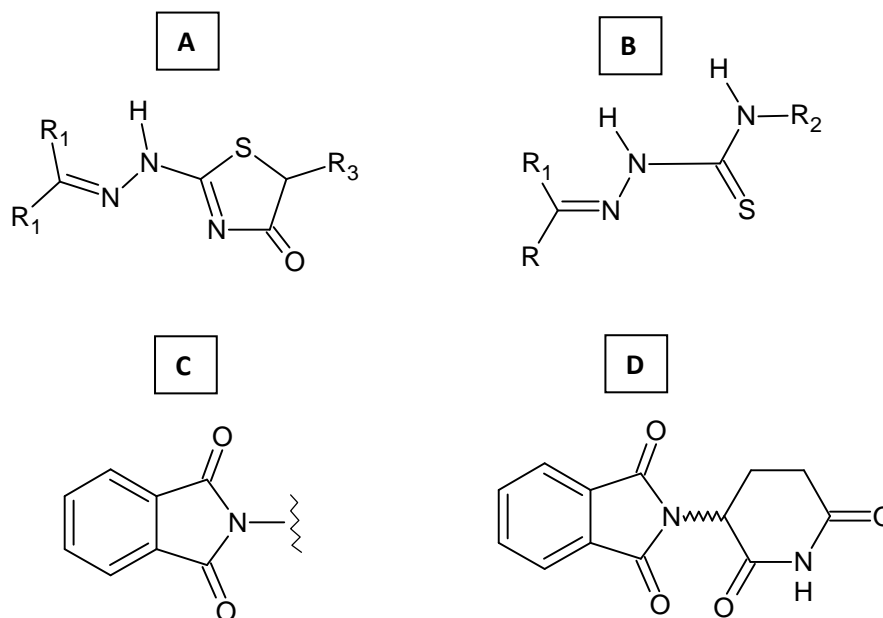
3.2 Metodologia Experimental

3.2.1 *Obtenção da Talidomida e análogos ftalimídicos*

Os comprimidos de talidomida usados nos experimentos foram adquiridos por doação do Hospital Dona Libanha em Fortaleza, na apresentação de 100mg. Os análogos foram sintetizados pelo grupo de pesquisa do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, liderado pela professora Ana Cristina Lima Leite.

As ftalimidas e tiossemicarbazonas (**figura 10**) são grupos farmacofóricos com reconhecidas propriedades antitumorais (SINGHAL et al., 1999), portanto, podem ser considerados como alvos moleculares atrativos para o desenvolvimento de substâncias matrizes de fármacos, assim como para no estabelecimento de novas Relações Estruturas (Química) - Atividade Antitumoral (REA).

Figura 10: Estrutura genérica de A: 4-tiazolinonas, B: tiossemicarbazonas, C: ftalimidas e D: estrutura química da Talidomida.



Dentre os derivados das ftalimidas, a Talidomida [(±)-2-(2,6-dioxolo-3-piperidinil)-1*H*-isoindol-1,3-(2*H*)-diona] é um fármaco reconhecido por atuar em diferentes alvos moleculares:

- (a) Imunomodulador dos níveis de TNF-alfa e NO;
- (b) Propriedades antiangiogênicas; que desfavorece a viabilidade de tumores sólidos e formação de metástases;
- (c) Antagonista do receptor de leucotrienos D4;

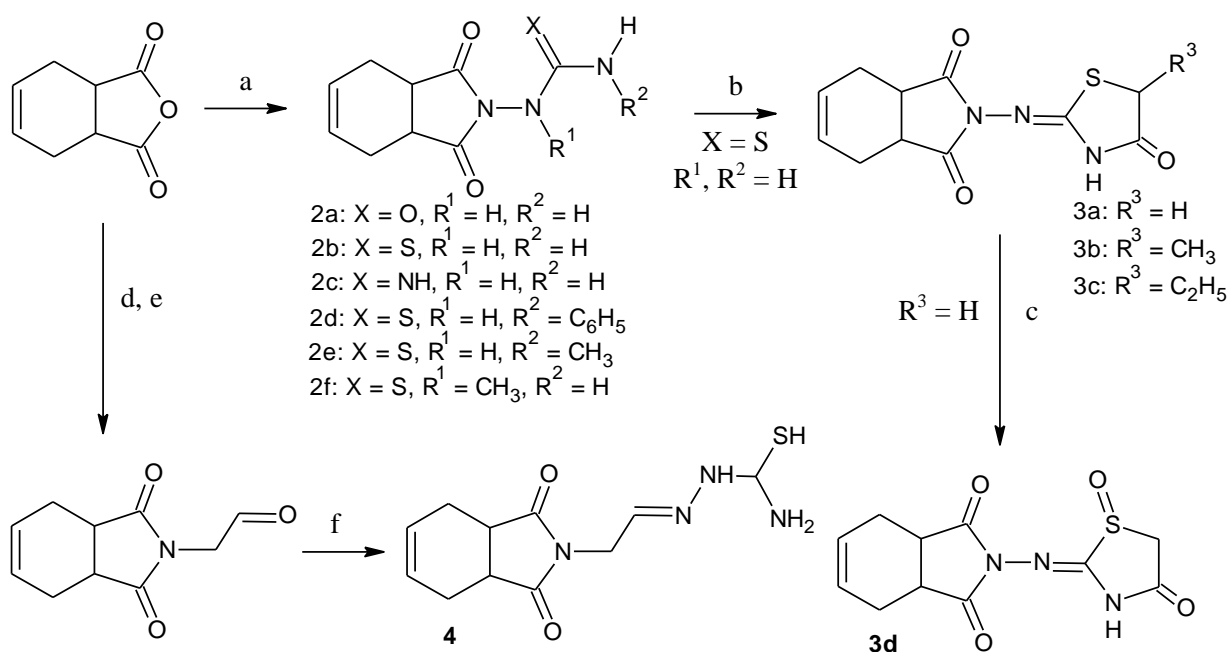
Na literatura, diversos trabalhos têm utilizado o desenho estrutural de novos agentes antiangiogênicos e imunomoduladores estruturalmente relacionados a Talidomida, adotando o heterociclo ftalimida como requerimento estrutural crucial para obter ação biológica (LIMA et al., 2001).

Desde 2006, o Laboratório de Oncologia Experimental tem investigado as propriedades farmacológicas de duas séries de compostos do tipo ftalil-hidrazidas (2a - f: SC-10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18) e ftalil-4-tiazolinonas (SC-19, 20, 21, 22: 3a-d, 4), planejados como possíveis agentes “simbióticos” antitumorais e imunomoduladores (**Figura 11**):

Todos os produtos, com exceção do 3d, foram sintetizados em balão de fundo redondo sob aquecimento e agitação magnética, obtendo-se os produtos ao final da reação por filtração a vácuo e purificação por recristalização em etanol absoluto (os compostos 2b e 2c foram recristalizados em tolueno). O composto 3d foi sintetizado em balão de fundo redondo sob resfriamento e agitação, obtido por extração e purificado por recristalização em etanol absoluto.

Todos os compostos partiram do anidrido ftálico (**figura 10C**). A Talidomida é um fármaco derivado ftalimida, cujo anel é responsável por grande parte de suas atividades, ou seja, o grupo farmacofórico.

Figura 11: Esquema de hibridização molecular para obtenção dos análogos ftalimídicos.



Reagentes e condições:

- NH₂NR₁C(X)NHR₂, DMAP, DMF, refluxo (3h);
- BrCH(R₃)CO₂H, NaOAc, EtOH, refluxo (10h);
- MCPBA, diclorometano, 0°C (5h);
- acetal dietil aminoacetaldeído, DMAP, tolueno, refluxo (1h);
- 0,1N H₂SO₄ H₂O, refluxo (5h);
- tiossemicarbazida, H₂SO₄, EtOH, refluxo (2h).

Estruturas dos compostos derivados das ftalimidas como possíveis agentes antitumorais e imunomoduladores.

Todas as moléculas são híbridos, sendo usadas ferramentas químicas de combinação farmacofórica, ou seja, numa mesma molécula temos dois ou mais grupos conhecidos por apresentarem importantes atividades biológicas. Nestas moléculas: anel ftalimida + tissemicarbazona ou o anel ftalimida + tiazolidinona com suas variações bioisostéricas.

Os comprimidos de talidomida foram obtidos através de doação na apresentação de 100mg. Os mesmos foram macerados e posteriormente diluídos em solução de DMSO estéril.

3.2.2 Avaliação da Atividade Citotóxica *in vitro*

- *Linhagens celulares*

As células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade e/ou genotoxicidade estão listadas quanto ao tipo histológico e a origem na **tabela 2**.

Tabela 2: Células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade e/ou genotoxicidade.

Linhagem celular	Tipagem Histológica	Origem	Concentração de plaqueamento
HL-60	Leucemia promielocítica	Humana	0,3 x 10 ⁶
HCT-8	Colo	Humana	0,7 x 10 ⁵
SF 295	Glioblastoma	Humana	0,1 x 10 ⁶
MDA MB 435	Melanoma	Humana	0,1 x 10 ⁶
HUVEC	Endotelial	Humana	0,5 x 10 ⁵
PBMC	Linfócito	Humana	0,3 x 10 ⁶
Sarcoma 180	-	Murino	0,5 x 10 ⁵

- *Obtenção e cultivo das células*

As linhagens tumorais humanas foram gentilmente cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). As células em suspensão e aderidas foram cultivadas em frascos plásticos para cultura de 75 cm² e 25 cm² respectivamente.

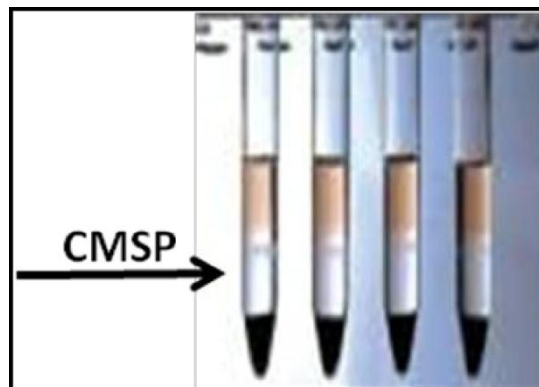
A cultura celular primária, de linhagem tumoral murina do tipo Sarcoma 180 foi obtida a partir de um animal doador, 7 dias após a inoculação. O animal foi anestesiado com halotano e sacrificado por meio de deslocamento cervical. O líquido ascítico da cavidade abdominal foi coletado sob condições assépticas e a suspensão de células foi centrifugada a 500xg por 5 minutos para obtenção de um pellet após três lavagens com meio RPMI. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 2

mM de glutamina, 100U/mL e 100 mcg/mL penicilina estreptomicina (FERREIRA et al., 2011).

A linhagem originada de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC-CC2517) foi obtida através de ampola criopreservada. Para fins experimentais deste trabalho, as mesmas foram usadas entre as passagens 3 e 9. As células foram mantidas em meio basal endotelial (EBM), suplementado com 20% de soro bovino fetal, 10µg/ml de Fator de crescimento epidermal recombinante humano (hEGF), 1.0 mg/mL de hidrocortisona, 50mg/mL de gentamicina e 3mg/mL de extrato de cérebro bovino (BBE) (Cambrex BioScience Walkersville®).

As células mononucleadas utilizadas como modelo para avaliação da citotoxicidade sobre células normais não-transformadas foram obtidas do sangue periférico de voluntários sadios, sendo coletadas em tubos tipo Vacutainer® contendo solução de EDTA dipotássico (Becton, Dickinson & Co.) como anticoagulante para melhor preservar a morfologia celular. Após a coleta, 8mL de sangue total foram vagarosamente depositados sobre 2mL de Ficoll®-Hypaque (Sigma) e centrifugados para separação das fase da solução por velocidade de sedimentação. As células mononucleadas concentram-se na camada localizada na interface entre o plasma (fase clara) e os eritrócitos (fase escura) (**figura 12**). As CMSP foram retiradas, lavadas 2 vezes com PBS e ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino fetal e 1% de antibióticos. Para estimular a proliferação dos linfócitos, foi adicionado ao meio 3% do agente mitogênico fito-hemaglutinina (Cultilab).

Figura 12: Obtenção das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) por meio de gradiente de densidade estabelecido pelo Ficoll®-Hypaque.



As células foram cultivadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, tendo sido observado o crescimento celular com ajuda do microscópio de inversão (Nikon, modelo Diaphot) a cada 24-48 horas. Quando necessário, as células foram repicadas em meio de cultura novo. Para o desprendimento das células tumorais aderidas foi utilizado solução de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco) diluída 10X em PBS (BUTLER; DAWSON, 1992) e para a HUVEC tripsina-EDTA 0,1 e 0,05%.

3.2.2.1 Atividade antiproliferativa em células tumorais humanas - Teste do MTT - Princípio do ensaio

A avaliação do efeito citotóxico dos compostos testes (talidomida e análogos) em células tumorais humanas foi realizada pelo Teste do MTT após 72 h de incubação. Este é um ensaio quantitativo *in vitro* que foi desenvolvido por Mosmann em 1983 para estimar a proliferação e a sobrevivência celular. É definido na literatura como apropriado para estimar a citotoxicidade (PESSOA et al., 2000; COSTA-LOTUFO et al., 2002) e baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do Ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazolium (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade.

- Procedimento experimental

Os compostos foram testados inicialmente nas linhagens tumorais descritas na **tabela 2** para a determinação de suas CI₅₀ (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular), sendo distribuídas em placas de 96 poços nas densidades também indicadas na mesma tabela. Os compostos (0,78 a 100 µg/mL) dissolvidos em DMSO foram adicionados a cada poço, utilizando o HTS (*high-throughput screening*), e as placas incubadas por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo com concentrações variando de 0,003 a 0,25 µg/mL O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO (0,4%).

Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 150 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio RPMI 1640) e a placa foi re-incubada por 3 horas, em estufa a 37 °C e a 5% CO₂. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspensionado em 150 µL de DMSO. Para a

quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorvâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595 nm (MOSMANN, 1983).

- *Análise dos dados*

Os compostos foram testados em diluição seriada, em triplicata. Foi registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinadas suas CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não-linear, utilizando, o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

3.2.2.2 *Atividade antiproliferativa em células Sarcoma 180 e Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) - Teste do Alamar Blue*

- *Princípio do ensaio*

O ensaio do AlamarBlue® (Invitrogen) é amplamente empregado para avaliar o efeito antiproliferativo ou citotóxico em estudos de prospecção de fármacos ou avaliação de atividade biológica de produtos naturais. Como o MTT, o AlamarBlue® estima indiretamente o número de células a partir de uma associação colorimétrica. O teste baseia-se na utilização do metabolismo redox das células viáveis para reduzir o reagente azul resazurina ao composto róseo resorufin (NOCIARI et al., 1998). Este ensaio foi realizado para avaliar e comparar os efeitos da talidomida e seus análogos sobre CMSP como um modelo de estudo de citotoxicidade sobre células normais.

- *Procedimento experimental*

As CMSP obtidas de voluntários sadios e a suspensão de células de Sarcoma 180, obtida a partir de animais doadores, portadores do tumor ascítico, foram diluídas para a concentração de $0,5 \times 10^6$ e distribuídas em multiplacas de 96 poços. Após 24h os compostos foram dissolvidos (0,78 a 100 $\mu\text{g/mL}$) em DMSO e incubados com as células por 72 h em estufa de a 37 °C e 5% de CO_2 , de acordo com Ferreira *et al.* (2011), com alguma modificações. Oito horas antes do final da incubação, 10 μL (0,312 mg/mL) de AlamarBlue® resazurina foram acrescentado em todos os poços. As absorvâncias foram medidas em 570 e 595 nm usando um leitor de multiplacas (DTX 880 Multi- Modo Detector), sendo o efeito

antiproliferativo das amostras quantificado comparado a porcentagem de inibição do controle. Doxorrubicina (0,3 mg/mL) foi utilizado como controle positivo.

- *Análise dos dados*

Os compostos foram testados em diluições seriadas, em triplicata. Foi registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinadas suas CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não-linear, utilizando, o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

3.2.2.3 Atividade hemolítica em eritrócitos de camundongo Swiss (*Mus musculus*)

- *Princípio do ensaio*

Esta metodologia, segundo descrita por Costa-Lotufo *et al.* (2002), permite avaliar o potencial das substâncias teste em causar lesões na membrana plasmática de células normais, seja pela formação de poros ou pela ruptura total.

- *Procedimento experimental*

Foi coletado sangue de três camundongos (*Mus musculus* Swiss) através do plexo orbital, sendo diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM). Os eritrócitos foram lavados 2 vezes em solução salina por centrifugação (1500 rpm/3 min.) para redução da contaminação plasmática, e ressuspensos em solução salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%.

Os ensaios foram realizados em multiplacas com 96 cavidades. Cada poço da 1^a fileira recebeu 100 µL da solução salina. Na 2^a, os poços receberam 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo de diluição da substância teste, neste caso, DMSO 10%. Aos poços da 3^a fileira, foram adicionados 100 µL de solução salina e 100 µL das substâncias teste em solução. Da 4^a fileira em diante os poços receberam 100 µL da solução salina, excetuando-se os da última fileira, que receberam 80µL de solução salina e 20µL de Triton X – 100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas da 3^a à 11^a cavidade, retirando-se 100 µL da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações foram sempre diluídas pela metade, variando de 3,9 a 200 µg/ml. Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos foram plaqueados em todos os poços. Após incubação de 1 hora, sob agitação

constante à temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$), as amostras foram centrifugadas (5000rpm/3 min.) e o sobrenadante transferido para outra placa, onde a absorbância foi medida em 540 nm usando um leitor de multiplacas (DTX 880 Multi- Modo Detector). A atividade dos compostos foi determinada de maneira relativa ao valor dos controles positivo e negativo.

- Análise dos resultados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 2 experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.3 Avaliação da atividade antitumoral in vivo em camundongos transplantados com Sarcoma 180

- Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* albino (*Mus musculus*) oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Estes foram alojados dentro de gaiolas de polipropileno e grades metálicas apropriadas em pequenos grupos do mesmo sexo (não excedendo 10 animais por gaiola). A temperatura do local foi de $22^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$. A iluminação foi artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Os animais tiveram livre acesso à alimentação (ração específica) e água.

Foram utilizados animais machos adultos, jovens, saudáveis e que não tenham sido anteriormente submetidos a processos experimentais. O número de animais utilizados foi reduzido ao mínimo cientificamente aceitável. No início do estudo, a variação de massa dos animais foi à mínima possível, não excedendo $\pm 10\%$ da massa média de cada grupo.

Os animais foram identificados e aclimatados às condições do biotério durante pelo menos cinco dias. A dor e o sofrimento dos animais no decurso dos ensaios foram minimizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal preconizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará.

- Manutenção do tumor sarcoma 180 em camundongos

O animal de manutenção ou doador foi anestesiado com éter etílico e sacrificado por meio de deslocamento cervical. Fez-se o procedimento asséptico com álcool iodado e, em seguida, coletou-se o líquido ascítico da cavidade abdominal, tendo sido preparada uma suspensão de células com 5,0 mL de Ringer lactato, 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL) e 0,5 mL do líquido ascítico, para posterior contagem das células. Os animais receptores foram inoculados com 2×10^6 células/0,5 mL na região intraperitoneal. O procedimento de manutenção foi realizado a cada 10 dias.

- Princípio do teste de atividade antitumoral

A avaliação da atividade antitumoral está relacionada à regressão total de tumores nos animais, à redução no crescimento dos tumores e ao aumento da expectativa de vida durante o tratamento, comparado com os animais não tratados. Schabel (1977) demonstraram que o melhor resultado desses fatores depende do procedimento do tratamento, que deverá ser começado até 48h após o transplante. Neste período, as células tumorais já teriam iniciado a formação do nódulo tumoral.

O tumor utilizado foi o Sarcoma 180, o qual foi descoberto em 1914 no ‘Crocker Laboratory (Columbia University, New York)’, sendo originalmente um tumor sólido, surgido espontaneamente na região axilar de camundongos. Inicialmente o tumor foi classificado como um carcinoma mamário, mas por volta de 1919, após a realização de vários transplantes subcutâneos, o tumor assumiu a forma de sarcoma, e desde então mantém-se inalterado (ASSEF et al., 2002).

- Procedimento Experimental

Para a avaliação do efeito antitumoral da talidomida e seus análogos foram utilizados camundongos (*Mus musculus* Swiss) machos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (BIOCEN - UFC). Esses animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (n = 8 para cada grupo) com pesos variando entre 22 e 25 g ($p > 0,05$).

O modelo tumoral - tumor sólido do tipo Sarcoma 180 - foi utilizado com 10 dias de implantação na região axilar direita. O animal doador, ou da manutenção, foi sacrificado por deslocamento cervical, sendo realizada assepsia com álcool iodado. Em seguida, foi retirado o líquido ascítico da cavidade abdominal e preparada uma suspensão de células com 5,0 mL de Ringer lactato, 0,2 mL de gentamicina (5mg/mL) e 0,5 mL do líquido ascítico, para posterior

contagem de células. Nos animais receptores, foram injetadas 2×10^6 céls/0,5 mL na região axilar esquerda dos camundongos.

Para avaliação do potencial antitumoral o tratamento foi iniciado após 24h de inoculação e realizado durante 7 dias consecutivos, utilizando como controle negativo, o veículo de diluição (DMSO 10%) e como controle positivo, o quimioterápico 5-Fluorouracil (25 mg/kg/dia). A talidomida e os seus análogos foram testados nas doses de 50 mg/kg/dia, todas administradas por via intraperitoneal (i.p.).

Todos os grupos foram mantidos sob as mesmas condições e sob regime de ingestão “*ad libitum*” de ração comercial (Purina, São Paulo) e água clorada durante todo o período do experimento.

No final do experimento (7 dias), os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo seus órgãos (rins, baço, fígado) e tumores dissecados para avaliação do peso relativo e da atividade antitumoral, respectivamente.

O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula:

$$IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$$

Onde: A = média dos pesos dos tumores no grupo controle.

B = média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

- Análise Histopatológica: preparação do material

Os tumores foram macroscopicamente analisados e seus cortes, previamente fixados em solução de formol neutro a 10%, foram então colocados em cassetes e introduzidos em cestos de processador automático histotécnico, seguindo as seguintes etapas de processamento: desidratados com álcool graduados a 70%, 95% (2 vezes), 100% (3 vezes), tempo mínimo de uma hora cada, diafanizados com xilol (3 vezes), mínimo de 2 horas cada, e impregnados em parafina fundida a 60° (3 vezes), duas horas cada. Uma vez impregnados, os tecidos foram colocados em pequenos recipientes contendo parafina fundida. Em temperatura ambiente, a parafina solidificou-se formando blocos com tecido.

Os blocos foram cortados em micrótomo rotativo convencional, na espessura de 5 μ m. Esses cortes colocados em superfície de banho-maria (3 a 8°C) foram delicadamente distendidos e colocados sob lâmina e estes encaminhados para estufa a 60°C. Após o período de 1 hora, os cortes foram então levados para desparafinar e hidratar na seguinte sequência: xilol 1, 2 e 3 (por 5, 2 e 1 minuto, respectivamente), seguido de álcool a 100%, 95% e 70% (1 minuto em cada mergulho), e por último lavado em água corrente por 2 minutos. O tecido, uma vez desparafinado e hidratado, foi então levado para corar pela hematoxilina de carazzi por 1 minuto, lavado em água, seguindo-se de eosina, a seguir montada com lamínula, uma gota de bálsamo do Canadá, sobre tecido corado.

- Análise dos dados

Os resultados (peso dos tumores) foram expressos como média \pm E.P.M. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A partir deste experimento, somente os análogos mais ativos (capazes de provocar redução do volume tumoral) terão seu mecanismo de ação avaliado pelos testes que seguem adiante.

3.4 Ensaio do Cometa

- Princípio do teste

Desenvolvido por Ostling e Johanson (1984), o teste do cometa, também conhecido como *Single-cell gel electrophoresis* (SCGE) permite detectar quebra de fitas simples e duplas na molécula de DNA induzidas por substâncias com potencial genotóxico, tais como agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Sendo muito utilizado em estudo de genética toxicológica, a fim de um biomonitoramento ambiental ou no monitoramento populacional em humanos. Entretanto, este teste é utilizado como um indicativo e não como um teste mutagênico. Este pode ser utilizado tanto em células de animais quanto vegetais *in vitro* e *in vivo* (FAIRBAIRN et al., 1995; ANDERSON; BERGER, 1994; SILVA et al., 2003).

- Procedimento experimental

a) Tratamento

Para avaliar a indução de quebras de fita simples e quebras de fita dupla na molécula de DNA, o ensaio foi realizado em condições alcalinas (KLAUDE et al., 1996; LIAO et al., 2009). Nesse experimento, as células (CMSP) foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com a talidomida e seus análogos (10 e 50 µg/mL) durante 24 horas. A doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo e as células do controle negativo foram tratadas com o veículo (DMSO), utilizado para dissolver as substâncias, o qual foi mantido abaixo de 0,5%.

Resumidamente, as lâminas com as células tratadas com a talidomida e seus análogos após serem lisadas foram lavadas em uma solução (10 mM Tris, 1 mM EDTA) por 3 vezes. Após esse procedimento, as lâminas foram submetidas à eletroforese.

b) Preparo das lâminas

As lâminas foram previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (0,5%) a uma temperatura de 60°C em solução de PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} , mantidos a temperatura ambiente até a solidificação. As células tratadas foram embebidas em uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37°C e adicionadas às lâminas pré-cobertas com agarose de ponto de fusão normal. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com lamínulas para uniformizar a distribuição do material na lâmina e mantidas a 4°C para solidificação da agarose.

c) Lise Celular

Após a solidificação da agarose, a lamínula foi delicadamente removida e as lâminas imersas na solução de lise (5M NaCl, 100 mL EDTA, 10mM Tris, 1% N-Lauroil sarcosina, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10,0), abrigada da luz a 4°C por no mínimo 1 hora.

d) Neutralização e Eletroforese

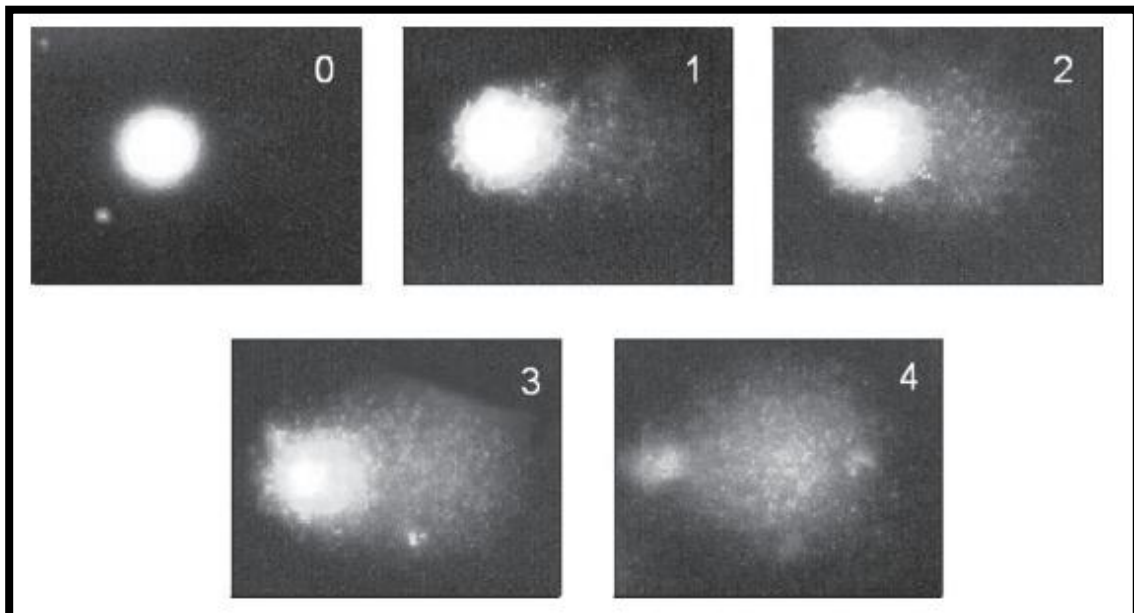
Após o procedimento anterior, as lâminas foram imersas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 15 minutos. Posterior a esta etapa, as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese preenchida com uma solução alcalina a 4°C (1mM Na_2EDTA , 300 mM NaOH, pH > 13,0). As lâminas repousaram por 20 minutos para permitir o relaxamento do DNA e a conversão de sítios álcali-lábeis em quebra de fitas

simples e duplas. A eletroforese (25 V; 300 mA) foi conduzida a baixa temperatura (4°C) durante 20 minutos. Todos esses passos foram realizados na ausência de luz. Após a corrida eletroforética, as lâminas foram novamente neutralizadas por 5 minutos e fixadas em etanol a 100%.

e) Coloração e contagem

Após a eletroforese, as lâminas foram novamente neutralizadas por 5 minutos e fixadas em etanol a 100%. As células foram contadas em microscópio de fluorescência após coloração com brometo de etídeo. As análises foram realizadas de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (BURLINSON et al., 2007; TICE et al., 2000). Foram contados 50 cometas/lâmina e classificados, de acordo com a porcentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA, de acordo com a **figura 13**. Onde, 0 = sem danos (<5%), 1 = baixo nível de danos (5-20%), 2 = médio nível de danos (20-40%), 3 = alto nível de danos (40-95%) e 4 = dano total (95%).

Figura 13: Padrão de dano ao DNA para o ensaio cometa.



Fonte: COLLINS, 2004.

- Análise dos dados

Foi calculado o índice (ID) de dano no DNA, o qual foi obtido pela seguinte fórmula:

$$ID = \sum_{i=0} n_i \times i ,$$

onde n_i é o número de células com nível de dano i (0, 1, 2, 3 ou 4). A frequência de dano (FD) representa a porcentagem de células que sofreram danos no DNA.

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

3.5 Estudos por citometria de fluxo com células de cultura primária de Sarcoma 180

O citômetro de fluxo é um equipamento que permite examinar e classificar células ou outras partículas microscópicas em suspensão marcadas com sondas fluorescentes. Seu princípio consiste na emissão de um feixe de luz laser (argônio, neste caso, excitando a 488nm) sobre a suspensão celular que fica sujeita à passagem sob um fluxo hidrodinâmico por dentro de um tubo capilar. Idealmente, apenas uma célula por vez passa diante do feixe de luz (JIMENEZ, 2009). Vários detectores são posicionados de modo a registrar o desvio da luz induzido por cada célula, apanhando a sua dispersão linear (FSC, *Forward Scatter*) ou lateral (SSC, *Side Scatter*) e a emissão de fluorescência, classificando as partículas de acordo com cada evento (DARZYNKIEWICZ, 1994).

3.5.1 Verificação de viabilidade e morfologia celular

Este ensaio baseia-se na intensidade de dispersão da luz incidente sobre as células e na capacidade de o iodeto de propídeo (PI) penetrar as células cuja membrana esteja rompida e ligar-se ao DNA nuclear, emitindo alta fluorescência vermelha quando excitado pelo laser. As células cuja membrana permanece íntegra emitem menor fluorescência.

As células da cultura primária de Sarcoma 180 foram tratadas com 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ de talidomida e análogos por 72h. Em cada intervalo foi retirada uma alíquota da suspensão de células, assim como das células não tratadas para serem submetidas à avaliação. Doxorrubicina (Sigma) 50ng/mL e 5-Fluorouracil 0,35 $\mu\text{g/mL}$, foram utilizados como controles positivos do experimento. As células do controle e as submetidas aos tratamentos

foram expostas a uma solução de iodeto de propídeo (PI; Sigma) a 50 mg/mL e PBS e, em seguida, analisadas em citômetro de fluxo (Guava Technologies, modelo EasyCyte Mini-System). As células foram separadas quanto à sua dispersão linear, correlacionando ao seu volume, e dispersão lateral, correlacionando à sua granulosidade. A intensidade de emissão de fluorescência correlaciona com a integridade de membrana e resolve a viabilidade celular.

3.5.2 Análise de conteúdo e fragmentação de DNA

Este ensaio permite avaliar o conteúdo e a integridade do DNA nuclear. Com o núcleo íntegro e com a determinação da quantidade de DNA – se 2n, 4n ou um ponto intermediário - pode-se supor à fase do ciclo celular em que a célula se encontra – se G1, G2/M ou S, respectivamente. A condensação da cromatina e fragmentação nuclear são características marcantes de células em processo apoptótico enquanto que as células necróticas geralmente mantêm seus núcleos íntegros e picnóticos. Este teste utiliza-se da capacidade do PI se ligar ao DNA. Inicialmente, a membrana plasmática das células é permeabilizada para que o PI possa se ligar ao núcleo. A fluorescência emitida é proporcional ao conteúdo de DNA e seu estado de integridade e condensação. Células com mais DNA e núcleo íntegro emitem fluorescência mais alta; já núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado irão incorporar menor quantidade de PI, emitindo, assim, menor fluorescência.

As células da cultura primária de Sarcoma 180 foram tratadas com 10, 50, 100µg/mL por 72h. Em cada intervalo foi retirada uma alíquota da suspensão de células, assim como das células não tratadas para serem submetidas à avaliação. Doxorubicina (Sigma) 50ng/mL foi utilizada como o controle positivo do experimento.

3.6 Avaliação do potencial antiangiogênico

3.6.1 Teste de migração com células endoteliais – Ensaio de Wound Healing

Os processos de formação de vasos sanguíneos ocorrem por meio de uma série de etapas, as quais podem ser divididas em: fase da desestabilização, fase da migração e proliferação e, por último, fase de maturação da membrana basal (BOUIS et al., 2006).

A migração de células endoteliais é, portanto, uma característica importante no processo de angiogênese, onde as mesmas, inicialmente, precisam migrar para um ponto fora da membrana basal. Substâncias que possam inibir a capacidade de migração de células endoteliais podem apresentar potencial antiangiogênico.

- Procedimento experimental

O ensaio de migração celular foi baseado no modelo descrito por Bürk e colaboradores (1973), com adaptações. Os modelos de ensaio de migração já têm consolidado o uso de linhagens de melanoma e/ou células derivadas de vasos sanguíneos, devido ao seu alto poder invasivo e origem endotelial, respectivamente (CARVALHO, 2001). Desta forma o uso dos tipos celulares permite avaliar não só o potencial antitumoral como também seu efeito antimetastático. As células endoteliais HUVEC foram mantidas em cultura numa placa de 12 poços até atingirem confluência de no mínimo 90%. As células tumorais MDAMB-435 foram plaqueadas na concentração de $2,0 \times 10^5$ também em placa de 12 poços.

Após as células atingirem a confluência necessária, cada poço foi tratado com $5 \mu\text{g/mL}$ de mitomicina C (antiproliferativo) por 15 minutos. O pré-tratamento com mitomicina C garante que as células estejam migrando e não proliferando. Os poços foram lavados 3x com tampão salina fosfato estéril (PBS) sendo acrescentado em seguida, 1mL de meio apropriado em cada poço.

Com auxílio de uma pipeta de plástico, foi feito um risco no centro de cada poço (cicatriz). O meio foi então retirado e poço lavado novamente com PBS. As células foram incubadas com uma dose não citotóxica da talidomida e dos análogos ($50 \mu\text{g/mL}$), sendo os compostos diluídos em meio apropriado livre de soro, de modo que este período, denominado de zero hora, foi fotografado para posterior análise. O controle negativo das células endoteliais e tumorais, receberam apenas meio EBM ou RPMI respectivamente.

Após 24 horas de incubação, os poços foram observados e fotografados novamente no microscópio de contraste de fase (Nikon, UK) 200x, sendo visualizado e quantificado manualmente então o número de células que invadiram a cicatriz, delimitada num retângulo igualmente criado para 0 e 24h para cada composto/foto (YANYONG et al., 2006). Os ensaios foram realizados em duplicata para cada composto.

- Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 2 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos (controle negativo e tratado), os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Dunnett's Comparasion Multiple Test ($p < 0,05$).

3.6.2 Ensaio de angiogênese na membrana corioalantóica de embrião de galinha (CAM)

- Ovos de galinha embrionados da espécie *Gallus domesticus*

Ovos de galinha da linhagem Ross, de tamanho padrão médio (aproximadamente 55 g), fertilizados e livres de patógenos específicos, foram fornecidos pela empresa CIALNE® (Fortaleza, CE), em um período de até 12-24 horas após a postura. Os ovos foram estocados por 24 horas em sala fria (19–20°C), até o início da incubação.

- Ensaio de angiogênese na membrana corioalantóica do embrião de galinha

Para avaliar a atividade da talidomida e seus análogos fitalidímicos na formação de vasos sanguíneos foi utilizado o ensaio da membrana corioalantóica (CAM Assay), o qual vem sendo utilizado para avaliar a atividade angiogênica (NGUYEN et al., 1994; DIAS et al., 2005). Após estocagem prévia em sala fria, os ovos foram incubados em chocadeira (Ref. IP-35), à temperatura de 38,5°C equipada com ventilação forçada, controle digitalizado de umidade (33%) e rolamento automático de ovos a cada 2 horas.

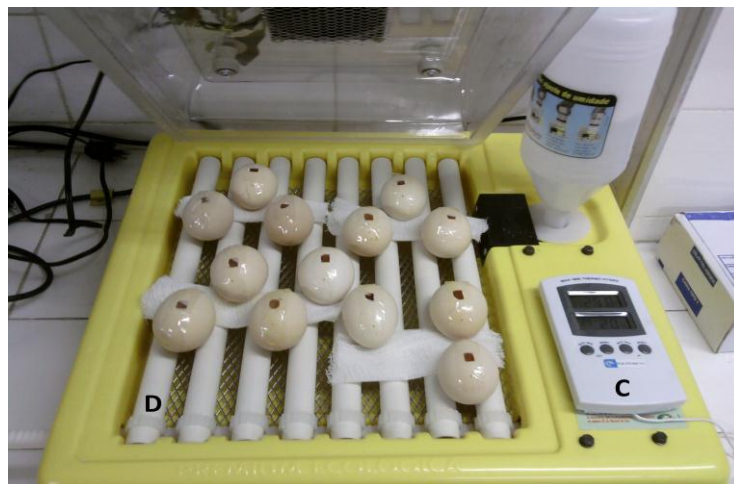
Após 72 horas de incubação (dia embrionário – E3, estágio 20-HH; HAMBURGER; HAMILTON, 1951), foi efetuado um furo lateral na casca, atingindo a câmara de ar, o que ocasiona o descolamento entre a membrana interna da casca e a membrana vitelínica. Em seguida, por meio de outro furo no lado oposto, foram retirados 3mL de albumina com

seringa de 3mL, provocando o descolamento e baixando assim o nível de altura da membrana, possibilitando que os suportes adicionados com as amostras sejam implantados sobre esta última. Foi feita ainda, uma abertura de aproximadamente 100 mm² na casca, por onde foi visualizada a viabilidade dos embriões. Imediatamente após a abertura, a casca (janela e furos) foi vedada com fita durex, e os ovos re-incubados (38,5°C) na chocadeira (**figura 14**).

No décimo dia de incubação (dias embrionários – E10, estágio 36-HH) os tratamentos (n=8) foram iniciados e realizados por meio de suportes–discóides de papel filtro (1 disco/embrião), com cerca de 2 mm de diâmetro implantados no terço externo da membrana corioalantóica, onde vasos capilares estavam crescendo (vasos de pequeno calibre). Volumes de 20µL das amostras diluídas em DMSO 10% (1 e 5mg/mL) foram pipetadas nos suportes de papel filtro sobre a CAM em câmara de fluxo.

Imediatamente após os tratamentos, as janelas na casca foram novamente fechadas e os ovos re-incubados (38,5°C) por mais 24 horas (E15; estágio 41-HH). Concluído o período de 12 dias de incubação, os ovos foram retirados da chocadeira. Realizou-se a injeção cuidadosa no epitélio alantóico, de uma solução de tinta guache branca com água destilada (2:1), com auxílio de uma seringa de 10 mL, dentro do saco alantóico, de forma que obteve-se um fundo branco abaixo dos discos de tratamento (Figura 15A). A resposta angiogênica foi determinada em função do número de vasos sanguíneos ao redor do disco e expressa como porcentagem de vasos no limite do disco, em relação ao controle negativo.

Figura 14: Sistema de incubação para ovos férteis, modelo IP-35.

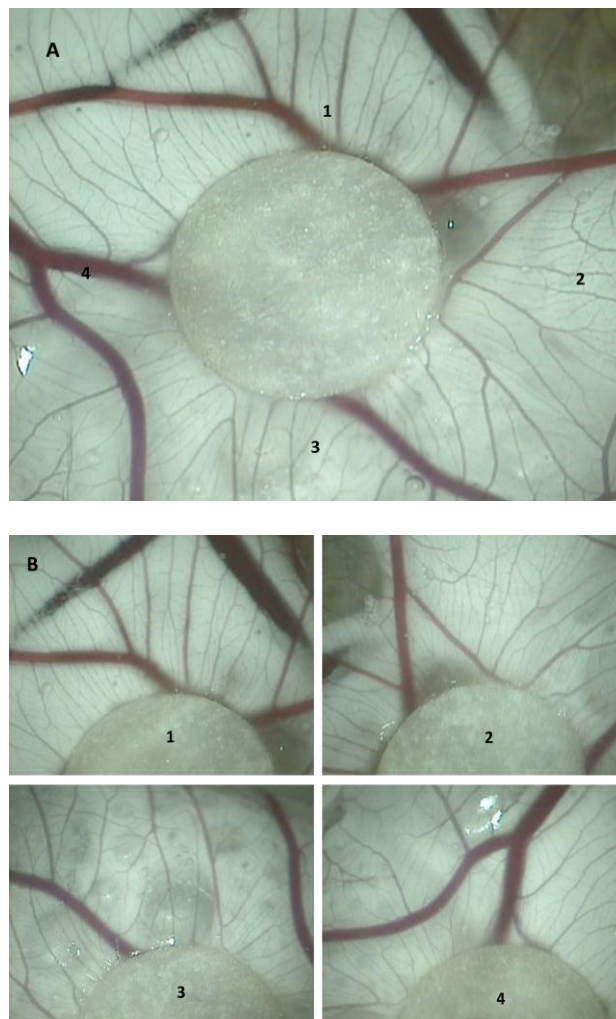


- A: Controle de temperatura (38,5°C);
- B: Sistema de ventilação forçada;
- C: Controle digitalizado de umidade (33%) e
- D: Rolamento automático. Capacidade para 20 ovos.

- Quantificação da Densidade Microvascular (DV)

Imagens digitais das membranas foram capturadas de forma padronizada, utilizando-se, para tanto, um microscópio cirúrgico- filtro verde - (BX4, OLYMPUS OPTICAL CO LTD - JAPAO) equipado com uma câmera digital (C7070 Wide Zoom, OLYMPUS IMAGING AMERICA INC- EUA). O procedimento compreendeu, inicialmente, uma varredura da área do papel filtro, utilizando o pequeno aumento (16 vezes), com a finalidade de visualizar o panorama de vasos ao redor do dispositivo que continha os compostos e identificar possíveis zonas de hemorragia (estes foram excluídos. Em seguida, utilizando uma magnificação de 25 vezes, foram capturadas 4 imagens digitais coloridas dos campos relativos aos 4 quadrantes ao redor do papel filtro (**figura 15B**). As imagens foram armazenadas no formato Windows® Bitmap (BMP), com as dimensões de 520 x 345 *pixels*.

Figura 15: Imagens da membrana corioalantóide após injeção da solução de tinta branca.



A: Imagem da vista panorâmica, aumento de 16x.

B: Imagens dos 4 (1, 2, 3 e 4) quadrantes usados na análise, aumento de 25x.

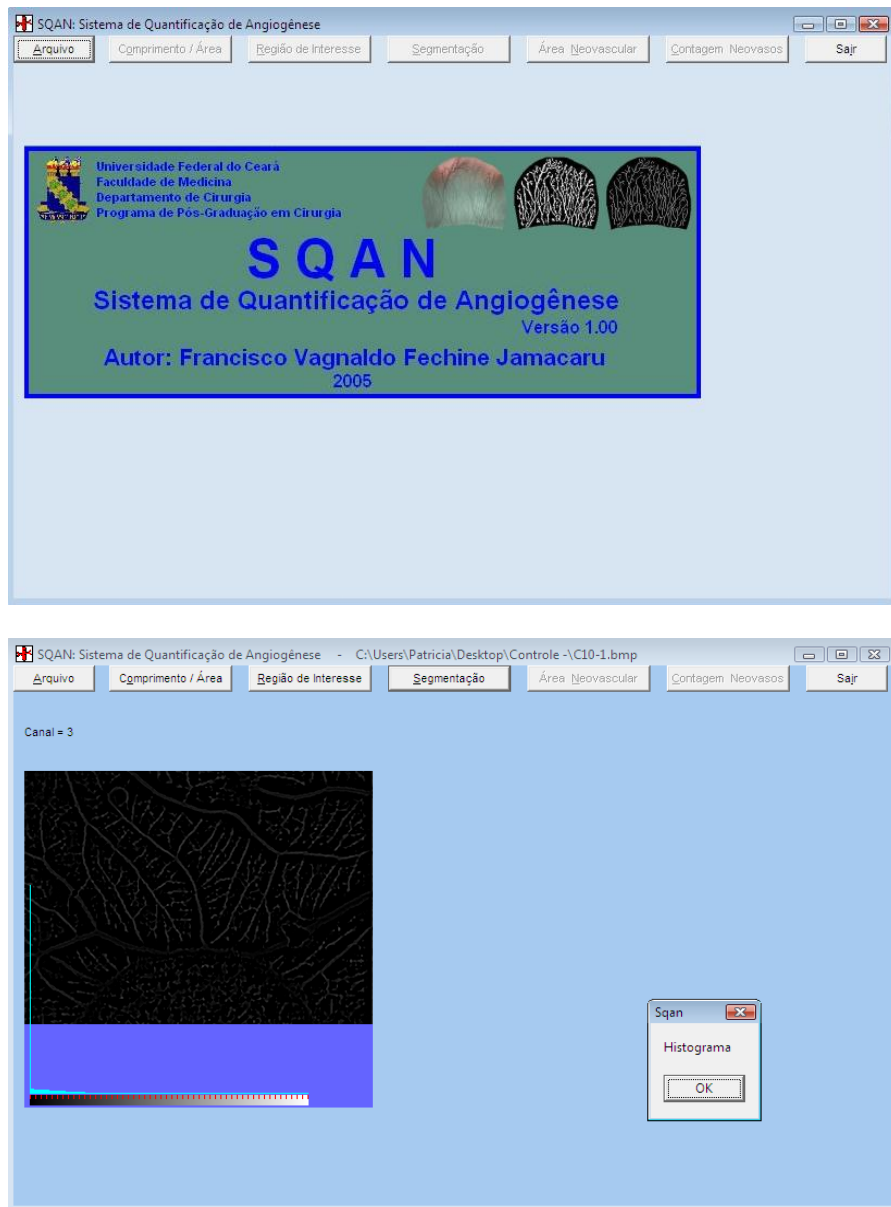
As imagens foram analisadas pelo Sistema de Quantificação de Angiogênese (SQAN), um programa de computador desenvolvido especificamente para tal finalidade (**figura 16**) O sistema é composto de cinco módulos principais, seleção da imagem original, da região de interesse; pré-processamento; segmentação; pós-processamento; quantificação da angiogênese. Assim, após a seleção da região de interesse, a qualidade da nova imagem contendo a região a ser processada é, inicialmente, melhorada; seguida da segmentação da neovascularização e posterior, eliminação de inconsistências; por fim, é efetuado o cálculo dos parâmetros de quantificação de angiogênese: área de neovascularização, comprimento vascular total e número de vasos sanguíneos (FECHINE-JAMACARU, 2006).

- Análise de dados e estatística

Em cada grupo experimental, as respostas obtidas nos grupos tratados com a talidomida e seus análogos foram sempre avaliados em paralelo com as respostas dos tratamentos como o veículo (DMSO 10%) nos respectivos controles, de modo a minimizar a interferência de possíveis flutuações de responsividade. Os dados foram apresentados como médias \pm E.P.M., obtidos de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através da ANOVA (análise de variância univariada), seguida do método Dunnet. As homogeneidades das variâncias e as influências de substâncias, concentrações, bem como de locais de tratamento (*in vivo*) foram testados e validados. Os efeitos foram considerados estatisticamente significativos para valores de P menores que 0,05 (*).

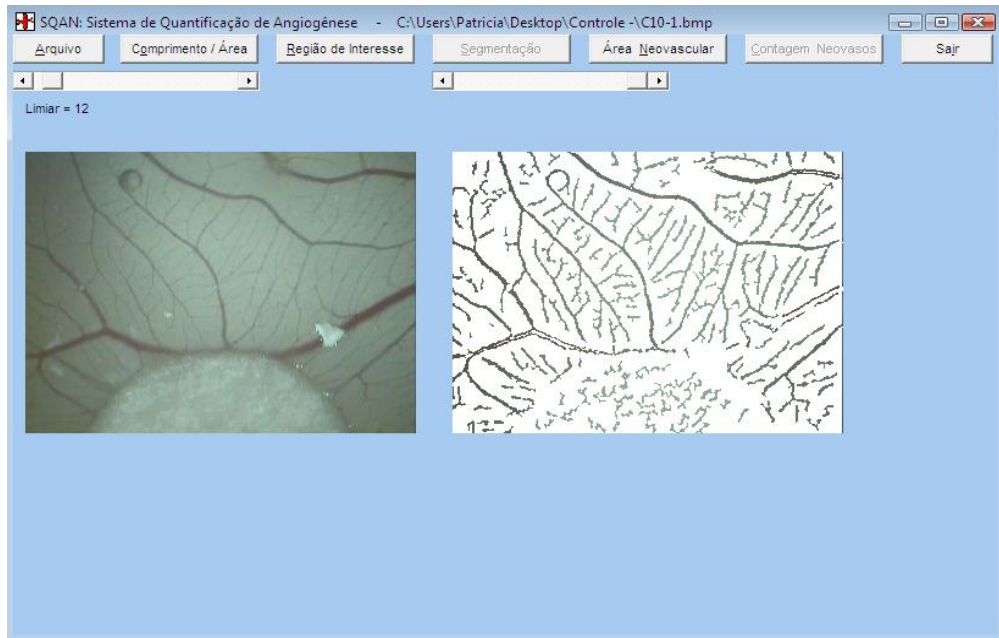
O *software* GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows® (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2007) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.

Figura 16: Telas iniciais do SQAN. Neste sistema, o operador interage ativando botões apropriados, de acordo com a qualidade da fotografia.



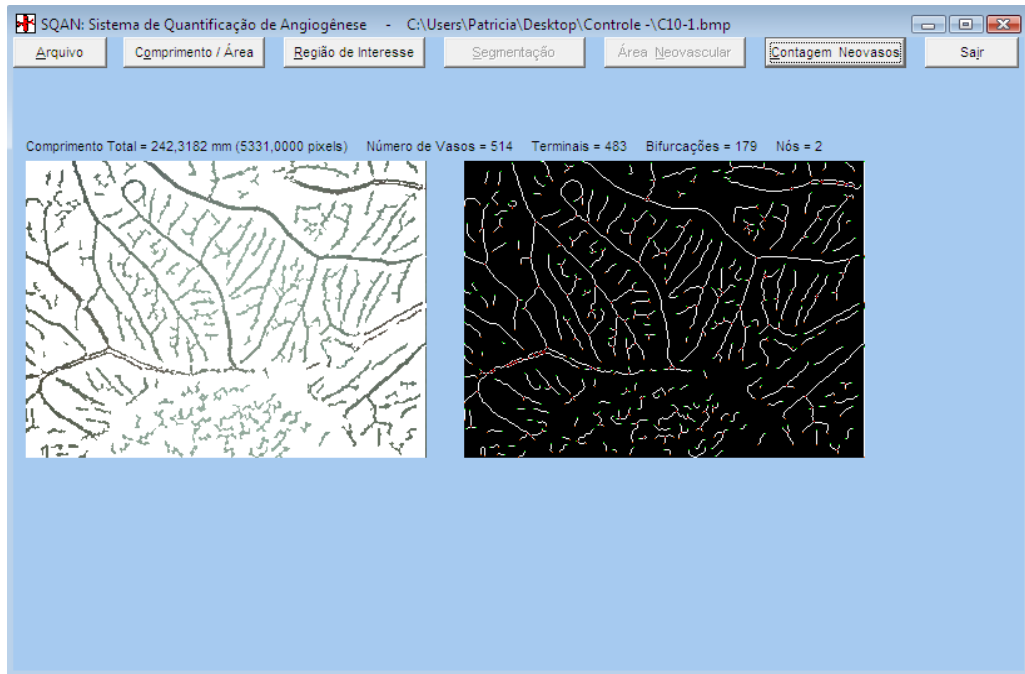
Fonte: Adaptado de FECHINE-JAMACARU, 2006.

Figura 17: Fases de pré-processamento, segmentação e pós-processamento do SQAN. O sistema mostra a imagem resultante, com os vasos nas suas cores originais e o fundo na cor branca, assim com o valor do limiar de segmentação. Notar o limiar 12 mantido para amenizar as estruturas tubulares na superfície do papel-filtro.



Fonte: Adaptado de FECHINE-JAMACARU, 2006.

Figura 18: Fase final da análise do SQAN. Exibição do valor do comprimento vascular total, em mm, e pixels, do número de vasos sanguíneos e do número de pontos terminais, bifurcações e nós. A imagem esqueletizada é reinserida na original.



Fonte: Adaptado de FECHINE-JAMACARU, 2006.

- Bioética

Todos os estudos envolvendo ovos embrionados de *G. domesticus* foram realizados de acordo com os procedimentos impostos pelo NIH (National Institute of Health), assim como pelo Guiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animal. Este projeto encontra-se submetido no protocolo nº 106 do CEPA (Comitê de Ética para o Uso de Animais em Pesquisa) /UFC, no Departamento de Fisiologia e Farmacologia - Fortaleza, Ceará, Brasil

3.6.3 Avaliação molecular da angiogênese tumoral por imunohistoquímica

Para ensaios que usam modelos de tumores sólidos *in vivo*, os efeitos da terapia anti-angiogênica não podem ser observados com tempo de tratamento menores que 8-10 dias (BRUNS et al., 2002). A fim de verificar a possível via molecular inicial envolvida na inibição da neovascularização, o mesmo modelo de avaliação *in vivo* da atividade antitumoral,

com camundongos transplantados com Sarcoma 180, foi utilizado agora para medir a marcação de vasos intratumorais com o anticorpo CD-31.

Para avaliação do potencial antiangiogênico o tratamento foi iniciado apenas após 5 dias de inoculação e realizado durante 10 dias consecutivos, totalizando 15 dias de experimento. Da mesma forma do experimento anterior, foi usado como controle negativo (N=10) o veículo de diluição (DMSO 10%). Como controles positivos, foram usados o 5-fluorouracil (25mg/kg/dia) e o anticorpo monoclonal Bevacizumab (5mg/kg/dia), (N=8). Novamente, a talidomida e os seus análogos mais ativos foram testados na dose de 50mg/kg/dia (N=7), todas administradas por via intraperitoneal (i.p.).

Para cada grupo, de 4 a 6 animais (tumores) foram eleitos para confecção de lâminas destinadas para a experimentação por imunohistoquímica. A escolha foi baseada no estado macroscópico do tumor, excluindo-se os que possuíam extensas áreas de necrose e na avaliação microscópica inicial feita com a coloração do HE, onde foram eleitos os tumores que aparentemente possuíam uma maior quantidade de vasos intra-tumorais.

- Princípio do método

A Imuno-histoquímica (IHQ), ou imunocitoquímica, é um método capaz de localizar antígenos específicos em tecidos ou células com base no reconhecimento antígeno-anticorpo, conseguindo explorar também a especificidade fornecida por esta ligação à nível de microscopia de luz (TAYLOR et al., 2011).

- Procedimento experimental

Para realização deste ensaio, foram escolhidos tumores de 5 animais por grupo. A escolha dos preparados histológicos, corados previamente pelo método do HE, foi realizada de modo a estabelecer os critérios de exclusão para alguns tumores, sendo excluídos os que apresentavam grandes áreas de necrose.

Os tumores eleitos, fixados em solução de formol neutro 10% e incluídos em parafina, foram cortados na espessura de 5µm e colocadas sobre lâminas revestidas por organossilano (3- aminopropil-trietoxissilano-SIGMA). As lâminas foram então colocadas em estufa a 60°C por 60 minutos, e logo após mergulhadas em xilol aquecido a 60°C por 10 minutos, mergulhando-as em 3 gradientes de xilol PA, com mergulhos de 1 minuto cada, e por 3

gradientes de álcool PA e 1 gradiente de álcool a 80%, 1 minuto cada mergulho e então lavadas em água corrente por 10 minutos.

Após desparafinar e hidratar, procedeu-se a recuperação antigênica. Esta foi realizada em solução de 10mmol de Tris adicionado de EDTA 1mmol (pH 8), por fervura em microondas durante 8 minutos, deixando esfriar em seguida. Foi então realizado bloqueio da peroxidase endógena utilizando H₂O₂ a 3% por 10 minutos. O tecido da lâmina foi delineado por caneta hidrofóbica e incubado com os anticorpos primários CD-31 (PECAM-1 -M20 - SC-1506 -camundongo em cabra - SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC) na solução de diluição (Dako antibody diluente Voth background reducing components) na concentração de 1:200, *overnight* (20 -24h), sob 4°C em câmara úmida (**figura 19**).

Figura 19: Anticorpos primários e secundários usados na imunohistoquímica.



A- Frasco de 1mL (PECAM -1) e

B- Reagente amarelo (streptavidina-biotina) e reagente vermelho (streptavidina + peroxidase) do Kit LSAB Sistem - HRP Dako®.

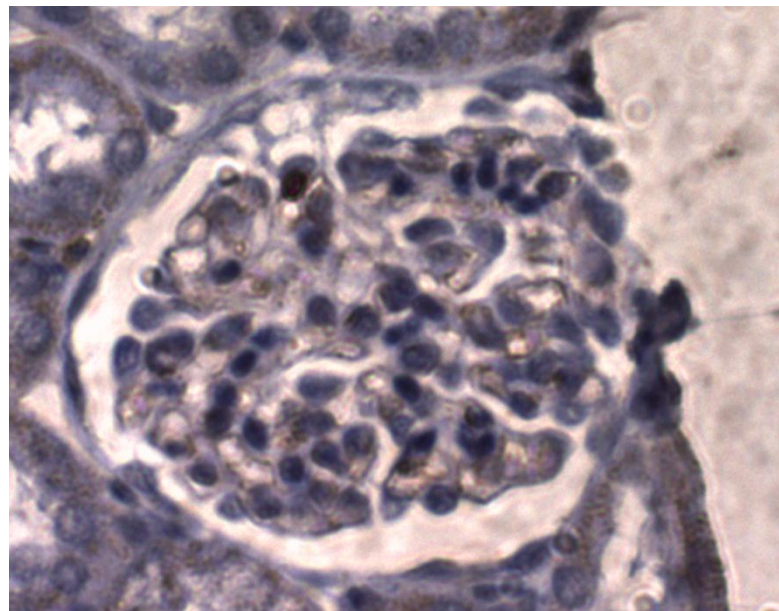
Após a incubação, os cortes foram lavados com solução de Tris pH 7,6 por 1 minuto e incubados com anticorpo secundário, bionilado anticabra, coelho e camundongo, produzido em porco (o reagente amarelo do *kit* streptavidina-biotina – Kit LSAB Sistem - HRP Dako) em câmara úmida por 30 minutos, a temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram

novamente lavadas em PBS, por 1 minuto cada, e, logo após, incubadas por mais 30 minutos com o reagente vermelho do mesmo *kit*, contendo streptovidina + peroxidase.

A reação foi revelada com o cromógeno DAB (3,3' Diaminobenzidina Tetrahydroclorido), diluído em solução apropriada do *kit*, sendo contracorada com hematoxilina de Carazzi. Procedeu-se à hidratação dos tecidos com mergulhos sucessivos em 3 gradientes de álcool PA e 1 gradiente de álcool a 80%, seguidos de 3 gradientes de xilol PA, por 1 minuto. Montada com lamínula, sob gota de bálsamo do Canadá, as lâminas foram então analisadas ao microscópio sob aumento de 200 x, escolhendo-se 3 campos com maior concentração de vasos (*hot spot*) intratumorais e peritumorais próximos à invasão do tumor, excluindo os vasos com camada muscular.

O controle negativo foi confeccionado omitindo-se o anticorpo primário, não sendo evidenciadas marcações. Foi utilizado como controle positivo o rim de rato, com marcação bem definida em marrom escuro na parede dos vasos capilares (**figura 20**).

Figura 20: Rim de rato imunocorado com capilares glomerulares marcados por anti- PECAM-1 (anti-CD-31) controle positivo – aumento de 400 x.



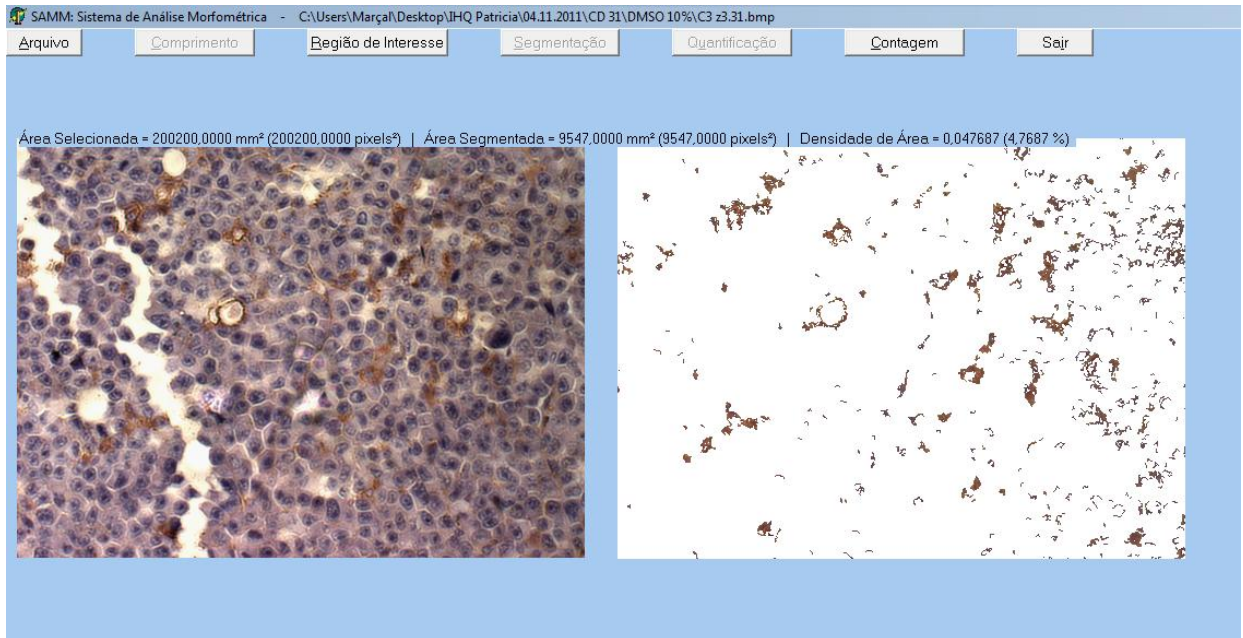
- *Quantificação da Angiogênese Tumoral*

Imagens digitais dos preparados histológicos foram capturadas de forma padronizada, utilizando-se, para tanto, um microscópio de luz invertido (AXIOVERT 40C – ZEISS) equipado com uma câmera digital (Axiocam ICc3 – Carl Zeiss Vision). O procedimento compreendeu, inicialmente, uma varredura do tumor, utilizando o pequeno aumento (40 vezes), com a finalidade de identificar as zonas de maior densidade vascular (zonas quentes) (WEIDNER, 1995).

Para cada tumor, selecionaram-se três zonas quentes. Em seguida, utilizando uma magnificação de 200 vezes, foram capturadas imagens digitais coloridas dos campos relativos às três zonas quentes escolhidas. As imagens foram armazenadas no formato Windows® Bitmap (BMP), com as dimensões de 512 x 384 *pixels*, cada *pixel* correspondendo a 24 *bits*, de acordo com o modelo de cores RGB (*Red, Green, Blue*).

As imagens foram analisadas pelo Sistema de Análise Morfométrica (SAMM), um programa de computador desenvolvido especificamente para tal finalidade (FECHINE-JAMACARU, 2006). O sistema foi previamente calibrado para reconhecer o espectro de cores relativo às estruturas de interesse (microvasculatura), de acordo com a técnica de coloração empregada. Esse procedimento habilitava o *software* a identificar e segmentar automaticamente os vasos sanguíneos (separando-os dos demais componentes do preparado), tanto na imagem inteira como numa região de interesse definida pelo operador. Todavia, uma segmentação interativa era também disponibilizada, possibilitando, assim, a definição de novos parâmetros de segmentação, caso o pesquisador julgasse como inadequado o resultado do procedimento automático (**figura 21**). Desta forma algumas imagens foram descartadas, caso a atribuição de segmentação fosse realizada quando o *software* revelasse muitas marcações inespecíficas ou até mesmo a quantidade de iluminação na foto fosse insuficiente. Concluída a segmentação, o *software* realizava a determinação da densidade microvascular no campo estudado. Para tanto, calculava a densidade de área, que era definida pelo quociente entre a área ocupada pela microvasculatura e a área total do campo analisado (**figura 21**). (DORNELAS, 2009).

Figura 21: Ambiente do *software* SAMM. Microvasos Intratumorais - Cálculo da densidade de área (densidade microvascular): Área total ocupada pela microvasculatura dividida pela área total do campo analisado.



- *Análise dos dados*

Comparações entre os grupos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA), baseada em um fator (*one-way analysis of variance*), associada ao teste de comparações múltiplas de Dunnett, para identificar diferenças entre os grupos (dados paramétricos, na densidade microvascular, comprimento e números de vasos).

O *software* GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows® (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2007) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.

4. RESULTADOS

Esta tese foi desenvolvida com base em resultados prévios obtidos pela parceria do grupo de pesquisa da Universidade Federal do Pernambuco (UFPE), liderado pela professora Ana Cristina Leite, que elucidou as moléculas dos novos análogos da talidomida, com o grupo de pesquisa da UFC, liderado pela professora Cláudia Pessoa que realizou, inicialmente (dados presentes no artigo publicado em 2010), os testes para elucidação do mecanismo de ação. Esses resultados prévios, juntamente com o artigo, estão disponíveis nos Anexos A e B.

4.1 Estudo da Atividade Citotóxica

4.1.2 Atividade antiproliferativa in vitro em células tumorais humanas - Teste do MTT

O estudo da atividade citotóxica da talidomida e seus análogos foi realizado em células tumorais humanas de HL-60, HCT-8, SF 295 e MDA MB 435. Esse estudo foi analisado pelo método colorimétrico do MTT. Após 72 horas de exposição, como apresentado na **tabela 3**, nenhum dos análogos, inclusive a talidomida, apresentaram potencial citotóxico antitumoral *in vitro*. Sendo o menor valor de CI_{50} obtido para a talidomida, $40,3\mu\text{g/mL}$ (30,3-54) na linhagem tumoral de HL-60. Os demais valores de inibição foram acima de $100\mu\text{g/mL}$.

Tabela 3: Atividade citotóxica *in vitro* da Talidomida e seus análogos sintéticos. Ensaio do MTT usando células tumorais.

Linhagens Celulares - CI_{50} $\mu\text{g/mL}$ (95%)*				
Compostos	MDA-MB435	HCT-8	SF-295	HL-60
Doxorrubicina	0,83 (0,83-1,6)	0,83 (0,83-1,6)	1,9 (1,5-2,0)	1,6 (0,83-1,6)
Talidomida	>100	>100	>100	40,3 (30,3-54)
2a (SC-10)	>100	>100	74,3 (49-75)	72 (39,6-106,6)
2b (SC-11)	>100	>100	>100	>100
2c (SC-15)	>100	>100	>100	>100
2d (SC-14)	>100	>100	>100	58,6 (52-65,3)
2e (SC-16)	>100	>100	>100	>100
3a (SC-13)	>100	>100	>100	>100
2f (SC-17)	>100	>100	>100	>100
3b (SC-18)	>100	>100	>100	>100

Atividade citotóxica *in vitro* da Talidomida e seus análogos sintéticos em 4 linhagens tumorais avaliadas pelo ensaio do MTT, 72 h. * Valores originados de 2 experimentos independentes e apresentados em valores de CI_{50} obtidos por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95% gerados no programa GraphPad Prism 5.0.

4.1.3 Atividade antiproliferativa *in vitro* em células Sarcoma 180 e Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) - Teste do Alamar Blue

Para avaliação do potencial citotóxico *in vitro* das células obtidas por cultura primária (Sarcoma 180 e CMSP), foi usado o ensaio do Alamar Blue. Após 72 horas de exposição com as amostras, apenas o análogo 14 apresentou potencial citotóxico antitumoral *in vitro*, com IC_{50} de $11,3\mu\text{g/mL}$ (7,8 – 16,5). Os demais valores de inibição de crescimento celular observados nesta linhagem foram maiores que $100\mu\text{g/mL}$. Na linhagem humana de sangue periférico somente o análogo 18 foi citotóxico, com IC_{50} de $26,6\mu\text{g/mL}$ (19,6-30,9). Os demais valores de inibição de crescimento celular observados nesta linhagem (PBMC) foram maiores que $100\mu\text{g/mL}$.

Tabela 4: Atividade citotóxica *in vitro* da Talidomida e seus análogos sintéticos. Ensaio do Alamar Blue usando células de cultura primária - Sarcoma 180 e CMSP

Linhagens Celulares - CI_{50} $\mu\text{g/mL}$ (95%)*		
Compostos	Sarcoma 180	CMSP
Doxorrubicina	0,26 (0,15-0,45)	0,97 (0,52-1,80)
Talidomida	>100	90,7 (83,6-98,6)
SC-10	>100	>100
SC-11	>100	>100
SC-13	>100	>100
SC-14	11,3 (7,8-16,5)	>100
SC-15	>100	>100
SC-16	>100	>100
SC-17	>100	>100
SC-18	>100	26,6 (19,6-30,9)

Atividade citotóxica *in vitro* da Talidomida e seus análogos sintéticos em linhagens tumoral (camundongo) e de linfócitos do sangue periférico (humano) avaliadas pelo ensaio do Alamar Blue, 72 h. * Valores originados de 2 experimentos independentes e apresentados em valores de CI_{50} obtidos por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95% gerados no programa GraphPad Prism 5.0.

4.2 Atividade hemolítica em eritrócitos de camundongo *Mus musculus swiss*

Usando eritrócitos isolados do plexo orbital de camundongos, a talidomida e seus análogos foram testados quanto a possível atividade hemolítica. Nenhum dos compostos analisados, incluindo a talidomida, apresentou potencial hemolítico, até a concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ (dados não apresentados).

4.3 Avaliação da atividade antitumoral da talidomida e seus análogos em camundongos transplantados com Sarcoma 180

A avaliação da atividade antitumoral da talidomida e seus análogos foi realizada em camundongos *Mus musculus* Swiss utilizando o modelo experimental do Sarcoma 180. Após

24h de inoculação do tumor, os compostos foram administrados nos animais pela via intraperitoneal (50mg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos. No 8º dia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e dissecados para a retirada do tumor, fígado, baço e rins.

Na dose testada, apenas a talidomida e os compostos SC-10, SC-11 foram capazes de diminuir significativamente o crescimento da massa tumoral em relação ao controle negativo (DMSO 10%). O peso médio dos tumores dos animais tratados com DMSO 10% foi de $2,11 \pm 0,18$ g, enquanto que nos animais tratados com 50mg/kg/dia da talidomida e dos compostos SC-10 e SC-11 por via intra-peritoneal foi de $0,98 \pm 0,15$ g, $0,67 \pm 0,12$ g, $0,69 \pm 0,09$ g, respectivamente. Dessa maneira foi possível determinar os percentuais de inibição do crescimento tumoral. Os compostos SC-10 e SC-11 administrados por via i.p. inibiram em 67,9% e 67,4% o crescimento do tumor, respectivamente. O 5-FU inibiu em 83,9% o crescimento tumoral e a talidomida 53,5% (**tabela 6**).

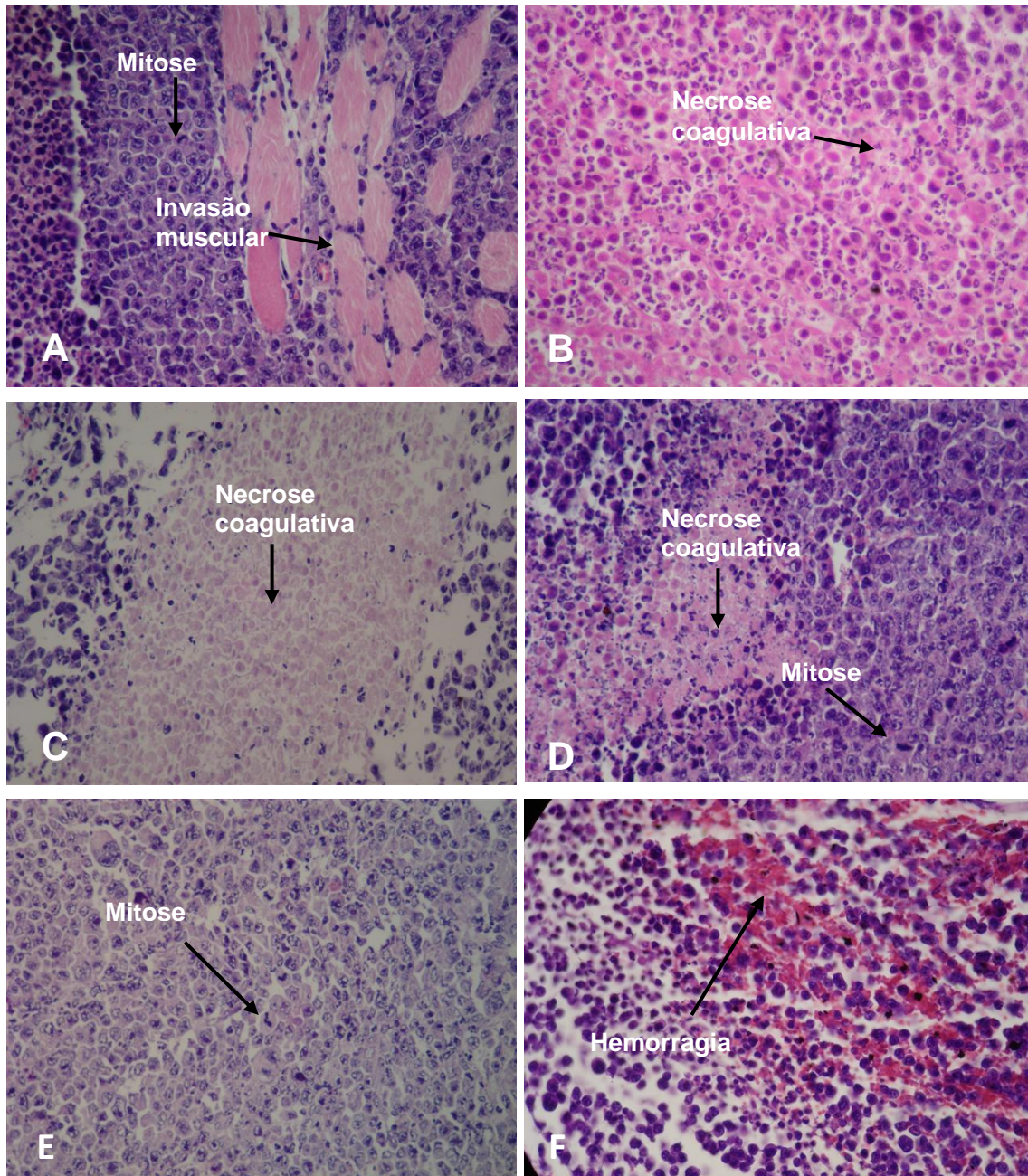
Na análise histopatológica do tumor, de forma geral, em todos os grupos foram encontradas células poligonais exibindo pleomorfismo celular, com critérios de invasão revelados pela presença de anisocariose. A neoplasia apresentou alto índice mitótico, invasão muscular (**figuras 22A e E**) e áreas de necrose de coagulação (**figuras 22B e C**) e hemorragia (**figura 22F**). Nos grupos tratados foi observado um aumento nas áreas de necrose de coagulação (**figuras 22C e D**).

Tabela 5: Efeito da talidomida e seus análogos ftalimídicos na doses de 50 mg/Kg/dia i.p. sobre a proliferação tumoral de camundongos (*Mus musculos*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 após 7 dias de tratamento.

Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	Animal peso (g)	Fígado	Rim	Baço	Tumor (g)	Inibição tumoral (%)
			g/100g peso corporal				
Controle	-	31.38 ± 1.25	5.26 ± 0.14	1.38 ± 0.03	0.55 ± 0.05	2.11 ± 0.18	-
5-FU	25	24.60 ± 0.40*	4.86 ± 0.27	1.28 ± 0.03	0.22 ± 0.01*	0.34 ± 0.04*	83.9 ± 2.3*
Talidomida	50	29.00 ± 0.94	4.93 ± 0.09	1.38 ± 0.02	0.46 ± 0.03	0.98 ± 0.15*	53.5 ± 7.2*
SC-10	50	29.38 ± 0.82	5.20 ± 0.16	1.50 ± 0.06	0.49 ± 0.03	0.67 ± 0.12*	67.9 ± 6.0*
SC-11	50	30.33 ± 0.76	5.13 ± 0.16	1.42 ± 0.04	0.73 ± 0.05*	0.69 ± 0.09*	67.4 ± 4.6*
SC-13	50	29.77 ± 1.83	5.47 ± 0.12	1.32 ± 0.04	0.54 ± 0.05	1.66 ± 0.35	28.9 ± 16.6
SC-14	50	29.67 ± 1.40	5.30 ± 0.16	1.40 ± 0.08	0.51 ± 0.02	1.74 ± 0.28	17.9 ± 12.5
SC-15	50	30.50 ± 0.89	5.67 ± 0.24	1.39 ± 0.06	0.69 ± 0.05	1.69 ± 0.22	20.1 ± 10.6
SC-16	50	30.50 ± 1.16	6.03 ± 0.33	1.42 ± 0.09	0.71 ± 0.06	1.68 ± 0.19	20.6 ± 8.9
SC-17	50	30.00 ± 0.00	5.94 ± 0.21	1.43 ± 0.07	0.69 ± 0.05	1.90 ± 0.16	10.4 ± 7.6
SC-18	50	31.43 ± 0.92	5.94 ± 0.26	1.39 ± 0.05	0.82 ± 0.08*	1.49 ± 0.28	29.6 ± 13.1

C: o controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 10%). 5-FU: o 5-Fluorouracil foi utilizado como controle positivo. Os valores correspondem à média ± E.P.M. de 10 animais. *p < 0,01, comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnet.

Figura 22. Fotomicrografia dos tumores Sarcoma 180 removidos dos camundongos submetidos ao tratamento de sete dias com os análogos ftalimídicos e a talidomida.



A: Controle (10 % DMSO); B: 5-FU (25 mg/kg/day); C: SC-10 (50 mg/kg/day); D: SC-11 (50 mg/kg/day) e E: Talidomida (50 mg/kg/day). F: Áreas hemorrágicas encontradas em alguns tumores. Coloração por HE. Aumento de 400x.

4.3.1 Análise histopatológica dos órgãos

Não houve alteração do peso relativo do fígado e do rim, entre os animais dos grupos tratados com a talidomida e os análogos (**tabela 5**). Apenas para os grupos SC-11 ($0.73 \pm 0.05^*$) e SC-18 ($0.82 \pm 0.08^*$) houve aumento significativo do peso relativo dos baços quando comparado ao grupo controle ($0.55\% \pm 0.05$). Enquanto que, para o grupo controle positivo tratado com 5-fluorouracil, houve redução significativa do peso relativo deste órgão ($0.22 \pm 0.01^*$). $*p < 0,01$.

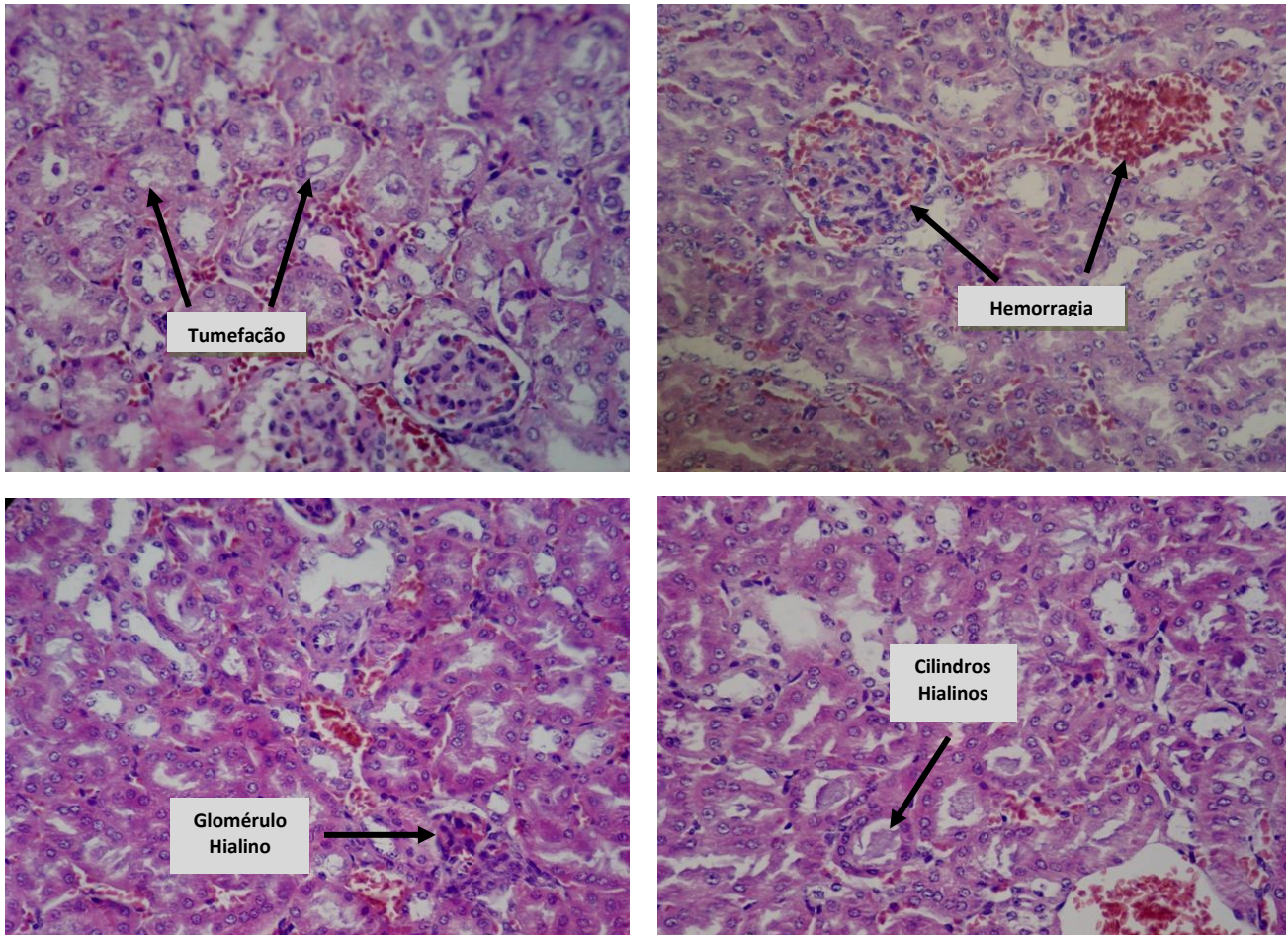
De forma geral foi observado na histologia dos rins: hemorragia glomerular e intersticial, presença de cilindrohialinos, principalmente nos animais do grupo SC-16, intensa tumefação celular do epitélio dos túbulos proximais com degeneração hidrópica (**figura 23**).

A histologia dos baços não revelou muitas alterações microscópicas e de maneira geral foi observada a presença de muitos megacariócitos com preservação da arquitetura das polpas branca e vermelha, mesmo nos grupos SC-11 e SC-18, que tiveram um significativo aumento do peso relativo. Em alguns grupos como o SC-16 e SC-17 foi notada uma certa congestão da polpa vermelha, com desorganização da polpas. Pigmentos de hemossiderina também foram encontrados (**figura 24**).

Na análise do fígado, foi detectada, para todos os grupos, hiperplasia das células de Kupffer. Foram observadas intensa tumefação celular e áreas de necrose em hepatócitos no grupo tratado com o grupo SC-16. Focos inflamatórios e esteatose microvesicular focal, foram encontrados em todos os grupos (**figura 25**).

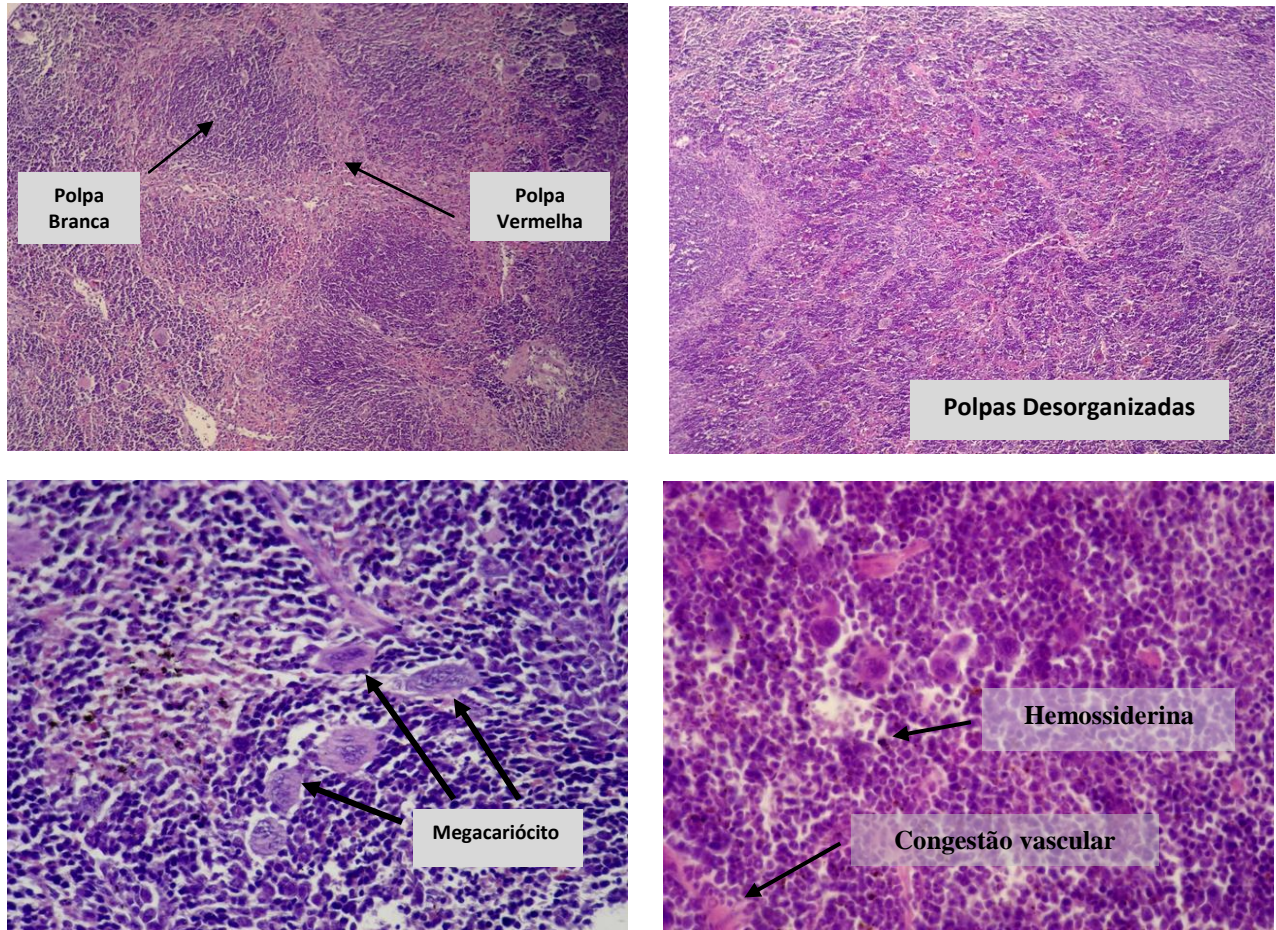
Esses achados demonstram que os compostos testados apresentaram indícios de toxicidade hepática, caracterizada principalmente pela esteatose microvesicular. Todas essas alterações encontradas apresentam caráter de reversibilidade, com exceção das áreas de necrose tecidual nos fígados dos animais do grupo SC-16, além disso, em todas as amostras o parênquima hepático e a arquitetura glomerular estavam preservados.

Figura 23: Fotomicrografia mostrando as principais alterações histológicas renais.



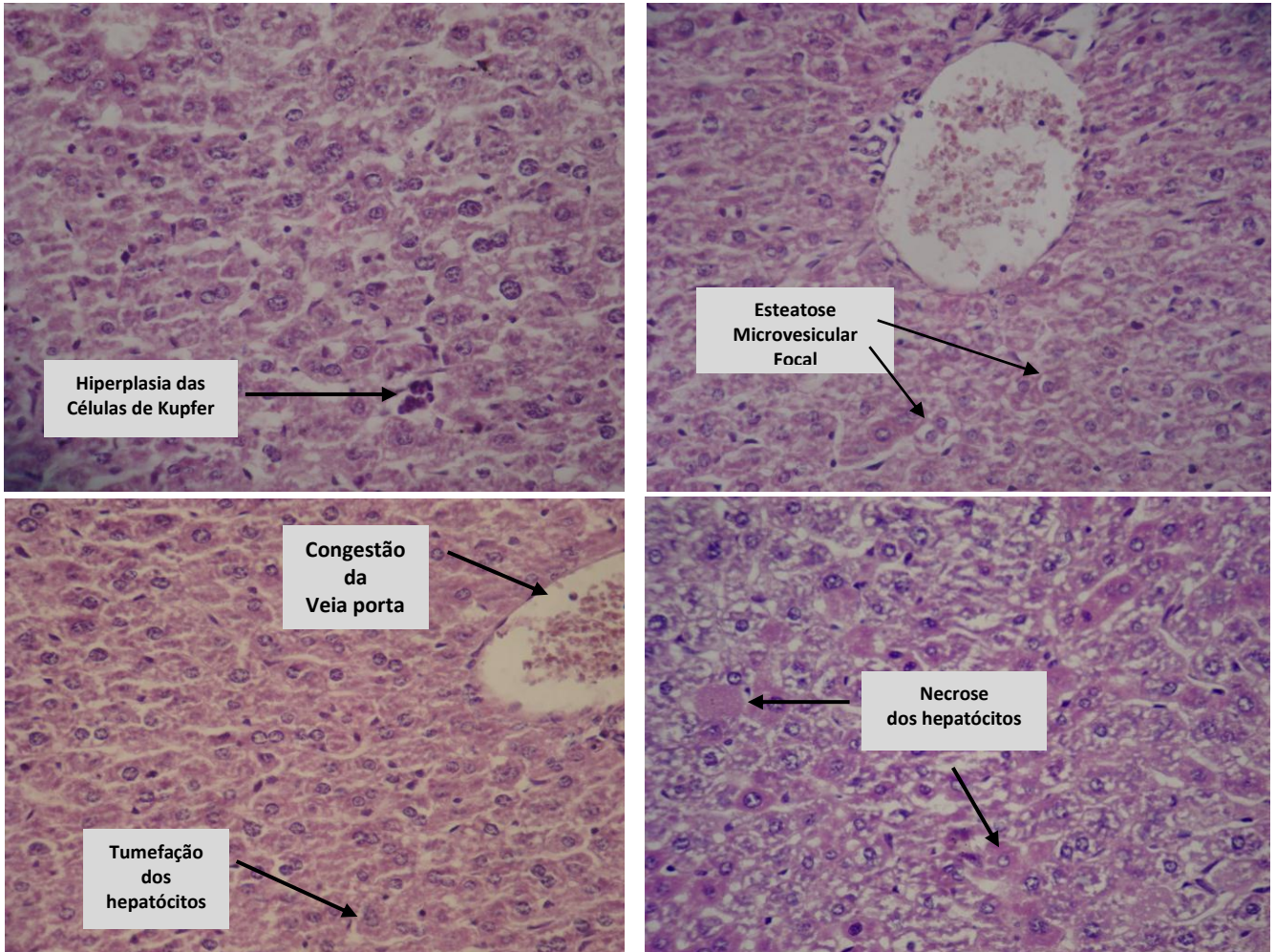
Rins de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias representativos do tratamento com a talidomida e seus análogos. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 200x.

Figura 24: Fotomicrografia mostrando as principais alterações histológicas esplênicas.



Baços de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias representativos do tratamento com a talidomida e seus análogos. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 100 x e 200x.

Figura 25: Fotomicrografia mostrando as principais alterações histológicas hepáticas.



Fígados de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantedos com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias representativos do tratamento com a talidomida e seus análogos. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 200x.

A partir deste experimento de avaliação da atividade antitumoral, foram eleitos os análogos mais ativos na redução do volume tumoral (**SC-10 e SC-11**), para elucidação do mecanismo de ação, permanecendo a **Talidomida** como droga padrão para todos os ensaios.

4.4 Avaliação do potencial genotóxico em células mononucleadas de sangue periférico (CMSP): Ensaio do Cometa

A avaliação do potencial genotóxico em células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP), tratadas com a talidomida e os análogos SC-10 e SC-11, foi realizada pelo ensaio do cometa em condições alcalinas. A **tabela 6** mostra que nenhum dos compostos testados mostraram potencial em induzir dano à fita de DNA, portanto não foram genotóxicos em CMSP humanas. Já a doxorrubicina induziu um dano de $212,0 \pm 2,05$ nas células, $p < 0,01$.

Tabela 6: Avaliação do potencial genotóxico da talidomida e dos análogos SC-10 e SC-11 em CMSP humanas (células mononucleares do sangue periférico) pelo ensaio do cometa, após 24 h de incubação.

Substâncias	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Índice de Dano (ID)
Controle	-	$20,5 \pm 2,05$
Doxorrubicina	0,3	$212,0 \pm 2,12^*$
Talidomida	50	$25,33 \pm 1,20$
	100	$24,25 \pm 3,79$
SC-10	50	$14,75 \pm 4,49$
	100	$24,75 \pm 2,17$
SC-11	50	$19,00 \pm 3,89$
	100	$11,00 \pm 3,08$

A tabela apresenta os valores correspondentes à média \pm E.P.M. de dois experimentos independentes realizados em duplicata, obtidos a partir da contagem de 400 células por experimento. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. *, $p < 0,01$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett's.

4.5 Estudos por citometria de fluxo

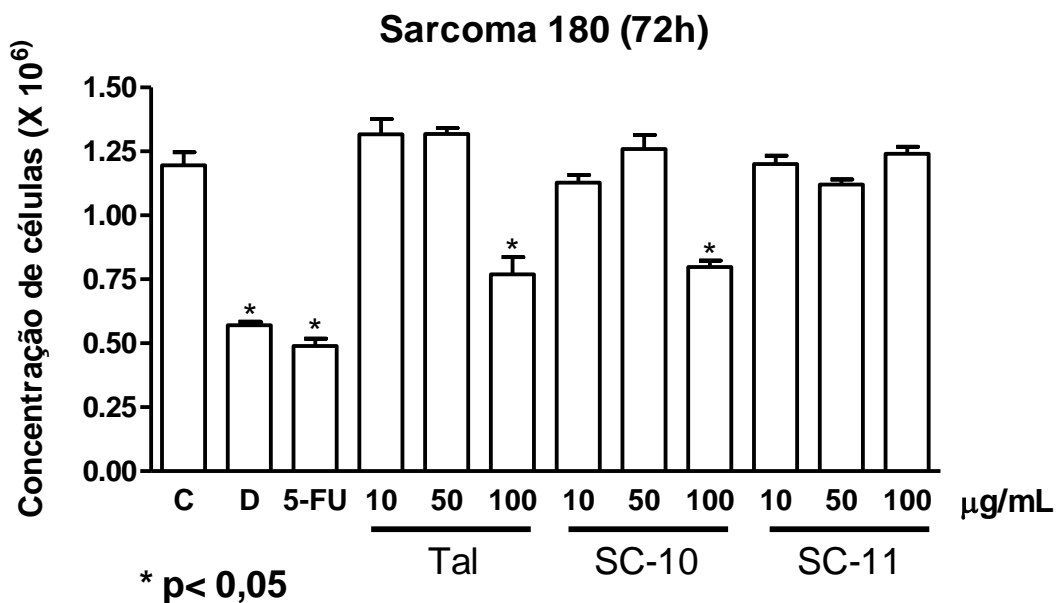
A integridade da membrana celular, a concentração de células e a fragmentação de DNA, foram avaliadas utilizando o método da citometria de fluxo. As análises descritas a seguir foram realizadas de forma que a talidomida e os análogos foram adicionados sobre as

culturas, 24h após o plaqueamento das células, sendo o tempo de incubação de 72 horas usado para todos os testes de citometria. Todos os compostos foram testados nas concentrações de 10, 50 e 100µg/mL.

4.5.1 Integridade de membrana celular e concentração de células por citometria de fluxo

Como mostrado na **figura 26** a talidomida e o análogo 10 causaram diminuição do número de células de 35,57% e 33,9% na maior dose testada (100µg/mL). A doxorubicina (DOX) e o 5 fluorouracil (5-FU), utilizados como controle positivo, mostraram uma diminuição acentuada do número de células, 52,31 e 59,84%, respectivamente.

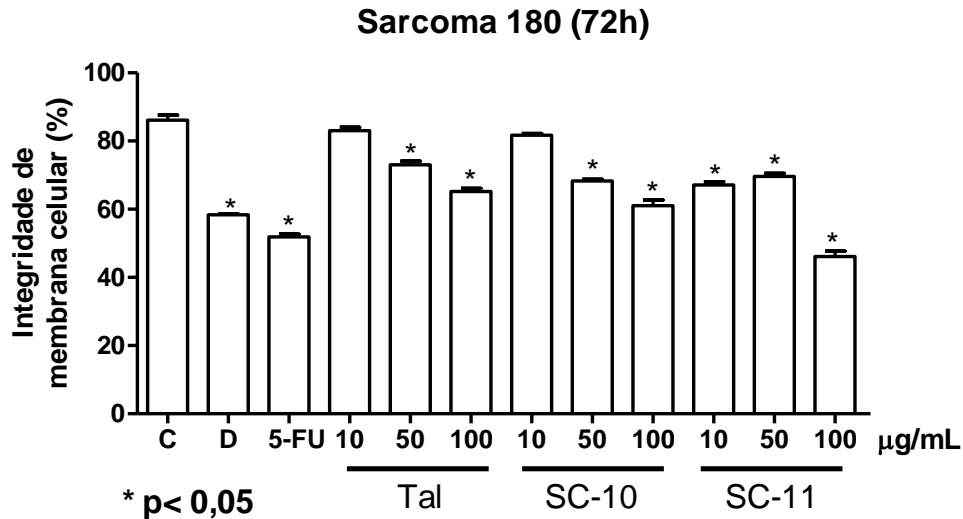
Figura 26: Efeito da talidomida e dos análogos 10 e 11 sobre a densidade celular em cultura primária de Sarcoma 180.



Análise realizada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 72 horas de incubação. O controle negativo (Controle) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (50ng/mL) e 5-Fluorouracil (0,35µg/mL) foram utilizados como controle positivo (D e 5-FU). Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. **p < 0,05 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

Já na avaliação da integridade de membrana utilizando o corante iodeto de propídeo, corante hidrofílico permeável somente em células com a membrana rompida, mostrou que, na menor concentração testada (10µg/mL) apenas o composto 11 desencadeou perda da integridade de membrana em cerca de 33%, enquanto que nas maiores concentrações (50 e 100µg/mL) houve uma considerável e significativa perda da integridade de 31,7% e 39% para SC-10 e de 30,4% e 53,9% para SC-11 nas concentrações de 50 e 100µg/mL, respectivamente (**figura 27**). Esses dados justificam em parte a necessidade de altas doses sobre as culturas de células in vitro para desencadeamento de mecanismos citotóxicos, demonstrados nos testes de MTT em outras linhagens tumorais. A Doxorrubicina (DOX) e o 5-Fluorouracil (5-FU), utilizados como controles positivos, mostraram uma perda da integridade de membrana em 41,6% e 48,1%, respectivamente.

Figura 27: Efeito da talidomida e dos análogos 10 e 11 sobre a integridade de membrana celular da cultura primária de Sarcoma 180.

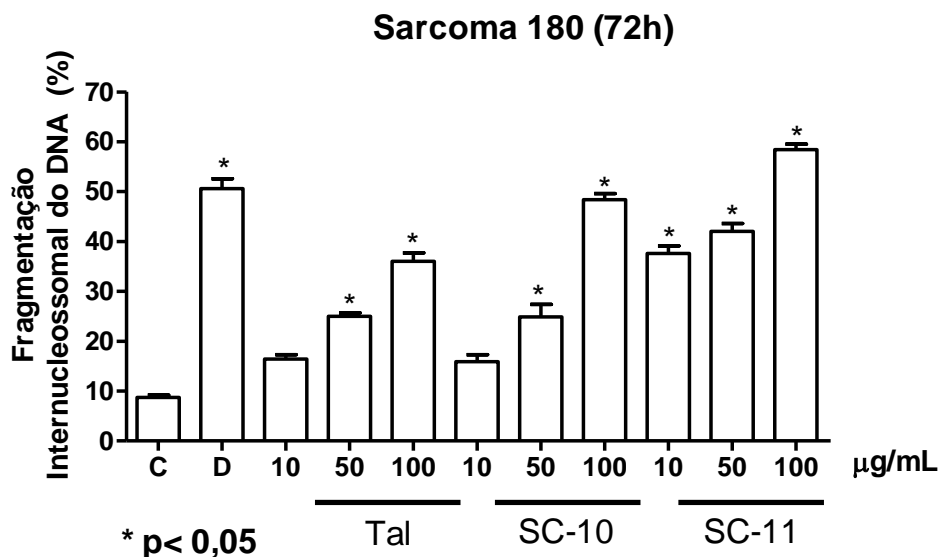


Análise realizada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 72 horas de incubação. O controle negativo (Controle) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorrubicina (50ng/mL) e 5-Fluorouracil (0,35µg/mL) foram utilizados como controle positivo (D e 5-FU). Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. ** $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.5.2 Análise de fragmentação de DNA

A fragmentação internucleossomal do DNA das células da cultura primária do Sarcoma 180, tratadas com a talidomida e os análogos 10 e 11, foram realizadas por citometria de fluxo. Os resultados demonstram que tanto o controle positivo (D) quanto nas duas maiores concentrações, a talidomida e os dois análogos causaram aumento significativo na fragmentação do DNA. Apenas o análogo 11 fragmentou o DNA na menor concentração. Após 72 horas de exposição, as células do controle negativo apresentaram 8,7% de fragmentação, enquanto que, as células tratadas com a talidomida, SC-10 e SC-11 nas concentrações de 50 e 100µg/mL apresentaram 25 e 36%; 24,9 e 48,4% e 42 e 58,4% de fragmentação do DNA, respectivamente. Já a Doxorrubicina, utilizada como controle positivo mostrou 50,6% das células com DNA fragmentado (**figura 28**).

Figura 28: Efeito da talidomida e dos análogos 10 e 11 sobre a fragmentação de DNA em células da cultura primária de Sarcoma 180.



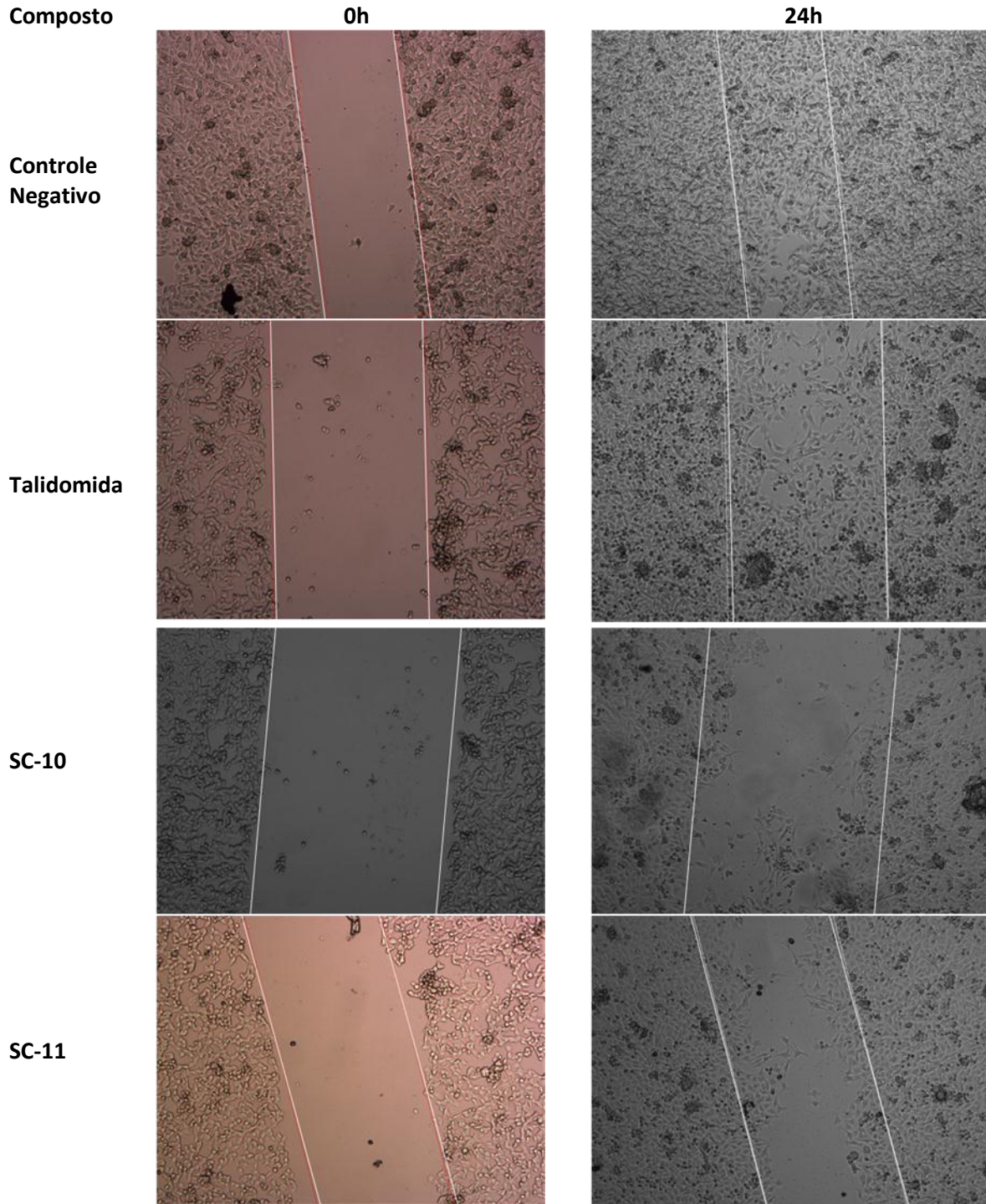
Análise realizada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 72 horas de incubação. O controle negativo (Controle) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorrubicina (0,35µg/mL) foi utilizada como controle positivo (D). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de dois experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. ** $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.6 Ensaio de migração de células endoteliais – Wound Healing

A fim de avaliar o efeito inibitório da proliferação de células endoteliais em modelos *in vitro*, os análogos ftalimídicos foram testados quanto à capacidade de inibição migratória em HUVEC e MDA-MB 435 (figuras 29 e 30).

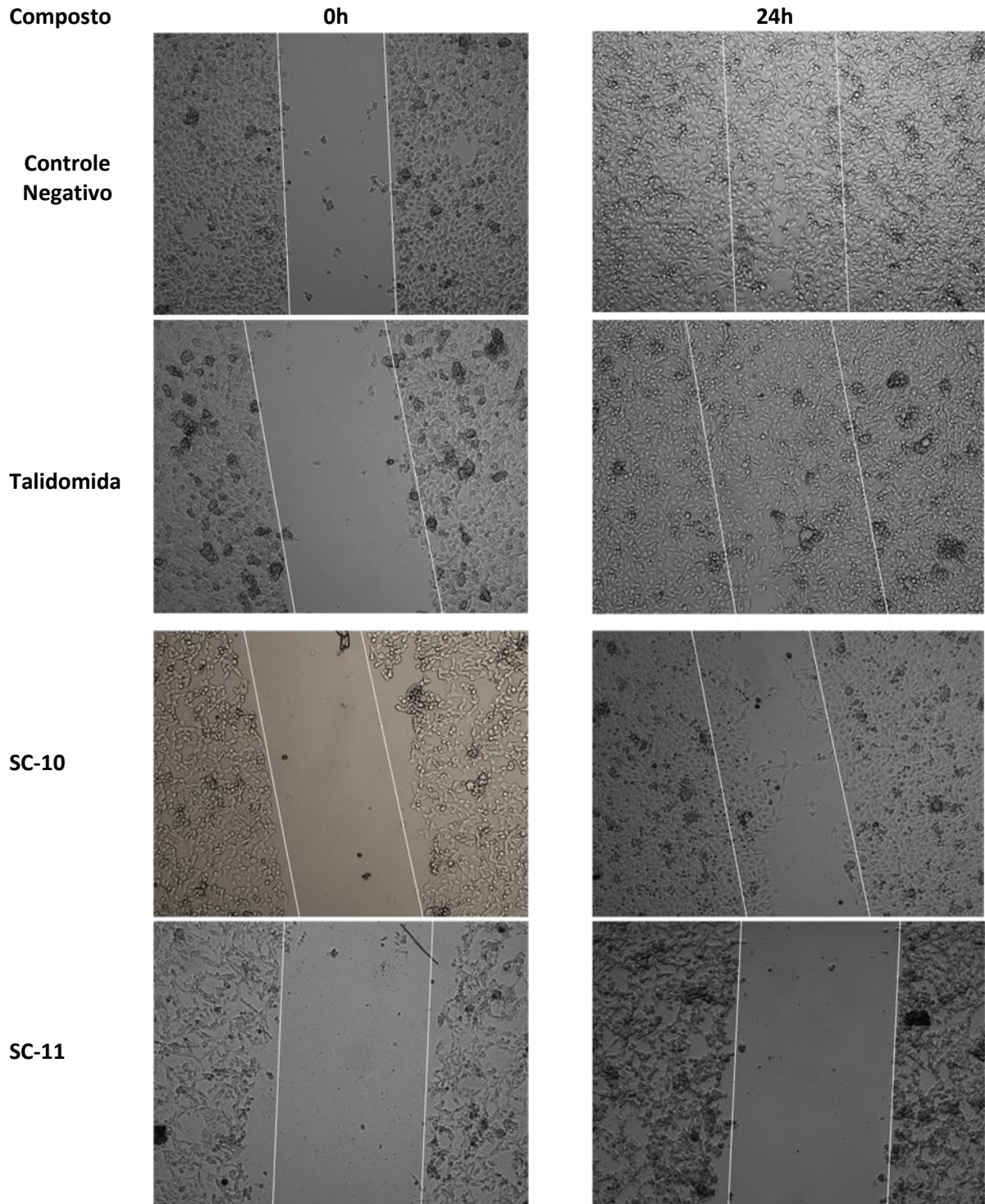
Nas duas linhagens testadas, os dois análogos foram capazes de inibir a migração celular para dentro da fenda (cicatriz) na concentração de **50µg/mL**. Enquanto para a linhagem endotelial o análogo SC-10 causou uma inibição maior ($65,28\% \pm 1,58$), na linhagem tumoral o efeito maior foi o do análogo SC-11 ($98,51\% \pm 0,25$) (figuras 31A e B). A talidomida não foi capaz de reduzir a migração celular em nenhuma das linhagens testadas.

Figura 29: Efeito da talidomida e seus análogos sobre a proliferação de células endoteliais humanas (HUVEC), antes e depois da adição dos compostos (50µg/mL).



Os poços foram pré-tratados com 5µg/mL de mitomicina C por 15 minutos. O controle negativo recebeu apenas o meio EBM usado como veículo para diluição dos compostos. Aumento de 100x.

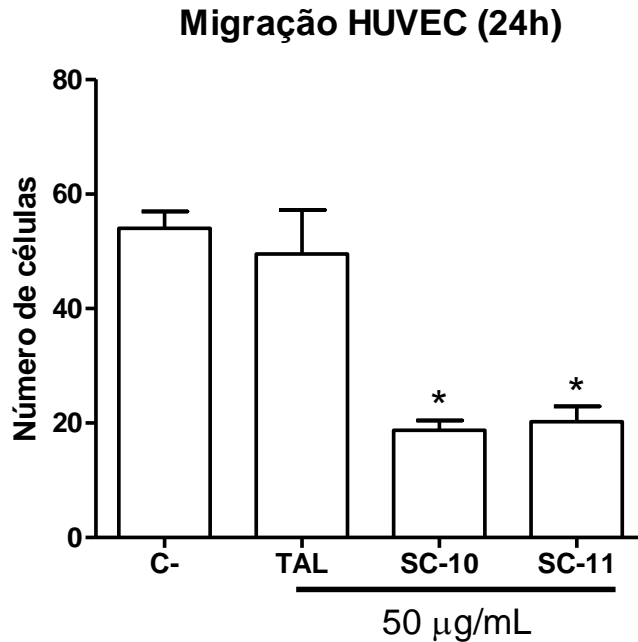
Figura 30: Efeito da talidomida e seus análogos sobre a proliferação de células tumorais humanas (MDA MB-435), antes e depois da adição dos compostos (50µg/mL).



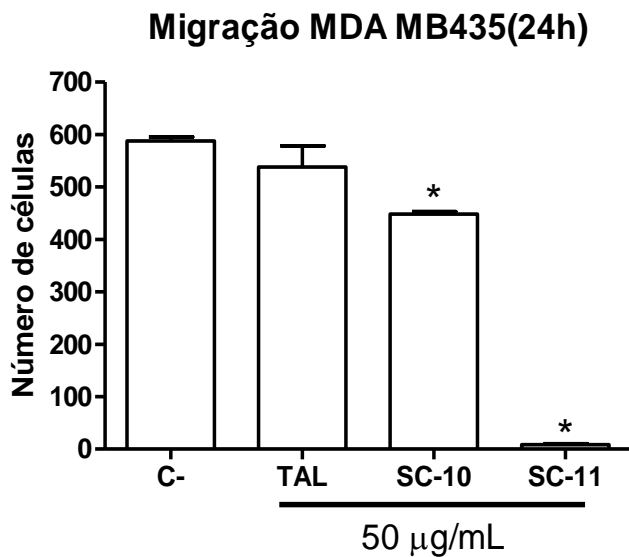
Os poços foram pré-tratados com 5µg/mL de mitomicina C por 15 minutos. O controle negativo recebeu apenas o meio RPMI usado como veículo para diluição dos compostos. Aumento de 100x.

Figura 31: Efeito da talidomida e dos análogos 10 e 11 sobre a migração celular no ensaio *Wound Healing*. O efeito na migração celular foi medido 24h após adição dos compostos, (50 $\mu\text{g/mL}$).

A



B



A - O controle negativo (C-) foi tratado com meio EBM utilizado para diluir as substâncias testadas.

B - O controle negativo (C-) foi tratado com meio RPMI utilizado para diluir as substâncias testadas.

Os gráficos apresentam os valores correspondentes à média \pm E.P.M. de dois experimentos independentes realizados em duplicata, obtidos a partir da contagem das células que invadiram a cicatriz. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett's.

4.7 Ensaio de angiogênese na membrana corioalantóica do embrião de galinha

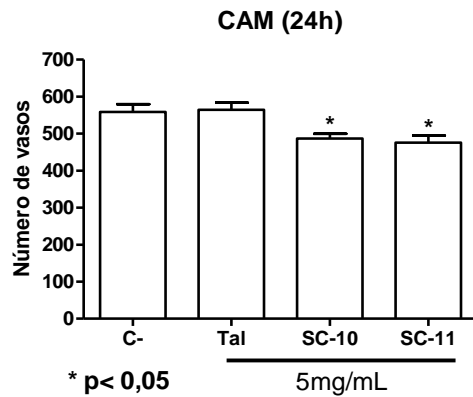
Para avaliar se o efeito antitumoral *in vivo* da talidomida e dos análogos demonstrados anteriormente estava correlacionado com a inibição da formação de vasos, estes foram submetidos, com auxílio de dispositivos impregnados com os compostos testes, ao ensaio na membrana corioalantóide do embrião de galinha, método *in ovo*.

Este método possui, dentre as diversas vantagens eleitas sobre a técnica *ex ovo*, uma maior viabilidade dos embriões e a possibilidade de reflexão das condições fisiológicas do animal sobre o processo da neovascularização, sendo considerado assim um método *in vivo* de avaliação do potencial antiangiogênico (VARGAS et al., 2007).

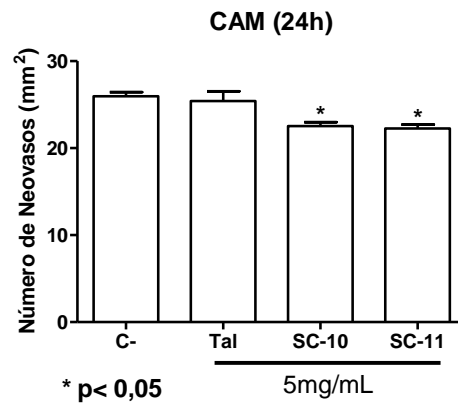
Para nenhum composto foi observado potencial antiangiogênico na dose de 1mg/mL (dado não apresentado), enquanto que na concentração de 5mg/mL os análogos SC-10 e SC-11 conseguiram inibir de forma significativa o número de vasos ($12,88\% \pm 2,3$ e $14,81\% \pm 3,3$), a área de neovascularização ($13,14\% \pm 1,7$ e $14,26\% \pm 1,7$) e o comprimento total de vasos em mm^2 ($9,19\% \pm 1,5$ e $9,86\% \pm 1,9$), como mostram as **figuras 32 A, B e C**. A talidomida, nesta mesma dose, não foi capaz de inibir a vascularização embrionária.

Figura 32: Efeito da talidomida e dos análogos 10 e 11 sobre a angiogênese embrionária, no ensaio da membrana corioalanoide (CAM) *in ovo*.

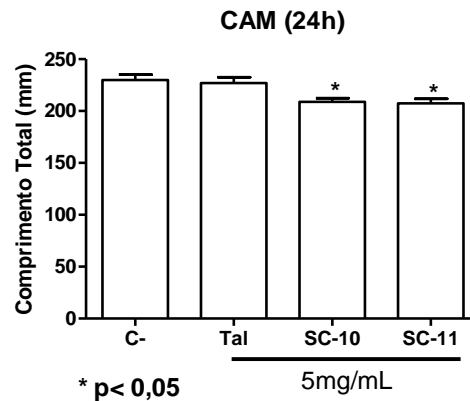
A



B



C



A análise da membrana corioalanoide (CAM) foi realizada *in ovo*, 24 h após adição dos compostos, (5mg/mL).

A - Quantificação do número de vasos;

B - Quantificação da área de neovascularização e

C - Comprimento total dos vasos (mm²).

Os gráficos apresentam os valores correspondentes obtidos pelo software SQAN a partir da média dos quatro quadrantes fotografados no microscópio estereoscópico (BX4, OLYMPUS OPTICAL CO LTD - JAPAO) equipado com câmera digital (C7070 Wide Zoom, OLYMPUS IMAGING AMERICA INC-EUA) no aumento de 16x. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett's.

4.8 Avaliação da angiogênese por imunohistoquímica

A avaliação da atividade antitumoral da talidomida e seus análogos foi reavaliada frente a um período de incubação e tratamento maiores, a fim de verificar parâmetros relacionados a vascularização tumoral. No tratamento iniciado 5 dias após a inoculação do tumor (Sarcoma 180), os compostos foram administrados nos animais pela via intraperitoneal (50 mg/kg/dia) durante 10 dias consecutivos. No 15^o dia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e dissecados para a retirada dos tumores.

Na dose testada, como esperado, talidomida e análogos foram capazes de diminuir significativamente o crescimento da massa tumoral em relação ao controle negativo (DMSO 10%), muito embora em menor grau do que no primeiro ensaio (tratamento de sete dias). O peso médio dos tumores dos animais tratados com DMSO 10% foi de $5,28 \pm 0,71$ g, enquanto que nos animais tratados com 50mg/kg/dia da talidomida e dos compostos SC-10 e SC-11 por via i.p. (intra-peritoneal) foi de $2,29 \pm 0,13$ g, $48,2 \pm 11,2$ g, $41,39 \pm 9,4$ g, respectivamente. Dessa maneira foi possível determinar os percentuais de inibição do crescimento tumoral. Os compostos SC-10 e SC-11 administrados por via i.p. inibiram em 48,2% e 41,3% do crescimento do tumor, respectivamente. O 5-FU inibiu em 41,45% o crescimento tumoral e a talidomida 56,6% (**tabela 7**).

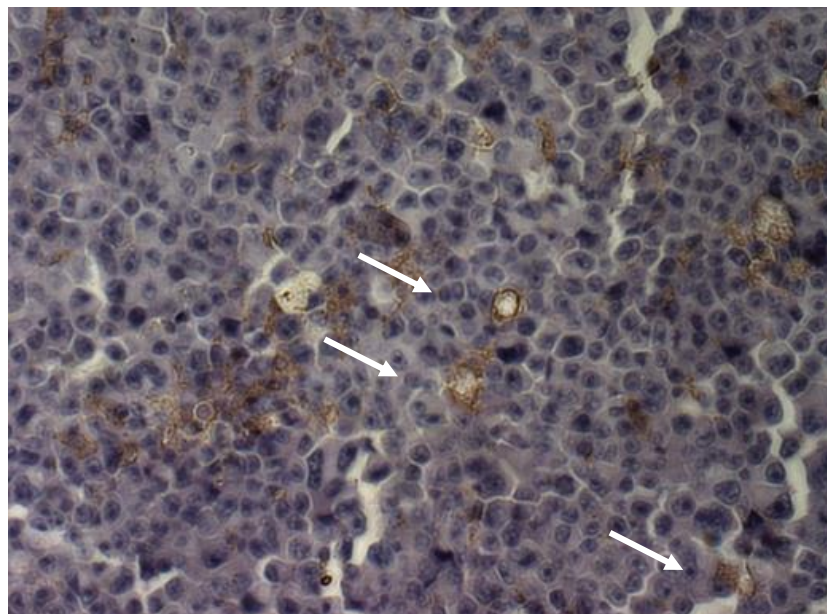
Tabela 7: Efeito da talidomida e seus análogos ftalimídicos na doses de 50 mg/Kg/dia i.p. sobre a proliferação tumoral de camundongos (*Mus musculos*) Swiss transplantados com Sarcoma 180.

Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	Animal peso (g)	Tumor (g)	Inibição tumoral (%)
Controle	-	34,08 ± 1,25	5,28 ± 0,71	-
5-FU	25	30,63 ± 1,21	3,09 ± 0,41*	41,45 ± 7,8*
Talidomida	50	29,14 ± 1,16*	2,29 ± 0,13*	56,6 ± 2,5*
SC-10	50	31,43 ± 0,75	2,73 ± 0,59*	48,2 ± 11,2*
SC-11	50	31,86 ± 1,24	3,09 ± 0,49*	41,39 ± 9,4*

Efeito da talidomida e seus análogos ftalimídicos na doses de 50 mg/Kg/dia i.p. sobre a proliferação tumoral de camundongos (*Mus musculos*) Swiss transplantados com Sarcoma 180, após 10 dias de tratamento. C: o controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 10%). 5-FU: o 5-Fluorouracil foi utilizado como controle positivo. Os valores correspondem à média ± E.P.M. de 7-10 animais. *p < 0,01, comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnet.

A imunohistoquímica realizada seguiu o protocolo estabelecido em materiais e métodos. A coloração marrom revelada pela captação do anticorpo, conforme pode ser vista na **figura 33**, foi quantificada através da densidade microvascular (DM).

Figura 33: Fotografia de uma zona quente (*hot spot*) obtida no microscópio de inversão com auxílio do programa AXION VISION 4.8.2 – Carl Zeiss Vision. Vasos e células imunocoradas com anticorpo CD-31, apontados pelas setas brancas. Aumento de 200x.



Os valores de densidade de cada campo (três zonas por lâmina) foram calculados pelo SAMM e estão apresentados como densidade de área, conforme se observa na **tabela 8**. Foram realizadas comparações entre os grupos, com dados expressos como média das três zonas diferentes por lâmina, efetuadas em triplicatas em 5 animais (lâminas/tumor) por grupo. Comparações entre as médias das três zonas fotografadas foram comparadas entre os grupos pela análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Dunnet's.

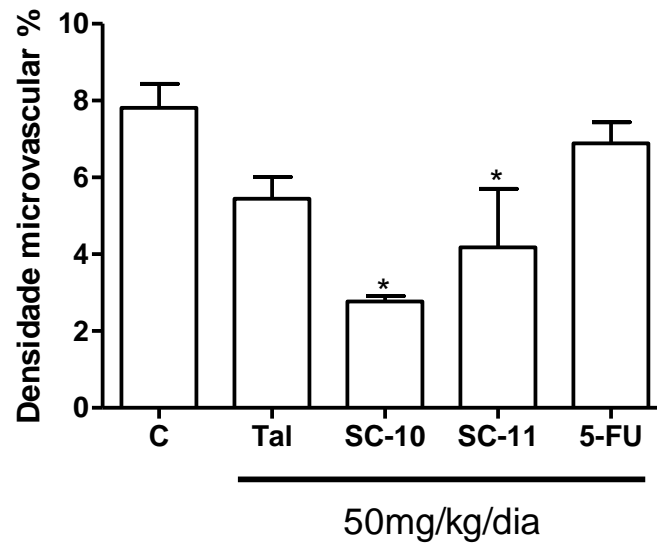
Comparando os grupos foi observado que a densidade microvascular verificada no grupo SC-10 e SC-11 foi significativamente menor que a mensurada no grupo de animais do controle negativo, tratados apenas com o veículo ($*p < 0,05$) (**figura 34**), havendo uma redução de $64,59\% \pm 1,8$ e $46,51\% \pm 19,5$ da DM para SC-10 e SC-11, respectivamente. Efeito similar também foi observado para talidomida (redução de cerca de 30% da DM), mas sem significância.

Tabela 8: Densidade Microvascular pela densidade de área das três zonas quentes, eleitas para cada lâmina/tumor, calculada pelo SAMM.

Tumor 1 (DM %)	Controle	Talidomida	SC-10	SC-11	5-FU
Zona 1	10,36	6,02	4,06	2,38	6,32
Zona 2	8,94	4,14	2,66	3,23	6,98
Zona 3	7,91	2,01	1,89	1,98	10,16
Tumor 2 (DM %)					
Zona 1	11	6,88	2,28	1,87	6,89
Zona 2	13,83	5,21	1,98	0,93	10,14
Zona 3	4,95	6,28	1,72	1,14	6,41
Tumor 3 (DM %)					
Zona 1	3,53	3,80	3,54	5,83	6,72
Zona 2	8,68	3,99	2,21	11,08	6,84
Zona 3	4,71	4,44	1,47	7,91	5,19
Tumor 4 (DM %)					
Zona 1	7,73	7,59	2,71	3,25	3,89
Zona 2	8,42	3,25	2,04	7,27	2,37
Zona 3	5,92	8,05	4,49	3,3	5,91
Tumor 5 (DM %)					
Zona 1	7,16	7,98	0,49	-	7,32
Zona 2	11,01	6,65	1,59	-	5,09
Zona 3	5,66	5,36	3,22	-	4,61
Tumor 6 (DM %)					
Zona 1	-	-	2,47	-	-
Zona 2	-	-	2,26	-	-
Zona 3	-	-	3,39	-	-

As médias das três zonas fotografadas para cada tumor foram comparadas entre os grupos pela análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Dunnet's.

Figura 34: Comparação da densidade microvascular entre os grupos tratados com a talidomida de seus análogos.



Os tumores (N=4-6) foram retirados de animais tratados com 50/mg/kg/dia por injeção intraperitoneal. * $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett's.

5. DISCUSSÃO

As neoplasias malignas permanecem entre as mais difundidas doenças de difícil de tratamento, muitas vezes causando más condições gerais dos pacientes, sendo então caracterizadas por uma alta taxa de letalidade. Apesar dos enormes esforços para melhorar a terapia e seus recentes avanços, o espectro de drogas eficazes disponíveis é comparativamente limitado e há uma necessidade considerável para o desenvolvimento de novos medicamentos, bem como alternativas de tratamento seguras (OTT et al., 2009).

Nesse contexto, as características imunomoduladoras e antiangiogênicas da talidomida tem despertado o interesse mormente a sua utilização no tratamento de doenças inflamatórias e auto-imunes, bem como na regressão de diversos tipos de câncer. A capacidade de impedir a formação de novos vasos sanguíneos, que limitou o crescimento dos membros em milhares de crianças no mundo, é atualmente utilizada para impedir a progressão de tumores malignos, sendo utilizada no combate de mielomas múltiplos (DIGGLE, 2001).

A talidomida parece ser o primeiro fármaco a demonstrar uma importante atividade clínica no mieloma múltiplo (MM) recidivo nos últimos 20 anos e, por isso, pode ser considerada como um tratamento alternativo para os pacientes tratados com terapia convencional ou àqueles submetidos a transplantes (RAJKUMAR et al., 2000). O benefício da talidomida para pacientes com MM pode ser devido à sua habilidade em inibir o crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese), fenômeno observado em diferentes tipos de tumores.

Por isso, a talidomida, outrora usada apenas para fins sedativos e hipnóticos, é um exemplo de droga que, através de modelagem química, tem se mostrado precursora de novos análogos e metabólitos dotados de variadas propriedades terapêuticas. Por meio de estudos de relação estrutura-atividade, tem-se o conhecimento que o grupamento ftalimídico na molécula mãe participa como um fragmento farmacofórico essencial para sua atividade farmacológica (HASHIMOTO et al., 2008). Em que a partir de estratégias de hibridização molecular, têm sido obtidos compostos como o (E)-3-(1-oxo-2-(1,2-difeniletil)isoindol-6-yl)-N-hidroxiacrilamida, que mostrou possuir toxicidade seletiva contra células tumorais (SHINJI et al., 2006).

Lançando mão destas estratégias de hibridização molecular, o grupo de pesquisa da UFPE, liderado pela Prof^ª. Dr^ª. Ana Crisitina Leite, juntamente com o grupo da UFC, liderado pela Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Pessoa, descreveram o *desing*, a síntese e a avaliação

farmacológica de novos análogos ftalimídicos complexados com subunidades metálicas denominadas tiossemicarbazonas (PESSOA et al., 2010).

Desse modo, a maioria das pesquisas com tiossemicarbazonas e análogos (semicarbazonas e *N*-acil-hidrazonas) como agentes antitumorais têm destacado a ação biológica frente às enzimas Tio redoxina Redutases (TRxR) como o aspecto mais promissor desta classe de compostos antitumorais, pois a ação inibitória nesta rota bioquímica atua tanto na proliferação celular como no combate a resistência aos quimioterápicos (BERALDO et al., 2004).

Apesar da ampla versatilidade farmacológica desses compostos como uma classe, especificidades estruturais podem levar à manifestação de atividades específicas. As tiossemicarbazonas apresentam, entre outras, atividades como agentes antitumorais, antivirais, antifúngicos, antibacterianos e antimaláricos. A atividade antitumoral tem sido sem dúvida a mais estudada (BERALDO et al., 2004).

A avaliação do perfil citotóxico dos oito análogos ftalimídicos e da talidomida foi realizada pelo método do MTT e do *Alamar Blue*, tendo revelado ausência de poder antitumoral *in vitro* frente aos quatro tipos de linhagens tumorais testadas para todos os compostos, incluindo a talidomida (**tabela 3**). Para as linhagens de Sarcoma 180 e CMSP, obtidas por cultura primária, somente o análogo 14 mostrou uma leve ação citotóxica para Sarcoma 180, com IC₅₀ de 11,3 (7,8 – 16,5) µg/mL (**tabela 4**).

Esses achados reforçam os encontrados por Zahran et al. (2008). O grupo realizou estudos *in vitro* pra fins de *screening* com a talidomida e 16 análogos. A talidomida demonstrou pouca atividade inibitória da proliferação celular no carcinoma ascítico de Ehrlich (20,5% ± 2,5), quando testada pelo método de exclusão do azul de Tripán. Para o restante dos análogos a inibição da proliferação celular *in vitro* variou de 10,2% ± 5,6 até 80,0% ± 6,5. Em contrapartida, nos estudos *in vivo* realizados pelo mesmo grupo com o carcinoma de Ehrlich, foi possível observar que a talidomida desencadeou uma potente redução do volume tumoral (36,4 mm³ ± 0,8) quando comparada ao controle negativo (188,6 mm³ ± 2,5), mostrando inibição tumoral de 80,6%. Tal resultado foi reforçado também pelo nosso estudo, quando observamos que a talidomida (50mg/kg) inibiu cerca de 50% do crescimento tumoral *in vivo*.

Os mecanismos de ação antitumoral da talidomida e dos medicamentos análogos a ela, a exemplo o Revilimid e Actimid, ainda permanecem obscuros (ZHU et al., 2011). É bem sabido que sem o aparecimento dos vasos sanguíneos, os tumores não podem crescer além de

um certo tamanho, 1-3mm (CARMELIET, 2000). Além disso, alguns autores sugerem que os efeitos anti-angiogênicos da talidomida só podem ser observados após sua ativação metabólica e este processo pode ser específico para diferentes tipos de espécies animais. De maneira similar, as propriedades teratogênicas associadas à talidomida, apenas foram observadas em modelos com humanos e coelhos, mas não em modelos usando roedores (BORGES et al., 2005).

A síntese desses análogos foi realizada a partir de ensaios de hibridização molecular do grupamento farmacofórico da talidomida (anel ftalimídico), com radicais tiossemicarbazídicos, que possuem a capacidade de potencializar o efeito antitumoral (BERALDO, 2004). Apesar de não apresentarem atividade citotóxica *in vitro*, os análogos, assim como talidomida, poderiam necessitar de ativação metabólica *in vivo* e para esclarecer esta hipótese, foi testada a atividade antiproliferativa em modelo de tumor sólido, como citado anteriormente (ZAHNAN et al., 2008; PESSOA et al., 2010).

Vale ressaltar que, nem sempre os efeitos observados *in vitro* podem ser extrapolados para modelos *in vivo*, desta forma se faz necessário avaliar os efeitos desses compostos em sistemas biológicos completos. Animais de laboratório representam um poderoso sistema experimental para a compreensão da intricada patogênese do câncer em seres humanos. De fato, a maioria dos conceitos de tumorigênese atualmente aceitos é fortemente influenciada por modelos de desenvolvimento do câncer em camundongos, uma vez que esses organismos são modelos acessíveis e possuem sistemas, órgãos e genes semelhantes aos humanos (KAMB, 2005).

Afim de delinear a ação antitumoral *in vivo*, os compostos estudados foram testados, preliminarmente, quanto a sua capacidade hemolítica usando eritrócitos isolados do plexo orbital de camundongos, sendo observada ausência de lise das hemácias. A avaliação da possibilidade de dano direto sobre a membrana celular dos eritrócitos é de suma importância, pois alguns fármacos com atividade antitumoral comprovada possuem neste efeito o fator limitante de seu uso, principalmente se a via de administração for intra-venosa (PERKINS et al., 1997).

Fundamentando no uso de tumores experimentais para a identificação de substâncias com potencial antitumoral, a atividade *in vivo* dos oito análogos, incluindo a talidomida, na dose de 50mg/kg durante sete dias consecutivos, foi avaliada utilizando camundongos

transplantados com Sarcoma 180. O Sarcoma 180 é um tumor original de camundongo e uma das linhagens celulares mais frequentemente usadas na pesquisa de atividade antitumoral *in vivo* (LEE et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2006).

Os resultados mostraram que a talidomida possui um percentual de capacidade de inibição tumoral de $53,5\% \pm 7,2$, enquanto os análogos 10 e 11 inibiram, respectivamente, $67,9\% \pm 6,0$ e $67,4\% \pm 4,6$, o crescimento do tumor Sarcoma 180. Por outro lado, o análogo 14, que havia mostrado moderada atividade citotóxica no teste do *Alamar Blue*, para esta mesma linhagem, não inibiu de maneira elevada o crescimento tumoral ($17,9\% \pm 12,5$) quando comparado com os animais do controle negativo, que receberam apenas o veículo (tabela 6).

De maneira geral, o efeito antitumoral da talidomida *in vivo* é pouco observado, quando se realiza um levantamento bibliográfico na busca desta informação. A exemplo, Gutman et al. (1996) testaram a eficácia da talidomida contra tumor sólido de melanoma (B16-F10), em ratos inoculados por via subcutânea, intravenosa e intraperitoneal. Os animais receberam diariamente, por gavagem, 0,3-1,0mg de talidomida, dois a 10 dias após a inoculação do tumor. Os tumores quando medidos e comparados com os controles não mostraram retardo do crescimento. Além disso, a avaliação morfológica dos vasos sanguíneos tumorais revelou que, em ambos os grupos tratados com a talidomida e o controle, todos os ratos tinham desenvolvido uma rede intacta de neovasularização.

A origem tumoral, pode ter influenciado nossos resultados, já que os nossos achados mostraram significativa capacidade de inibição tumoral da talidomida (cerca de 50%). Por outro lado os análogos reduziram bem mais o crescimento tumoral (cerca de 67%). Esta inibição, superior a da talidomida, revela a importância da obtenção dos análogos a partir de modificações moleculares no anel ftálico, realizada primeiramente pela adição da tiossemicarbazida, resultando no composto SC-11 e por bioisosterismo foi obtido o composto SC-10, contendo a semicarbazida. Os outros compostos que continham adição de grupamentos aminoguanidina (SC-15), e por razões bioisostéricas, do grupamento tiazolin-4-ona não apresentaram atividade *in vivo*.

Desse modo, provavelmente a ativação metabólica da talidomida *in vivo*, desencadeou a ação antiproliferativa no modelo de tumor sólido de sarcoma 180, sendo o efeito similar, também observado para os análogos SC-10 e SC-11, os quais anteriormente não mostraram atividade citotóxica *in vitro*. Estes resultados corroboram com os achados que, comprovam que a adição da subunidade química estrutural da tiossemicarbazona favorece a ação

antiproliferativa em tumores (BERALDO, 2004). Além disso, a fixação deste grupamento também está envolvida em processos de inibição da ribonucleotídeo redutase, alteração da estrutura do DNA e quelação de metais endógenos (RICHARDSON et al., 2006; YU et al., 2009).

Afim de elucidar o possível mecanismo de ação antitumoral da talidomida e dos análogos mais ativos, foi realizado o estudo da ação destes compostos na linhagem de tumor sólido (Sarcoma 180), sobre a integridade da membrana celular, a concentração de células e a fragmentação de DNA, utilizando para tanto citometria de fluxo.

Nesse estudo foram usadas concentrações crescentes de 10, 50 e 100µg/mL para todos os compostos. Após 72h de incubação, apenas a talidomida e o análogo SC-10 foram capazes de reduzir de forma significativa (35,57% e 33,9%) a concentração de células, na maior concentração testada. Estes resultados são semelhantes a outras avaliações dos efeitos da talidomida no ciclo celular e reforçam que a ação dos seus análogos na diminuição da viabilidade celular pode estar, assim como para ela, correlacionada com a indução de apoptose (LI et al., 2011).

As drogas indutoras de morte celular por apoptose podem ser úteis na quimioterapia do câncer (ZAMAI et al., 2001; LOS et al., 2003; BRADY, 2004). Esse processo de morte celular é altamente regulado e elimina células e tecidos indesejados, protegendo o organismo contra a formação de neoplasias. O mau-funcionamento do processo de apoptose pode ocasionar diversas patologias, sobremaneira o câncer (MAJNO; JORIS, 1995; OPALKA et al., 2002). Diversas alterações morfológicas da célula podem ser sugestivas de apoptose, como por exemplo, a fragmentação internucleosomal do DNA (ELMORE, 2007; MELLIER et al., 2010).

A ativação de endonucleases está associada ao processo de apoptose e resulta na extensa clivagem (quebra) do DNA (VERMES et al., 2000), que pode ser detectada por citometria de fluxo, utilizando o corante iodeto de propídio. A análise da fragmentação do DNA realizada por citometria de fluxo demonstrou que a talidomida e os dois análogos induziram fragmentação significativa no DNA nas duas maiores concentrações testadas (50 e 100µg/mL), sendo esta fragmentação bastante expressiva, principalmente na maior concentração, para o análogo SC-11.

A perda de integridade de membrana também foi vista nas maiores concentrações para todos os compostos. Devendo ser destacado que para o análogo SC-11, a fragmentação de DNA mais expressiva, também foi notada na maior concentração, quando comparado à talidomida e com o análogo SC-10.

Neste contexto, as células do Sarcoma 180 expostas à concentração de 100µg/mL da talidomida e seus análogos, que apresentaram perda da integridade de membrana acompanhada de extensa fragmentação no DNA, após 72 horas de incubação, podem ser consideradas, segundo Ormerod (2002), células apoptóticas em estágios finais ou em processo de necrose secundária.

Estes resultados reforçam os dados observados no estudo de Zahran et al. (2008), onde foi visto por análises histopatológicas usando a coloração de HE, um aumento significativo do índice apoptótico de células tumorais ascíticas obtidas de camundongos da linhagem Ehrlich após o tratamento com a talidomida. Foi visto também que a talidomida apresenta efeitos citotóxicos diretos nas células tumorais através do aumento da susceptibilidade dessas células à apoptose ou da redução de fatores de crescimento (SLEIJFER et al., 2004).

O estresse celular provocado por agentes físicos e químicos, tais como os medicamentos, pode provocar outro tipo de lesão ao DNA, denominada de lesão genotóxica. Esta mesma lesão perturba as funções que necessitam da integridade funcional do DNA, tais como a transcrição e a replicação. Essas lesões são variadas e incluem quebra simples, quebra dupla, ligações cruzadas entre as fitas de DNA de moléculas diferentes, ligações cruzadas entre DNA e proteínas e DNA e lipídeos, distorções na hélice, formação de dímeros, pontes intercadeias, alquilações das bases, perda de bases, desaminações, depurinações (comum nas altas temperaturas que ocorrem durante a inflamação sistêmica) e oxidações das bases, entre outras (ROSA et al., 2008). Muitos agentes anti-neoplásicos que estão hoje na clínica são genotóxicos (ANDERSON; BERGER, 1994) e apesar do risco que essas drogas trazem, o benefício resultante da remissão ou cura da neoplasia é considerado. Com isso, a avaliação sistemática do potencial genotóxico de um composto citotóxico permite a identificação e o desenvolvimento de novos agentes menos tóxicos que podem substituir agentes mais genotóxicos nos esquemas de quimioterapia.

O teste do cometa foi primeiramente introduzido por Österling e Johanson (1984) como uma técnica de microeletroforese para visualização direta de danos no DNA. Essa técnica pode ser uma ferramenta valiosa para determinação dos mecanismos de

genotoxicidade e reparo do DNA (FAIRBAIRN et al., 1995), tendo sido bastante utilizado para se avaliar a segurança de novos fármacos uma vez que é considerado um método bastante sensível, em relação à detecção da quebra de fitas simples ou dupla do DNA (HARTMANN et al., 2003).

As células CMSP quando incubadas com a talidomida e os análogos em duas concentrações crescentes, por 24 horas e submetidas ao ensaio do cometa, não induziram aumento do índice de dano quando comparadas com o grupo controle negativo. Assim, pode-se afirmar que não houve ação genotóxica para as culturas tratadas com os compostos SC-10, SC-11 e talidomida. Estes achados reforçam o baixo potencial genotóxico da talidomida, já elucidados por Teo et al. (2000). Neste estudo, as culturas tratadas com a talidomida (500, 2.500 e 5.000mg/kg), submetidas aos ensaio do micronúcleo em fêmures de camundongos, não apresentaram eritrócitos micronucleados e policromáticos (TEO et al., 2000).

Os efeitos antitumorais da talidomida têm sido associados com o suas propriedades anti-angiogênicas. Sabe-se que novos análogos da talidomida, incluindo os de segunda geração são, de fato, compostos com potencial terapêutico maior. Estes compostos divididos em duas classes, conhecidos como SelCIDs (drogas inibidoras seletivas de citocinas) e ImiDs (Drogas imunomodulatórias) foram iniciados em ensaios para o tratamento de câncer recentemente e desta forma há muito pouca informação sobre as atividades anti-angiogênicas, clinicamente relevantes desses compostos. Além disso, não se sabe como as suas reais atividades imunomoduladoras podem ser relacionadas com a atividade antiangiogênica (DREDGE et al., 2002).

Pensando nesta associação, entre a atividade antitumoral e potencial anti-angiogênico, foram realizados ensaios para avaliar a presença destes efeitos nos dois análogos que mostraram significativa atividade de redução do volume tumoral *in vivo*. A talidomida foi novamente usada como droga/molécula de referência.

Células obtidas da veia umbilical humana (HUVEC) representam a via mais facilmente disponível para obtenção das células endoteliais macrovasculares (CE) que recobrem a superfície interna das artérias, veias, vasos linfáticos e capilares. Estas células desempenham um papel importante na mediação tanto da fisiologia normal quanto da fisiopatologia no corpo humano, principalmente no que diz respeito ao processos de angiogênese e vasculogênese. Como resultado, estas células têm sido objeto de intensa pesquisa sobre os diferentes aspectos de sua estrutura e função (BALLA et al., 2011).

O ensaio de migração celular tem sido bastante usado como uma espécie de *screening* inicial e confirmativo de atividade antiangiogênica para novos compostos que porventura possuam este potencial (TSUKAMOTO et al., 2010). A capacidade de intervenção no processo de migração de células endoteliais (HUVEC), bem como em células tumorais (MDA-MB 435) foi avaliada para a talidomida e os seus dois análogos mais ativos *in vivo* (SC-10 e SC-11). A inibição da migração das células para o centro da cicatriz foi observada de forma significativa, variando de $23,81\% \pm 0,81$ até $98,51\% \pm 0,25$, apenas nas culturas tratadas com os análogos ($50\mu\text{g/mL}$), enquanto que o efeito similar não foi visto nas culturas tratadas com talidomida, na mesma concentração.

A talidomida não possui capacidade de intervir na migração de células endoteliais *in vitro*, de forma que este efeito só pode ser observado se a talidomida for incubada com proteínas microsossomais que ativam sua metabolização e somente assim há influência da migração de células HUVEC, bem como da formação do tubos capilares (LI et al., 2011). Por outro lado os análogos SC-11 e SC-10 apresentam efeito antimigratório uma vez que, inibiram o fechamento da cicatriz no poço.

Bauer et al. (1998) relataram que a inibição de angiogênese usando a talidomida de fato, requer ativação pelo metabolismo hepático. Isso só foi observado para modelos humanos e de coelhos, mas não em roedores. Em 1986, o sistema enzimático do citocromo P450 (CYP) foi pela primeira vez implicado no metabolismo da talidomida (BRAUN et al., 1986). Tanto a talidomida como seus metabólitos podem sofrer hidrólise espontânea em solução aquosa sob condições fisiológicas, e alguns produtos de hidrólise podem ser metabolizados via CYP. Teoricamente, poderiam haver mais de 100 metabólitos e via de regra, os principais metabólitos que exibem ou exibiriam a atividade farmacológica da talidomida, bem como a enzima que medeia a sua biotransformação, ainda não foram identificados. Sabe-se apenas que em humanos, o citocromo microsossomal de fígado (CYP2C19) faz parte da principal e responsável via, pela formação de 5 hidoxitalidomida (5-OH) e cis-5'- hidoxitalidomida (ANDO et al., 2002).

Foi demonstrado por outros autores, que a talidomida possui fraca atividade anti-proliferativa contra a linhagem de células de câncer de mama humano (MDA-MB-231) em cultura, mostrando, no entanto, um grau de atividade anti-proliferativa um pouco maior, em outras linhagens como a de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) e de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) (MARKS et al., 2002).

A adição do grupamento tiocarbonil ao anel ftalimídico, não evocou indícios de citotoxicidade *in vitro* nas linhagens tumorais, entretanto esta modelagem molecular pode ter induzido a inibição do fechamento da fenda observada em células endoteliais. Estes dados comprovam também que a atividade no ensaio da migração não foi ocasionada por citotoxicidade ou inibição de proliferação, mas por fatores provavelmente ligados a um possível potencial antiangiogênico, que precisa ser investigado.

Alguns análogos da talidomida de segunda geração (IMiDs e SelCIDs) já mostraram ser significativamente mais potentes do que a talidomida. Efeitos anti-migratórios *in vitro* bem como de inibição do crescimento do tumoral *in vivo* foram observados com o análogo IMiD-1 (cl clinicamente conhecido como REVIMID). Sendo assim, os autores concluíram que a atividade anti-angiogênica deste análogos, nem sempre está relacionada com suas propriedades imunomoduladoras e somente a identificação dos efeitos diferenciais desses compostos permitirá direcionamento dos mesmos para o enquadramento clínico apropriado (DREDGE et al., 2002).

Neste contexto, a ação *in vitro*, da inibição da migração celular observada no ensaio de *Wound Healing*, que poderia estar ligada a ação antiangiogênica, se fez então carente e necessária de estudos implicativos da neovascularização em sistemas *in vivo* diversificados, bem como de elucidação molecular. Para isso foi usada inicialmente, a técnica *in ovo* da membrana corioalantóide (CAM) de embrião de galinha.

As anormalidades do processo angiogênico possuem papel crítico em numerosas doenças malignas e infecciosas, inflamatórias, isquêmicas e imunes (PATEL; MIKOS, 2004). Uma vez que o crescimento tumoral é dependente de angiogênese, o objetivo da terapia do câncer com medicamentos antiangiogênicos é a oclusão dos vasos sanguíneos que alimentam o tumor. A eficiência de formulações contendo drogas antiangiogênicas pode ser facilmente avaliada com o modelo da CAM (VARGAS et al., 2007).

Os resultados obtidos no modelo da CAM, revelaram a ausência da capacidade da talidomida de inibir o processo de neovascularização ao redor do papel filtro impregnado com a droga. Provavelmente pela necessidade da biotransformação por hidrólise em seus metabólitos, só ativos após a passagem hepática (VESELA et al., 1994). Outras publicações indicam que o efeito antiangiogênico da talidomida é significativamente aumentado pela ativação microssomal humana, não sendo este o mesmo efeito observado em ratos. Sabe-se ainda que a hidroxilação da talidomida nas posições 1' e 5' é capaz de reter a atividade

antiangiogênica, mas sua hidroxilação na posição 4' leva a um composto inativo (MARKS et al., 2002). Por outro lado, para os três parâmetros avaliados (número de vasos, neovascularização e comprimento de vasos) após 24h de exposição, os análogos SC-10 e SC-11 foram capazes de provocar diminuição dos mesmos.

Nota-se então, a partir destes resultados que a adição dos radicais tiossemicarbazídicos ao grupamento farmacofórico da talidomida (anel ftálico), trouxe, como já previsto: 1- efeito potencializador da atividade antitumoral, visto que os análogos SC-10 e SC-11 quando submetidos, juntamente com a talidomida, ao ensaio de redução tumoral no modelo de tumor sólido (Sarcoma 180) *in vivo*, evocaram uma maior redução do volume tumoral em cerca de 67%, enquanto que a talidomida reduziu cerca de 50% e 2- efeito potencializador na redução de parâmetros avaliativos de angiogênese *in vitro*, observados nos ensaios *Wound Healing* e CAM.

Afim de mensurar e reproduzir os possíveis efeitos antiangiogênicos da talidomida e dos análogos, o modelo de inoculação de tumor sólido (Sarcoma 180) em camundongos foi realizado, tendo como diferença um período de tratamento maior (10 dias).

Tanto o início da terapia como o tempo de tratamento, para avaliação da atividade antiangiogênica, devem ser adequados para obedecer um maior período de espera para o surgimento do tumor, visto que a formação e o estabelecimento destes neovasos é um passo essencial para o crescimento tumoral acima de um certo tamanho e os efeitos da terapia antiangiogênica não podem ser detectados *in vivo* com menos de 8 dias de tratamento (FOLKMAN, 1995; BRUNS et al., 2002).

Com este ensaio, pudemos confirmar de forma significativa, novamente, a ação antitumoral *in vivo* da talidomida e dos análogos administrados via i.p. em camundongos transplantados com Sarcoma 180, muito embora tenha sido observado um menor grau do percentual de inibição. Devendo então agora, elucidarmos a possível via molecular da inibição destes vasos.

Alguns tumores com maior densidade vascular e com maior número de microvasos apresentam maior capacidade de metastizar, maior atividade proliferativa, menor diferenciação histopatológica e maior massa tumoral. Mas essa relação não é constante e existem variações entre os diversos tipos de tumores (mama, próstata, melanoma entre outros). A correlação desses parâmetros encontra-se em fase de investigação. Apesar das controversas, o estudo da estrutura microvascular tem orientado nos ajustes de protocolos de

tratamentos e avaliação do prognóstico de alguns tumores (HLATKY et al., 2002; GRAÇA, et al., 2004).

A imunocitoquímica desempenha um papel importantíssimo no diagnóstico histopatológico (D'AMICO, 2009). A angiogênese tumoral pode ser avaliada com base na quantificação da densidade microvascular (DMV), que pode ser medida usando vários marcadores endoteliais, como CD-34 e CD-31 (PONCELET et al., 2002) pela técnica da imunohistoquímica.

Para marcação dos vasos foi utilizado o anti-CD 31, um anticorpo que identifica imuno-histoquimicamente o antígeno PECAM1 em células endoteliais de cortes histológicos. O PECAM-1 é uma molécula de adesão de células endoteliais e plaquetas. É um membro da superfamília imunoglobulina, expressa na superfície de células endoteliais, plaquetas, monócitos, neutrófilos e células T. Trata-se de uma glicoproteína transmembrana que tem aproximadamente, 130KDa. (NEWMAN, 1997; NEWMAN; NEWMAN, 2003; GARCIA; CHULUYAN, 2007).

A análise digital da DM utilizada neste estudo é um método objetivo de quantificação microvascular e permite a diminuição da variação inter-observador encontrada na contagem manual convencional (DORNELLAS, 2009).

Vários estudos tem sido realizados para avaliar a angiogênese em tumores sólidos, em diversos tipos de linhagem celular, usando como ferramenta a marcação por imunocorantes específicos de endotélio vascular (SOUZA et al., 2010; POON et al., 2003). Para a talidomida a marcação de CD-31 tem mostrado dados controversos, dependendo do tipo de tumor e da espécie animal em que o mesmo é inoculado (STEPIÉN et al., 2006; GUTMAN et al., 1996).

Nossos resultados revelaram diminuição significativa da marcação com anticorpo CD-31, na forma de densidade de área (%) para os análogos SC-10 e SC-11. Esse efeito não foi visto para o grupo tratado com 5-Fluorouracil ou com a talidomida. A última diminui a marcação, mas não de forma significativa, quando comparado ao controle negativo.

É importante ressaltar que talidomida já demonstrou ser inibidor da angiogênese, em modelos avaliativos de neovascularização em córnea de coelhos e ratos, quando administrada via intra-peritoneal (KENYON et al., 1997). Nos testes de sua eficácia em tumores sólidos de melanoma (B16-F10) e carcinoma de cólon (CT-26) foi revelado que a morfologia dos vasos sanguíneos tumorais, para os grupos tratados e controle negativo, preservaram uma rede intacta de novos vasos sanguíneos, concluindo que para o modelo de administração oral, não

houve inibição do crescimento tumoral nem da angiogênese, para estes tipos de célula (GUTMAN et al., 1996).

O teste da avaliação antitumoral e antiangiogênica da talidomida e análogos ftalimídicos (via i.p.), que possuem associação com grupamentos tiocarbonil, foi aqui realizado pela primeira vez usando o modelo tumoral de Sarcoma 180 injetado em camundongos. A presença de atividade, não observada outrora em outros modelos animais e tumorais citados na literatura, pode ser, em parte, respondida pelo fato de que, nestes modelos a ausência de resposta antiangiogênica pode estar correlacionada com indução de modulação imunológica ou até mesmo à heterogeneidade de adaptação tumoral na espécie (GUTMAN et al., 1996).

Os diversos fatores desencadeantes da angiogênese tumoral, conhecidos também como “interruptores” angiogênicos podem ser liberados em diferentes fases de progressão tumoral, dependendo não só do tipo de tumor, mas também do microambiente tumoral específico. É bem comum e também aceito que a maioria dos tumores sólidos se originam como pequenas lesões avasculares, que inicialmente prosperam a partir de vasos pré-existentes ao redor de seu micro-ambiente circundante (ROODINK et al., 2010).

Sendo o anel fitálico, o grupamento farmacofórico responsável pelas atividades antiangiogênicas, dentre outras, da talidomida (HASHIMOTO, 2008; CAPITOSTI et al., 2004), as discussões geradas a cerca das possíveis atividades antiangiogênicas e imunomoduladoras dos análogos, poderão ter embasamento teórico referendado na molécula mãe da talidomida.

Sabe-se que um dos aspectos químicos originais da talidomida é sua hidrólise espontânea em solução aquosa em pH 7,0. A talidomida se degrada em mais de 20 produtos e sua atividade inibitória da formação de microvasos ou de redução da proliferação de células endoteliais em aorta, por exemplo, dependem de sua metabolismo. O metabólito ativo parece ser gerado por uma isoenzima do citocromo P450 humano (CYP2C19) que medeia a oxidação da talidomida. No entanto, existem dados preliminares, em modelo de artéria humana placentária, indicando atividade antiangiogênica sem a adição de microsomas hepáticos. (Stirling D, Celgene) (BAUER et al., 1998). No entanto, não se sabe ao certo, se o metabolismo da talidomida contribui especificamente para a sua atividade antiangiogênica e imunomoduladora (FRANKS et al., 2004).

A atividade imunomoduladora dos análogos ftalimídicos estudados nesta tese foi avaliada pelo grupo de pesquisa da UFPE em convênio com o grupo de pesquisa da UFC (PESSSOA et al., 2010). Nos ensaios a talidomida foi também usada como droga padrão. No elegante artigo contido no anexo I, ensaios *in vitro* usando linfócitos isolados do baço de camundongos Balb/c, foram estimulados com Concavalina A e LPS, a afim de serem avaliados quanto a inibição ou não dos níveis de algumas citocinas imunomoduladoras, bem como da proliferação celular linfocitária.

Pelo ensaio do Alamar Blue foi visto que, tanto a talidomida quanto os análogos SC-10 e SC-11 não foram capazes de reduzir a proliferação celular linfocitária de forma significativa (Figura 1- Anexo B). Com exceção do análogo SC-11, nenhum outro, incluindo a talidomida, reduziu os níveis da citocina proliferativa IL-2 na cultura de esplenócitos (Figura 2- Anexo II). A produção de INF gama, uma citocina pró-inflamatória associada com a proteção antiviral e antitumoral não foi alterada pelo tratamento com a talidomida e os análogos SC-10 e SC-11 (2a e 2b). (PESSSOA, 2010).

Nestes estudos, o conteúdo de óxido nítrico (NO) no sobrenadante da cultura de esplenócitos, avaliado pelo reagente de Griess, mostrou uma redução drástica dos níveis de NO (Figura 3-Anexo B). Sendo o óxido nítrico, molécula crucial para os processos inflamatório e de crescimento tumoral, pode-se correlacionar estes resultados modulatórios com diferentes atividades celulares, incluindo a angiogênese, testada nesta tese para os mesmos compostos que mostraram atividade antitumoral *in vivo*, bem como atividades inibitórias do processo da formação de vasos sanguíneos e migração endotelial.

Ainda nos estudos realizados o efeito dos análogos ftalimídicos e da talidomida sobre as concentrações de IL-10 no sobrenadante da cultura de células, foi medido pelo ensaio do ELISA (Figura 4- Anexo B). Todos os análogos e a talidomida diminuíram de forma significativa os níveis de IL-10, que por sua vez, regula e controla a superprodução de moléculas pró-inflamatórias, como o NO, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o INF gama. Essa atenuação da secreção de IL-10 está então de acordo com os achados para a diminuição dos níveis de NO. Além disso, é sabido que o mecanismo de ação da talidomida inclui inibição dos níveis de TNF- α e que ainda, vários análogos sintetizados a partir dela possuem inclusive maior atividade inibitória desta citocina quando comparados com talidomida. A lenalidomida, por exemplo possui alta capacidade de inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-6, em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) ativadas por LPS (CHAULET et al., 2011).

É praticamente inevitável não agregar os resultados dos efeitos imunomoduladores descritos anteriormente, com os efeitos moduladores da proliferação de vasos encontrados na tese, para estas moléculas portadoras do anel ftalimídico. A diminuição da marcação do CD-31 nos tumores imunocorados pode, neste enejo, ser usada para efeito associativo dos mecanismos de ação.

O CD-31 se concentra nas junções das células endoteliais em todos os tipos de vasos e também é expresso em células precursoras da medula óssea, como plaquetas, monócitos, polimorfonucleares, leucócitos, certos subgrupos de linfócitos e, em algumas linhagens de células tumorais (TANG et al., 1993; LUTZKY et al., 2006). O CD-31 medeia uma gama de funções diferentes, incluindo recrutamento de leucócitos para sítios inflamatórios (LIAO et al., 1997), vasculogênese (PINTER et al., 1997), angiogênese (DELISSER et al., 1997). A regulação de neutrófilos e monócitos polimorfonucleares e ativação de células T (NEWMAN, 1999).

Algumas citocinas, porém, podem modular a expressão desta glicoproteína transmembrana. O TNF-alfa e o IFN-gama, podem, por exemplo, induzir uma redistribuição dessa molécula (CD-31), para distante das junções intercelulares (ROMER et al., 1995). No entanto, a combinação de ambas citocinas causa o desaparecimento do CD-31 da membrana e este efeito está relacionado tanto com a internalização e a degradação do CD-31 pré-existente, como da inibição de sua síntese (RIVAL et al., 1996) Assim, os mecanismos de endocitose e reciclagem de membrana plasmática podem modular os níveis de expressão de CD-31 (GARCIA; CHULUYAN, 2007).

Na avaliação das concentrações de INF gama no sobrenadante de esplenócitos realizadas pelo grupo da UFPE, não houve redução desta citocina para nenhum grupo, mas por outro lado, os níveis de IL-10 avaliados por ELISA diminuíram severamente para os grupos tratados com os análogos (30-57%), e principalmente para o grupo tratado com a talidomida (70%).

Como já citado a IL-10 pode estar envolvida no processo de regulação de outras citocinas como o TNf alfa, que por sua vez é um dos principais alvos moleculares reduzidos pelo tratamento com a talidomida. Desse modo, foi visto então que a marcação com o anticorpo CD-31 ficou prejudicada e não se revelou significativa nos grupos tratados com talidomida. É provável que a via de supressão do CD-31, mediada pela redução brusca (cerca de 70%) do TNF alfa circulante, tenha sido ativada, já que foi observado em conjunto a

supressão de IL-10 regulatória. O mesmo não ocorreu com os análogos. Para estes últimos a glicoproteína CD-31 ainda estaria nas membranas das células endoteliais a níveis perceptíveis de marcação, o que reforça um possível potencial antiangiogênico dos análogos quando comparado com a talidomida.

Por fim podemos inferir que os análogos SC-10 e SC-11 são capazes modular o sistema imune, sem provocar supressão, pois não alteram a proliferação de linfócitos, bem como a proliferação de citocinas ligadas a este processo, como a IL-2 e o INF gama, pró-inflamatório. Estes fatores podem sustentar uma via de imunidade antitumoral, comprovada na tese, pela redução de volume tumoral *in vivo*, provavelmente associada à uma inibição do processo da angiogênese dependente de células T.

5.1 Considerações Finais

As vias de sinalização envolvidas que afirmariam com maior clareza estes processos antiangiogênicos, associadas à elucidação das reais vantagens provindas das adições químicas do grupamento tiocarbonil nas moléculas dos análogos ftalimídicos, poderiam esclarecer melhor o mecanismo de ação dos mesmos. Desta forma todo o processo pode ser visto como um ganho para esta árdua linha de pesquisa experimental, conseqüentemente adicionando esforços na busca do combate ao câncer.

Tais esforços devem ser, diga-se de passagem, imensuráveis, pois afinal, com a talidomida, nós pesquisadores pudemos decifrar ao pé da letra o velho ditado popular: “tirar leite de pedra” já que hoje, a mesma droga que causou uma tragédia tentando curar desconfortos matinais da gravidez é usada para tratar desconfortos de uma doença trágica, de que ainda não se conhece a cura.

6. CONCLUSÃO

Os análogos ftalimídicos, SC-10 e SC-11 exerceram efeito antitumoral superior a talidomida no modelo de Sarcoma 180, sendo mostrado também potencial antiangiogênico *in vitro*, no modelo de migração de células endoteliais e *in vivo*, pela redução da marcação do CD-31 no tumor Sarcoma 180 e modelo da CAM.

7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.V.; TEIXEIRA, F.M.; SOUZA, M.V.N.; AMARANTE, G.W.; ALVES C.C.; CARDOSO, S.H.; MATTOS, A.M.; FERREIRA, A.P.; TEIXEIRA, H.C. Thalidomide analogs from diamines: Synthesis and evaluation as inhibitors of TNF-alpha production. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, p. 223-236, 2007.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v. 188, p. 261-274, 2003.

ANDERSON, R.D.; BERGER, N.A. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. Mutagenicity and carcinogenicity of topoisomerase-interactive agents. **Mutation Research**, v. 309, p.109-142, **1994**.

ANDO, Y.; FUSE, E.; FIGG, W.D. Thalidomide metabolism by the CYP2C subfamily. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 1964–1973, 2002.

ARISTOTLE. **Historia Animalium**. Cambridge: Harvard University Press, 1970. v. 2.

ASSEF, M.L.M.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.; MORETÃO, M.P. Histological and immunohistochemical evaluation of Sarcoma 180 in mice after treatment with an a-d-glucan from the lichen Ramalina celastri. **Brazilian Journal of Morphological Science**, v. 19, p. 49-54, 2002.

BALAA, K.; AMBWANIB K.; GOHILA, N.K. Effect of different mitogens and serum concentration on HUVEC morphology and characteristics: Implication on use of higher passage cells. **Tissue and Cell**, v. 43 p. 216-222, 2011.

BAERISWYL, V.; CHRISTOFORI, G. The angiogenic switch in carcinogenesis. **Seminars In Cancer Biology**, v. 19, p. 329-337, 2009.

BAUER, K.S.; DIXON, S.C.; FIGG, W.D. Inhibition of angiogenesis by thalidomide requires metabolic activation, which is speciesdependent. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 1827-1834, 1998.

BERALDO, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Química Nova**, v. 27, p. 461-471, 2004.

BERGERS, G.; BENJAMIN, L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 401-410, 2003.

BERTI, F.V.; RAMBO, C.R.; DIAS, P.F.; PORTO, L.M. Efeito da aloína e do extrato do parênquima clorofiliano da *Aloe barbadensis* na viabilidade de células tumorais e na formação de vasos sanguíneos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA, 2008, Salvador. **Anais do 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**. Salvador, 2008. p. 74-77.

BORGES, L.G.; FRÖEHLICH, P.E. Talidomida – Novas perspectivas para utilização como antiinflamatório, imunossupressor e antiangiogênico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, p. 96-102, 2003.

BORGES, L.V.; GUERRA, M.O.; AARESTRUP, F.M. Talidomida: De teratogênica à terapêutica. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 24, p. 31-44, 2005.

BOUIS, D.; KUSUMANTO, Y.; MEIJER, C.; MULDER, N.H.; HOSPERS, G.A. A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention. **Pharmacological Research**, v. 5, p. 89-103, 2006.

BRADY, H.J.M. **Apoptosis Methods and Protocols**. New Jersey: Humana Press, 2004.

BRAUN, A.G.; HARDING, F.A.; WEINREB, S.L. Teratogen metabolism: thalidomide activation is mediated by cytochrome P-450. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 82, p. 175-179, 1986.

BRUNS, C.J.; SHRADER, M.; HARBISON, M.T.; PORTERA, C.; SOLORZANO, C.C.; JAUCH, K-W.; HICKLIN, D.J.; RADINSKY, R.; ELLIS, L.M. Effect of the vascular endothelial growth factor receptor-2 antibody DC101 plus gemcitabine on growth, metastasis and angiogenesis of human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice. **International Journal of Cancer**, v. 102, p. 101-108, 2002.

BURK, R.R. A factor from a transformed cell line that affects cell migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, p. 368-372, 1973.

BURLINSON, B.; TICE, R.R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S.Y.; COLLINS, A.R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, T.S.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y.F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. Fourth

international workgroup on genotoxicity testing: results of the in vivo comet assay workgroup. **Mutation Research**, v. 627, p. 31-35, 2007.

BUTLER, M & DAWSON, M. Cell culture. Blackwell, **Scientific Publications**, Oxford, 1992.

CALIXTO, J.B.; CABRINI D.A. Herbal medicine catuama induces endothelium dependent and independent vasorelaxant action on isolated vessels from rats, guinea-pigs and rabbits. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 32-38, 1997.

CAPITOSTI, S. M.; HANSEN, T. P.; BROWN, M. L. Facile synthesis of an azido-labeled thalidomide analogue. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 327-336, 2004.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**, v. 9, p. 653-660, 2003.

CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nature Medicine**, v. 6, p. 389-395, 2000.

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W.G.; GAZDAR, A.F.; MINNA, J.D.; MITCHELL, J. B. Evaluation of a Tetrazolium-Based Semiautomated Colorimetric Assay - Assessment of Chemosensitivity Testing. **Cancer Research**, v. 47, p. 936-942, 1987.

CARVALHO, A.A.; COSTA, P.M.; VIEIRA, G.C.; JAMACARU, F.V.F.; MORAES, M.M.; CAVALCANTI, B.C.; PESSOA, C. Natural products used as candidates for angiogenesis inhibitors in cancer therapy – Review. **Trends in organic chemistry**, 2011.

CARVALHO, A.A. **Estudo do potencial antimetastático da biflorina**. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

CERNY, T.; GILLESSEN, S.; VON MOOS, R.; STOLZ, R. Thalidomide: from tragedy to promise. **Swiss Medical Weekly**, v. 133, p. 77-87, 2003.

CHAMBERS, C.A.; SULLIVAN, T.J.; TRUONG, T.; ALLISON, J.P. Secondary but not primary T cell responses are enhanced in CTLA-4-deficient CD8⁺ T cells. **European Journal of Immunology**, v. 28, p. 3137–3143, 1998.

CHAULET, C.; CROIX, C.; ALAGILLE, D, NORMAND, S.; DELWAIL, A.; FAVOT, L.; LECRON, J.C.; VIAUD-MASSUARD, M.C. Design, synthesis and biological evaluation of new thalidomide analogues as TNF- α and IL-6 production inhibitors **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 1019-1022, 2011.

CHEN, P.J.; MOORE, T.; NESNOW, S. Cytotoxic effects of propiconazole and its metabolites in mouse and human hepatoma cells and primary mouse hepatocytes **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 1476-1483, 2008.

CHUNG, F.; LU, J.; PALMER, B.; KESTELL, P.; BROWETT, P.; BAGULEY, C.B.; TINGLE, M.; CHING, L-M. Thalidomide pharmacokinetics and metabolite formation in mice, rabbits, and multiple myeloma patients. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 5949-5956, 2004.

COOK, K.M.; FIGG, W.D. Angiogenesis Inhibitors - Current Strategies and Future Prospects. **CA – A Cancer Journal for Clinicians**, v. 60, p. 222-243, 2010.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 249-261, 2004.

CORRAL, L.G.; HASLETT, P.A.; MULLER, G.W.; CHEN, R.; WONG, L.M.; OCAMPO, C.J.; PATTERSON, R.T.; STIRLING, D.I.; KAPLAN, G. Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of Thd analogues that are potent inhibitors of TNF- α . **The Journal of Immunology**, v. 163, p. 380-386, 1999.

COSTA-LOTUFO, L.V.; CUNHA, G.M.A.; FARIAS, P.A.M.; VIANA, G.S.B. ; CUNHA, K.M.A.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; GRAMOSA, N.V.; RAO, V.S.N. The Cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffi* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 1231-1234, 2002.

D'AMATO, R.J.; LOUGHNAN, M.S.; FLYNN, E.; FOLKMAN, J. Thalidomide Is an Inhibitor of Angiogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 4082-4085, 1994.

D'AMICO, F.; SKARMOUTSOU, E.; STIVALA, F. State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. **Journal of Immunological Methods**, v. 341, p. 1-18, 2009.

DARZYNKIEWICZ, Z. Assays of cell viability. Discrimination of cells dying by apoptosis. **Methods in Cell Biology**, v. 41, p. 15-38, 1994.

DELISSER, H.M.; CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M.; STRIETER, R.M.; BURDIK, M.D.; ROBINSON, C.S.; WEXLER, R.S.; KERR, J.S.; GARLANDA, C.; MERWIN, J.R.; MADRI, J.A.; ALBELDA, S.M. Involvement of endothelial PECAM-1/ CD31 in angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 151, p. 671-677, 1997.

DIAS, P.F.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.M.; VENDRUSCO, L.F.; NEIVA, T.J.; MARASCHIN, M.; GAGLIARDI, A.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Antiangiogenic and antitumoral properties of polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Cancer and Chemotherapy Pharmacology**, 2005.

DIGGLE, G.E. Thalidomide: 40 years on. **International Journal of Clinical Practice**, v. 55, p. 627-631, 2001.

DORDUNOO, S.K.; JACKSON J.K.; ARSENAULT, L.A.; OKTABA, A.M.; HUNTER, W.L.; BURT, H.M. Taxol encapsulation in poly (epsilon-caprolactone) microspheres. **Cancer and Chemotherapy Pharmacology**, v. 36, p. 279-282, 1995.

DORNELAS, C.A. **Efeitos da própolis verde na carcinogênese e angiogênese de tumores de bexiga induzidos pelo BBN em ratas wistar**. Tese (Doutorado em Cirurgia) - Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

DREDGE, K.; MARRIOTT, J.B.; MACDONALD, C.D.; MAN, H-W.; CHEN, R.; MULLER, G.W.; STIRLING, D.; DALGLEISH, A.G. Novel thalidomide analogues display anti-angiogenic activity independently of immunomodulatory effects. **British Journal of Cancer**, v. 87, p. 1166-1172, 2002.

DVORAK, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. **New England Journal of Medicine**, v. 315, p. 1650-1659, 1986.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 495-516, 2007.

EYAL-GILADI, H. The early embryonic development of the chick, as an epigenetic process. **Critical Reviews in Poultry Biology**, v. 3, p. 143-166, 1991.

EZEKOWITZ, R.A.; MULLIKEN, J.B.; FOLKMAN, J. Interferon alfa-2a therapy for life-threatening hemangiomas of infancy. **New England Journal of Medicine**, v. 28, p. 1456-1463, 1992.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The Comet Assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, p. 37-59, 1995.

FAYETTE, J.; SORIA, J.C.; ARMAND, J.P. Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 1109-1116, 2005.

FDA. **FDA approves thalidomide for hansen's disease side effects**. Disponível em: <<http://www.scienceblog.com/community/older/archives/M/1/fda0496.htm>>. Acesso em: 05 de outubro de 2011.

FECHINE-JAMACARU, F.V. **In vivo quantification of corneal angiogenesis using digital image processing**. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

FERREIRA, P. M.P.; FARIAS, D.F.; VIANA, M.P.; SOUZA, T.M.; VASCONCELOS, I.M.; SOARES, B.M.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; ANA CARVALHO, A. F.U. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 83, p.1-14, 2011.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nature Medicine**, v. 1, p. 27-31, 1995a.

FOLKMAN, J. Angiogenesis inhibitors generated by tumors. **Molecular Medicine**, v. 1, p. 120–122, 1995b.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **The New England Journal of Medicine**, v. 285 p. 1182–1186, 1971.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN M. Angiogenic Factors. **Science**, v. 235, p. 442-447, 1987.

FOLKMAN, J.; SHING Y. Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 313, p. 355-64, 1992.

FRANKS, M. E.; MACPHERSON, G. R.; FIGG, W. D. Thalidomide. **The Lancet**, v. 363, p. 1802–1811, 2004.

GAGLIARDI, A.; COLLINS, D.C. Inhibition of Angiogenesis by Antiestrogens. **Cancer Research**, v. 53, p. 533-535, 1993.

GAGLIARDI, A.; NICKEL, P.; COLLINS, D.C. Derivatives of Suramin Inhibit Angiogenesis. **Faseb Journal**, v. 7, p.125a, 1993.

GARCÍA, V.E.; CHULUYAN, H.E. SLAM and CD31: Signaling molecules involved in cytokine secretion during the development of innate and adaptive immune responses. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 18, p. 85-96, 2007.

GASPARINI, G.; LONGO, R.; FANELLI, M.; TEICHER, B. A. Combination of angiogenesis therapy with other anticancer therapies: results, challenges, and open questions. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, p. 1295-1311, 2005.

GORDON, J.N.; GOGGIN, P. M. Thalidomide and its derivatives: emerging from the wilderness. **Postgraduate Medical Journal**, v. 79, p. 127-132, 2003.

GRAÇA, B.; LUNET, C.; COELHO, A. S.; MONTEIRO, G.; FREIRE, P.; SPEIDEL A.; CARVALHO, L. Angiogenesis and cancer: from biopathology to therapy. **Acta Médica Portuguesa**, v. 217, p. 76-93, 2004.

GUTMAN, M.; SZOLD, A.; RAVID, A.; LAZAUSKAS, T.; MERIMSKY, O.; KLAUSNER, J.M. Failure of thalidomide to inhibit tumor growth and angiogenesis in vivo. **Anticancer Research**, v. 16, p. 3673-3677, 1996.

HALL, N.K.; SALAM, J.L.; HELLAWELL, H.M.; FALES, C.B.; KENSLER, J.A.; LUDWIG, G.; SZAKACS, D.E.; HIBBS, M.M. Synthesis, activity, and pharmacophore development for isatin-beta-thiosemicarbazones with selective activity toward multidrug-resistant cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p. 3191-3204, 2009.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, p. 49-92, 1951.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, p.353-364, 1996.

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

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

HASHIMOTO Y. Thalidomide as a multi-template for development of biologically active compounds. **Archiv der Pharmazie (Weinheim)**, v. 341, p. 536-547, 2008.

HASHIMOTO, Y. Structural Development of Biological Response Modifiers Based on Thalidomide. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 461-479, 2002.

HENDRIX, M.J.; SEFTOR, E.A.; HESS, A.R.; SEFTOR, R.E. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 411-421. 2003.

HLATKY, L.; HAHNFELDT, P.; FOLKMAN, J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, p. 883-893, 2002.

HOLASH, J.; MAISONPIERRE, P.C.; COMPTON, D.; BOLAND, P.; ALEXANDRES, C.R.; ZAGZAG, D.; YANCOPOULOS, G.D.; WIEGAND, S.J. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF, **Science**, v. 284, p. 1994-1998, 1999.

HOUILLON, C. Tolerance of ovarian grafts between the various species of urodele Amphibia; effects on the emission of heterologous eggs. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Science**, v. 274, p. 2790-2793, 1972.

HUANG, Y-T.; HSU, C.W.; CHIU, T.H. Thalidomide and Its Analogs as Anticancer Agents. **Tzu Chi Medical Journal**, p. 188-195, v. 20, 2008.

HURWITZ, H.; FEHRENBACHER, L.; NOVOTNY, W.; CARTWRIGHT, T.; HAINSWORTH, J.; HEIM, W.; BERLIN, J.; BARON, A.; GRIFFING, S.; HOLMGREN, E.; FERRARA, N.; FYFE, G.; ROGERS, B.; ROSS, R.; KABBINAVAR, F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, p. 2335-2342, 2004.

INCA. **Estimativa 2010**: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2009. Disponível:< <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>>. Acesso em: 2 set. 2011.

ITO, T.; ANDO, H.; SUZUKI, T.; OGURA, T.; HOTTA, K.; IMAMURA, YAMAGUCHI, Y.; HANDA, H. Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity. **Science**, v. 327, p. 1345-1350, 2010.

JAFFE, E. A.; NACHMAN, R. L.; BECKER, C. G.; MINICK, C. R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. **Journal of Clinical Investigation**, v. 52, p. 2745-56, 1973.

JIMENEZ, P. C. **Estaurosporinas de Eudistoma vannamei: química e bioatividade.** Tese (Doutorado em Farmacologia) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

JONES, N.; ILJIN, K.; DUMONT, D.J.; ALITALO, K. Tie receptors: New modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 257-267, 2001.

KAMB, A. What's wrong with our cancer models? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 161-165, 2005.

KENYON, B. M.; BROWNE, F.; D'AMATO, R. J. Effects of Thalidomide and Related Metabolites in a Mouse Corneal Model of Neovascularization. **Experimental Eye Research**, v. 64, p. 971-978, 1997.

KERBEL, R.S.; VILORIA-PETIT, A.; KLEMENTI, G.; RAK, J. 'Accidental' Anti-Angiogenic Drugs: Anti-Oncogene Directed Signal Transduction Inhibitors and Conventional Chemotherapeutic Agents As Examples. **European Journal of Cancer**, v. 36, p. 1248-1257, 2000.

KLAUDE, M.; ERIKSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTROM, G. The Comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**, v. 363, p. 89-96, 1996.

KOMOROWSKI, J.; JERCZYNSKA, H.; SIEJKA, A.; BARANSKA, P.; LAWNICKA, H.; PAWAOWSKA, Z.; STEPIEN, H. Effect of thalidomide affecting VEGF secretion, cell migration, adhesion and capillary tube formation of human endothelial EA.hy 926 cells. **Life Sciences**, v. 78, p. 2558-2563, 2006.

LEE, Y.L.; KIM, H.J.; LEE, M.S.; KIM, J.M.; HAN, J.S.; HONG, E.K.; KWON, M.S.; LEE, M. J. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. **Experimental Animals**, v. 52, p. 371-375, 2003.

LENZ, W . L'histoire de la thalidomide. Disponível em:<<http://www.thalidomide.ca/histoire-de-la-thalidomide/>>. Acesso em: 15 dez. 2011.

LI, Y.; JIANG, Z.; XIAO, Y.; LI, L.; GAO, Y. Metabolism of thalidomide by human liver microsome cytochrome CYP2C19 is required for its antimyeloma and antiangiogenic activities in vitro. **Hematological Oncology**, 2011. DOI: 10.1002/hon.992.

LIAO, F.; ALI, J.; GREENE, T.; MULLER, W.A. Soluble domain 1 of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) is sufficient to block transendothelial migration in vitro and in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 185, p. 1349-1357, 1997.

LIAO, W.; MCNUTT, M.A.; ZHU, W.G. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v. 48, p. 46-53, 2009.

LIEKENS, S.; CLERCQ, E.; NEYTS, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, p. 253-270, 2001.

LONGO, R.; SARMIENTO, R.; FANELLI, M.; CAPACCETTI, B.; GATTUSO, D.; GASPARINI, G. Anti-angiogenic therapy: rationale, challenges and clinical studies. **Angiogenesis**, v. 5, p. 237-256, 2002.

LOS, M.; BUREK, C. J.; STROH, C.; BENEDYK, K.; HUG, H.; MACKIEWICZ, A. Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as target for drug design. **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 67-77, 2003.

LUTZKY, V.P.; CARNEVALE, R.P.; ALVAREZ, M.J.; MAFFIA, P.C.; ZITTERMANN, S.I.; PODHAJECER, O.L.; et al. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) recycles and induces cell growth inhibition on human tumor cell lines. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, p. 1334-1350, 2006.

MAGALHÃES, H.I.F.; VERAS, M.L.; TORRES, M.R.; ALVES, A.P.N.N.; PESSOA, O.D.L.; SILVEIRA, E.R.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; PESSOA, C. In vitro and in vivo antitumor activity of physalins B and D from *Physalis angulata*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 235-241, 2006.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. **The American Journal of Pathology**, v. 146, p. 3-15, 1995.

MAKRILIA, N.; LAPPAS, T.; XYLA, V.; NIKOLAIDIS, I.; SYRIGOS, K. The role of *angiogenesis* in solid tumours: An overview. **European Journal of Internal Medicine**, v. 20, p. 663-671, 2009.

MARKS, M.G.; SHI, J.; FRY, M.O.; et al. Effects of putative hydroxylated thalidomide metabolites on blood vessel density in the chorioallantoic membrane (CAM) assay and on tumor and endothelial cell proliferation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25 p. 597-604, 2002.

MARRIOTT, J.B.; MULLER, G.; STIRLING, D.; DALGLEISH, A.G. Immunotherapeutic and anti-tumour potential of thalidomide analogues. **Expert Opinion of Biological Therapy**, v. 1, p. 675-682, 2001.

MELLIER, G.; HUANG, S.; SHENOY, K.; PERVAIZ, S. TRAILing death in cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, p. 93-102, 2010.

MENG, X.B.; HAN, D.; ZHANG, S.N.; GUO, W.; CUI, J.R.; LI, Z.J. Synthesis and anti-inflammatory activity of *N*-phthalimidomethyl 2,3-dideoxy- and 2,3-unsaturated glycosides. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 1169-1174, 2007.

MITSIADES, N.; MITSIADES, C.S.; POULAKI, V.; et al. Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. **Blood**, v. 99, p. 4525-4530, 2002.

MONTESANO, R. PEPPER, M.S.; VASSALLI, J.D.; ORCI, L. Modulation of angiogenesis *in vitro*. **EXS**, v. 61, p. 129-136, 1992.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2008.

MOREIRA, A.L.; FRIEDLANDER, D.P.; SHIF, B.; KAPLAN, G.; ZAGZAG, D. Thalidomide and a thalidomide analogue inhibit endothelial cell proliferation *in vitro*. **The Journal of Neuro-Oncology**, v. 43, p. 109-114, 1999.

MOREIRA, A.L.; SAMPAIO, E.P.; ZMUIDZINAS, A.; FRINDT, P.; SMITH, K.A.; KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 177, p. 1675–1680, 1993.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOURY, J.D.; SCHOENWOLF, G.C. Cooperative model of epithelial shaping and bending during avian neurulation: autonomous movements of the neural plate, autonomous movements of the epidermis, and interactions in the neural plate/epidermis transition zone. **Developmental Dynamics**, v. 204, p. 323-337, 1995.

MUNDHENKE, C.; MEYER, K.; DREW, S.; FRIEDL, A. Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 receptor binding in breast carcinomas. **American Journal of Pathology**, v.160, p.185-194, 2002.

MURRAY, J. C. **Angiogenesis protocols**. Methods in molecular medicine. Totowa: Humana Press, 2001.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as drug over the past 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, P.J. Switched at birth: a new family for PECAM-1. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 103, p.5-9, 1999.

NEWMAN, P.J. The biology of PECAM-1. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, p. 25-29, 1997.

NEWMAN, P.J.; NEWMAN, D.K. Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, p. 953-964, 2003.

NG, S.S.; BROWN, M.; FIGG, W.D. Thalidomide, an antiangiogenic agent with clinical activity in cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 194-199, 2000.

NGUYEN, M.; SHING, Y.; FOLKMAN, J. Quantitation of Angiogenesis and Antiangiogenesis in the Chick-Embryo Chorioallantoic Membrane. **Microvascular Research**, v. 47, p. 31-40, 1994.

NOCIARI, M.M.; SHALEV, A.; BENIAS, P.; RUSSO, C. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v. 213, p. 157-167, 1998.

NOWELL, P. C. Mechanisms of tumor progression. **Cancer Research**, v. 46, p. 2203-2207, 1986.

OLIVE, P. L. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. **Radiation Research**, v. 117, p. 79-92, 1989.

OPALKA, B.; DICKOPP, A.; KIRCH, H.C. Apoptotic genes in cancer therapy. **Cells Tissues Organs**, v. 172, p. 126-132, 2002.

OPPENHEIM, R.W.; LEVIN, H.L.; HARTH, M.S. An investigation of various eggopening techniques for use in avian behavioral embryology. **Developmental Psychobiology**, v. 6, p. 53-68, 1973.

ORGIV, C.; ABRAMS, M. Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction. **Chemical Reviews**, v. 99, p. 2201-2203, 1999.

ORMEROD, M. G. Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. **Journal of Immunology Methods**, v. 265, p. 73-80, 2002.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, p. 291-298, 1984.

PANDYA, N.M.; DHALLA, N.S.; SANTANI, D.D. Angiogenesis – a new target for future therapy. **Vascular Pharmacology**, v. 44, p. 265-274, 2006.

PARRY, R.V.; CHEMNITZ, J.M.; FRAUWIRTH, K.A.; LANFRANCO, A.R.; BRAUNSTEIN, I.; KOBAYASHI, S.V.; et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, p. 9543-9553, 2005.

PATEL, Z.S.; MIKOS, A.G. Angiogenesis with biomaterial-based drug-and cell-delivery systems. **Journal of Biomaterials Science, Polymer**, v. 15, p. 701-726, 2004.

PATERSON, D.L.; GEORGHIOU, P.R.; ALLWORTH, A.M.; KEMP, R.J. Thalidomide as treatment of refractory aphthous ulceration related to human immunodeficiency virus infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, p. 250-254, 1995.

PERKINS, W.R.; DAUSE, R.B.; LI, X.; FRANKLIN, J.C.; CABRAL-LILLY, D.J.; ZHA, Y.; DANK, E.H.; MAYHEW, E.; JANOFF, A.S. Combination of antitumor ether lipid with lipids of complementary molecular shape reduces its hemolytic activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1327, p. 61-68, 1997.

PERKINS, W. R.; DAUSE, R.B.; LI, X.; FRANKLIN, J.C.; CABRAL-LILLY, D.J.; ZHA, Y.; DANK, E.H.; MAYHEW, E.; JANOFF, A.S. Combination of antitumor ether lipid with lipids of complementary molecular shape reduces its hemolytic activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1327, p. 61-68, 1997.

PERRI, A.J.; HSU, S. A review of thalidomide's history and current dermatological applications. **Dermatology Online Journal**, v. 9, p. 5, 2003.

PERROTE, P.; MATSUMOTO, T.; INOUE, K. Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibody C225 Inhibits Angiogenesis in Human Transitional Cell Carcinoma Growing Orthotopically in Nude Mice. **Clinical Cancer Research**, v. 5, p. 257-265, 1999.

PESSOA, C.; FERREIRA, P.M.P.; COSTA- LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; CAVALCANTI, S.M.T.; COELHO, L.L.; HERNANDES, M.Z.; LEITE, A.C.L.; SIMONE, C.A.; COSTA, V.M.A.; SOUZA, V.M.O. Discovery of Phthalimides as Immunomodulatory and Antitumor Drug Prototypes. **ChemMedChem**, v. 5, p. 523-528, 2010.

PINHO, M.S.L. Angiogênese: o gatilho proliferativo. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 25, p. 396-402, 2005.

PINTER, E.; BARREUTHER, M.; LU, T.; IMHOF, B.A.; MADRI, J.A. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) tyrosine phosphorylation state changes during vasculogenesis in the murine conceptus. **The American Journal of Pathology**, v. 150, p.1523-1530, 1997.

PONCELET, C.; MADELENAT, P.; FELDMANN, G.; WALKER, F.; DARAI, E. Expression of von Willebrand's factor, CD34, CD31, and vascular endothelial growth factor in uterine leiomyomas. **Fertility and Sterility**, v. 78, p. 581-586, 2002.

POON, R.T.P.; LAU, C.P.Y.; HO, J.W.Y.; YU, W.C.; FAN, S.T.; WONG, J. Tissue Factor Expression Correlates with Tumor Angiogenesis and Invasiveness in Human Hepatocellular Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 5339-5345, 2003.

PRIDGEON, S.; DRAKE, M. Thalidomide and its use in renal and prostate cancer. **Cancer Therapy**, v. 3, p. 65-76, 2005.

RAICA, M.; CIMPEAN, A.M.; RIBATTI, D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. **European Journal of Cancer**, v. 45, p. 1924-1934, 2009.

RAJKUMAR, S.V.; FONSECA, R.; DISPENZIERI, A.; LACY, M.Q.; LUST, J.A.; WITZGI, T.E.; KYLE, R.A.; GERTZ, M.A.; GREIPP, P.R. Thalidomide in the treatment of relapsed multiple myeloma. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 75, p. 897-901, 2000.

REDDY, K.B.; NABHA, S.M.; ATANASKOVA, N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 22, p. 395-403, 2003.

RICHARDSON, D.R.; SHARPE, P.C.; LOVEJOY, D.B.; SENARATNE, D.; KALINOWSKI, D.S.; ISLAM, M.; BERNHARDT, P.V. Dipyriddy thiosemicarbazone chelators with potent and selective antitumor activity form iron complexes with redox activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 6510-6521, 2006.

RICHARDSON, P.; HIDESHIMA, T.; ANDERSON, K. Thalidomide: Emerging Role in Cancer Medicine. **Annual Review Medicine**, v. 53, p. 629-657, 2002.

RICHARDSON, P.G.; SCHLOSSMAN, R.L.; WELLER, E.; HIDESHIMA, T.; MITSIADES, C.; DAVIES, F.; LEBLANC, R.; CATLEY, L.P.; DOSS, D.; KELLY, K.; MCKENNEY, M.; MECHLOWICZ, J.; FREEMAN, A.; DEOCAMPO, R.; RICH, R.; RYOO, J.J.; CHAUHAN, D.; BALINSKI, K.; ZELDIS, J.; ANDERSON, K.C. Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma. **Blood**, v. 100, p. 3063-3067, 2002.

RIVAL, Y.; MASCHIO, A.D.; RABIET, M.; DEJANA, E.; DUPERRAY, A. Inhibition of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 synthesis and leukocyte transmigration in

endothelial cells by the combined action of TNF- α and IFN- γ . **The Journal of Immunology**, v. 157, p. 1233-1241, 1996.

ROCA, C.; ADAMS, R.H. Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. **Genes & Development**, v. 21, p. 2511-2524, 2007.

ROMER L, MCLEAN N, YAN H, DAISE M, SUN J, DELISSER H. IFN- γ and TNF- α induce redistribution of PECAM-1 (CD31) on human endothelial cells. **The Journal of Immunology**, v. 154, p. 6582-6592, 1995.

ROODINK, I.; LEENDERS, W.P.J. Targeted therapies of cancer: Angiogenesis inhibition seems not enough, **Cancer Letters**, v. 299, p. 1–10, 2010.

ROSA, R. M. **Citotoxicidade, genotoxicidade e potencial mutagênico do diseleneto de difenila em células de mamíferos**. Tese (Doutorado) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SAMPAIO, E.; SARNO, E.; GALILLY, R.; COHN, Z.; KAPLAN, G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor α production by stimulated human monocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 173, p. 699-703, 1991.

SATO, D.; WAL, R.; OLIVEIRA, C.C.; CATTANEO, R.I.I.; MALVEZZI, M.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication. **Homeopathy**, v. 94, p. 26-32, 2005.

SCHABEL, F. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 1, p. 411-435, 1977.

SCHOENWOLF, G.C. Formation and patterning of the avian neuraxis: one dozen hypotheses. **Ciba Foundation Symposium**, v. 181, p. 25-38, 1994.

SHIBLEY, I.A.; PENNINGTON, S.N. Sodium ion-dependent (N-methylamino)- alpha-isobutyric [correction of isobutyric] acid uptake by embryonic chick cells exposed to ethanol in ovo: response to the stimulation/downregulation of protein kinases. **Alcohol**, v. 33, p. 451-6, 1998.

SHINJI, C.; MAEDA, S.; IMAI, K.; YOSHIDA, M.; HASHIMOTO, Y.; MIYACHI, H. Design, synthesis, and evaluation of cyclic amide/imide-bearing hydroxamic acid derivatives

as class-selective histone deacetylase (HDAC) inhibitors. **Bioorganic & medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 7625-7651, 2006.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicologia**. Porto Alegre, Alcance, p. 422, 2003.

SINGHAL, S.; MEHTA, J. Thalidomide in cancer. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 56, p. 4, 2002.

SINGHAL, S.; MEHTA, J.; DESIKAN, R.; AYERS, D.; ROBERSON, P.; EDDLEMON, P.; MUNSHI, N.; ANAISSIE, E.; WILSON, C.; DHODAPKAR, M.; ZEDDIS, J.; BARLOGIE, B. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. **New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 1565-1571, 1999.

SLEIJFER, S.; KRUIT, W.H.J.; STOTER, G. Thalidomide in solid tumours: the resurrection of and old drug. **European Journal of Cancer**, v. 40, p. 2377-2382, 2004.

SNEDDON, H.; HADDEN, R.; HEPPEL, P.G. Chemosensory learning in the chicken embryo. **Physiology & Behavior**, v. 64, p. 133-139, 1998.

SOUZA, R.; ZAHEDI, P.; MORIYAMA, E.H.; ALLEN, C.J.; BRIAN C. WILSON, B.C.; PIQUETTE-MILLER, M. Continuous Docetaxel Chemotherapy Improves Therapeutic Efficacy in Murine Models of Ovarian Cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 9, 2010.

STATON, C.A.; BROWN, N.J.; REED, M.W. Current Status and Future Prospects for Anti-Angiogenic Therapies in Cancer. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 4, p.961-979, 2009.

STĘPIEŃ H.; ŁAWNICKA, H.; MUCHA, S.; WĄGROWSKA-DANILEWICZ, M.; STĘPIEŃ, B.; SIEJKA, A.; KOMOROWSKI, J. Inhibitory effect of thalidomide on the growth, secretory function and angiogenesis of estrogen-induced prolactinoma in Fischer 344 rats. **Life Sciences**, v. 79, p. 1741-1748, 2006.

TAN, P.H.; CHANA, C.; XUEA, S.A.; DONGA, R.; ANANTHESAYANAN, B.; MANUNTA, M.; KEROUEDAN, C.; CHESHIRE, N.J.W.; WOLFE, J.H.; HASKARD, D.O.; TAYLOR, K.M.; GEORGE A.J.T. Phenotypic and functional differences between human saphenous vein (HSVEC) and umbilical vein (HUVEC) endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 173 p. 171-183, 2004.

TANG, D.; CHEN, Y.; NEWMAN, P.; SHI, L.; GAO, X.; DIGLIO, C.; et al. Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 22883-22894, 1993.

TAYLOR, C.R.; SHI, S.R.; BARR, N.J. **Diagnostic Immunohistochemistry. Theranostic and Genomic Applications.** ed. Saunders, capítulo 1: Techniques of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls, and Standardization, p. 1-41, 2011.

TEO, S.; MORGAN, M.; STIRLING, D.; THOMAS, S. Assessment of the in vitro and in vivo genotoxicity of Thalomid[®] (thalidomide). **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 20, p. 301-311, 2000.

TEO, S.K. Properties of thalidomide and its analogues: implications for anticancer therapy. **The AAPS Journal**, v. 7, p. 14-21, 2005.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TSUKAMOTO, I.; SAKAKIBARA, N.; MARUYAMA, T.; IGARASHI, J.; KOSAKA, H.; KUBOTA, Y.; TOKUDA, M.; ASHINO, H.; HATTORI, K.; TANAKA, S.; KAWATA, M.; KONISHI, R. A novel nucleic acid analogue shows strong angiogenic activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 399, p. 699-704, 2010.

VALDES-DAPENA, M.A.; AREY, J.B. The diagnosis of malignant neoplasms in infants and children. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 4, p. 164-173, 1974.

VARGAS, A.; ZEISSER-LABOUÈBE, M.; LANGE, N.; GURNY, R.; DELIE, F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo valuation of drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1162-1176, 2007.

VARGESSON, N. Thalidomide-induced limb defects: resolving a 50-year-old puzzle. **Bioassays**, v. 31, p. 1327-1336, 2009.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunology Methods**, v. 243, p.167-190, 2000.

VESELA, D.; VESELY, D.; JELINEK, R. Embryotoxicity in chick embryo of thalidomide hydrolysis products following metabolic activation by rat liver homogenate. **Functional and developmental morphology**, v. 4, p. 313-316, 1994.

WEIDNER, N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. **American Journal of Pathology**, v. 147, n. 1, p. 9-19, 1995.

YU, Y.; KALINOWSKI, D.S.; KOVACEVIC, K.; SIAFAKAS, A.R.; JANSSON, P.J.; STEFANI, C.; LOVEJOY, C.B.; BERNHARDT, P.V.; RICHARDSON, D.R. Thiosemicarbazones from the old to new: Iron chelators there are more than just ribonucleotide reductase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p. 5271-5294, 2009.

ZAHRAN, M.A.H.; SALEM, T.A.R.; SAMAKA, R.M.; AGWA, H.S.; AWAD A.R. Design synthesis and antitumor evaluation of novel thalidomide dithiocarbamate and dithioate analogs against Ehrlich ascites carcinoma-induced solid tumor in Swiss albino mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 9708-9718, 2008.

ZAMAI, L.; CANONICO, B.; LUCHETTI, F.; FERRI, P.; MELLONI, E.; GUIDOTTI, L.; CAPPELLINI, A.; CUTRONEO, G.; VITALE, M.; PAPA, S. Supravital Exposure to Propidium Iodide Identifies Apoptoses on Adherent Cells. **Cytometry**, v. 44, p. 57-64, 2001.

ZHANG, L-H.; LU, L.; WU, L.; DREDGE, K.; BARTLETT, J. B.; SCHAFER, P. H.; MULLER, G.; DALGLEISH, A. Comparison of anti-angiogenic activities of thalidomide and lenalidomide in vitro. **Proceedings of the American Association for Cancer Research**, v. 47, p.372-377, 2006.

ZHU, Y.X.; BRAGGIO, E.; SHI, C.X.; BRUINS, L.A.; SCHMIDT J.E.; VAN-WIER, S.; CHANG, X.B.; BJORKLUND, C.C.; FONSECA, R.; BERGSAGEL, P.L.; ORLOWSKI, R.Z.; STEWART, A.K. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. **Blood**, v. 118, p. 4771-4779. 2011.

ZUCO, V.; SUPINO, R.; RIGHETTI, S.C.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; FORMELLI, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Letters**, v. 175, p. 17-25, 2002.

YANYONG, K.; FENGCAI, W.; JING, F.; DONGLING, Y.; XU, Y.; XIYUN, Y.
Knockdown of CD146 reduces the migration and proliferation of human endothelial cells.
Cell Research. v. 16, p. 313-318, 2006.

8. ANEXOS

ANEXO A: Artigo - Discovery of phthalimides as immunomodulatory and antitumor drug prototypes.

COMMUNICATIONS

DOI: 10.1002/cmdc.200900525

Discovery of Phthalimides as Immunomodulatory and Antitumor Drug Prototypes

Claudia Pessoa,^[b] Paulo Michel P. Ferreira,^[b] Letícia Veras C. Lotufo,^[b] Manoel O. de Moraes,^[b] Suellen M. T. Cavalcanti,^[a] Lucas Cunha D. Coêlho,^[a] Marcelo Z. Hernandez,^[a] Ana Cristina L. Leite,^{*,[a]} Carlos A. De Simone,^[c] Vláudia M. A. Costa,^[d] and Valdênia M. O. Souza^[a, d]

Introduction

Modulation of the immune system is an emerging concept in the control of tumor growth.^[1] While there are many mechanisms that underlie the role the immune system plays in tumor cells, minimizing metastasis by attenuating the expression of pro-angiogenic cytokines, or up-regulating the expression of endothelial factors that are crucial for the angiogenic process in metastasis and alternatively enhancing the antitumor immunity mediated by interferon- γ and interleukin-2 are the most significant features identified to date.^[2,3] In view of this, the discovery of small immunomodulating agents is a task that is currently receiving much attention.

Among the anticancer and immunomodulatory drug candidates that have entered into clinical trials, the majority are analogues of thalidomide (Thl, **1**), such as lenalidomide (Revlimid, CC-5013) and ACTIMID (CC-4047).^[4] Studies of structure–activity relationships (SARs) in the analogues and metabolites of Thl have shown that phthalimide is an essential pharmacophoric fragment.^[5] Following this line of research, phthalimide has commonly been employed in the design of potential anti-inflammatory,^[6] immunomodulatory,^[7] antiangiogenic,^[8] and antitumor^[9] drug candidates. Given this promising outlook, the strategy of molecular hybridization using phthalimide as a pharmacophoric fragment has figured prominently in recent research and has given rise to many successful outcomes.^[10] As an example, potent and selective histone deacetylase (HDAC) inhibitors have been designed by hybridizing two distinct structural domains: phthalimide and the hydroxamic acid sub-

unit. This has led to the identification of various SARs and the discovery of a new potent hybrid lead compound, (*E*)-3-(1-oxo-2-(1,2-diphenylethyl)isoindolin-6-yl)-*N*-hydroxyacrylamide, which has been described as having selective toxicity against tumor cells.^[11]

On the other hand, the thiosemicarbazones have figured prominently in the vast number of structural subunits used to design anticancer agents.^[12] Some well-known mechanisms involving thiosemicarbazones involve the inhibition of ribonucleotide reductase,^[13] alteration of DNA structure,^[14] and the chelation of endogenous metals.^[13] An example of this versatility was recently reported by Gottesman and co-workers, who used the molecular hybridization of the β -isatin scaffold and thiosemicarbazones. It was clearly demonstrated that the insertion of a thiosemicarbazone subunit into optimal templates leads to an improvement in the anticancer properties of β -isatins, paving the way for the discovery of potent and selective anticancer compounds such as the lead compound 1-(5'-fluoroisatin)-4-(4'-methoxyphenyl)-3- thiosemicarbazone (**2**; IC₅₀ = 5.2 μ M against multidrug-resistant cells that express P-glycoprotein).^[15] Because of this unique pharmacological profile, the attachment of thiosemicarbazones has been employed both in the design of ligands for further complexation with transition metals^[12] and during the processes of hit-to-lead or lead-to-drug conversions.^[13]

Bearing in mind the molecular pharmacophores outlined above and structural requirements, we describe herein the design, synthesis, and pharmacological evaluation of 11 new potential antitumor and immunomodulatory agents. To establish an appropriate set of SARs, we first prepared phthalimides containing the thiosemicarbazide **2b** or thiosemicarbazone **4** subunits. An attempt was then made to synthesize two bioisosteres^[16] of **2b**: the semicarbazide **2a** and aminoguanidine **2c** derivatives, in addition to the analogues of **2b** containing *N*-methyl or *N*-phenyl substituents. Subsequently, a short series of phthalimides bearing the thiazolin-4-one ring (compounds **3a–d**) was also investigated, for reasons of the bioisosteric relationship present between thiazolin-4-ones and thiosemicarbazones^[17] and the significant number of thiazolin-4-ones that are active against multidrug-resistant cancer cells, as in the case of the lead compound **3**.^[18] Our design incorporated the molecular hybridization approach suggested by the structural features of prototypes **1–3** in addition to molecular bioisosterism (Figure 1).

The compound series **2a–f** was first prepared by using microwave irradiation, in view of a recent report in which the reaction of *N*-(hydroxymethyl)phthalimide with arylamines using microwave heating under normal conditions rapidly furnishes

[a] S. M. T. Cavalcanti, L. C. D. Coêlho, Dr. M. Z. Hernandez, Prof. A. C. L. Leite, Dr. V. M. O. Souza
Department of Pharmaceutical Sciences
Centre for Health Science, Federal University of Pernambuco (UFPE)
50740-520 Recife, PE (Brazil)
Fax: (+55) 081-2126-8510
E-mail: ana.leite@pq.cnpq.br

[b] Dr. C. Pessoa, P. M. P. Ferreira, Dr. L. V. C. Lotufo, Prof. M. O. de Moraes
Department of Physiology and Pharmacology
Centre for Health Science, Federal University of Ceará
60430-270 Fortaleza, CE (Brazil)

[c] Dr. C. A. De Simone
Department of Physics and Informatics
Institute of Physics, University of São Paulo
13560-970 São Carlos, SP (Brazil)

[d] Dr. V. M. A. Costa, Dr. V. M. O. Souza
Laboratory of Immunopathology Keiso-Asami (LIKA)
Department of Parasitology, UFPE
50740-520 Recife, PE (Brazil)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.200900525>.

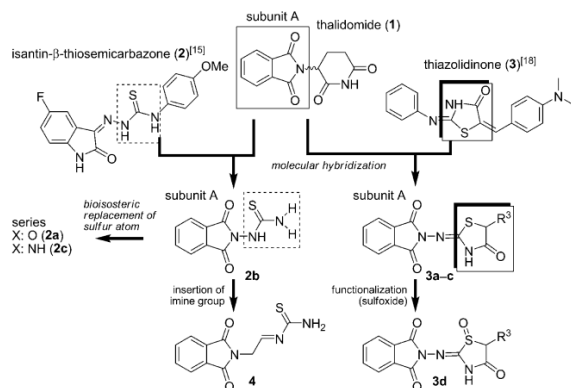
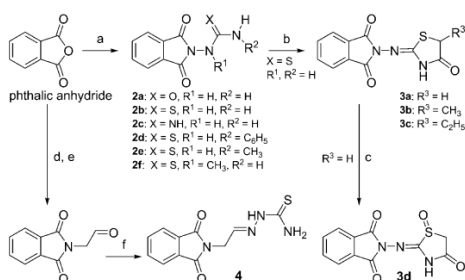


Figure 1. Our design concept of antitumor and immunomodulatory drugs exploring the molecular hybridization of prototypes 1–3.

the substituted phthalimides in excellent yields.^[15] However, such conditions led only to complex mixtures of by-products without the generation of desired products. Therefore, the reactions were performed with conventional heating,^[20] which provided compounds **2a–f** in good yields in crystalline form (Scheme 1). Thiazolin-4-ones **3a–d** were then synthesized by



Scheme 1. Reagents and conditions: a) NH₂NR¹C(X)NHR², DMAP, DMF, reflux (3 h); b) BrCH(R³)CO₂H, NaOAc, EtOH, reflux, 10 h; c) mCPBA, CH₂Cl₂, 0 °C, 5 h; d) aminoacetaldehyde diethyl acetal, DMAP, toluene, reflux (1 h); e) 0.1 N H₂SO₄, H₂O, reflux, 5 h; f) thiosemicarbazide, H₂SO₄ (3 drops), EtOH, reflux, 2 h.

following a reported procedure^[21] that condenses thiosemicarbazide **2b** with the respective α -bromocarboxylic acids, fused sodium acetate and ethanol under reflux. Alternatively, it was possible to prepare compounds **3a–c** by one-pot reactions starting with phthalic anhydride. This produced yields similar to those provided by conventional two-step reactions, although more efficiently and with shorter reaction times (6 h in one-pot versus 13 h for two-step reactions).

Although the structures of **3a–d** appear reasonable, other possibilities, such as the tautomer **3a-I**, were also considered (scheme S1, Supporting Information).^[22] An attempt to distinguish between structures **3a** and **3a-I** by ¹H NMR NOESY experiments was inconclusive, probably due to variations in the NH signal. Although phthalimide **2b** produced single crystals suitable for X-ray diffraction (Supporting Information), our attempt to obtain single crystals of **3a** was unsuccessful. We therefore carried out ab initio calculations using the unsubstituted derivative **3a** and its tautomer **3a-I** as models, employing the B3LYP/6-31G(d,p) level of theory (see Supporting Information).

As shown in Figure 2, tautomer **3a** is 16.86 kJ mol⁻¹ more stable than **3a-I**. Additional experiments corroborated this, as compound **3a** does not undergo N-acetylation under mild

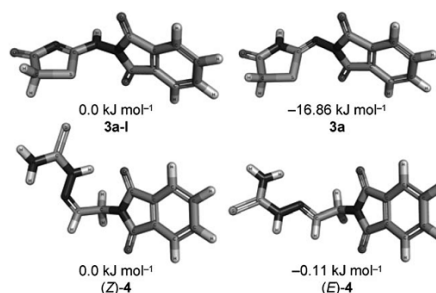


Figure 2. Optimized geometries and relative stability of the tautomers **3a** and **3a-I**, and the *Z* and *E* isomers of compound **4**, obtained by ab initio calculations using the B3LYP/6-31G(d,p) method.

conditions; this reactivity is typical of an amide NH group (scheme S1, Supporting Information). Sulfoxide derivative **3d** was prepared using a slightly modified protocol with *meta*-chloroperoxybenzoic acid (mCPBA) as an oxidizing agent,^[23] while thiosemicarbazone **4** was obtained in three steps starting from phthalic anhydride, yielding a single product. Our quantum chemical calculations, performed with the same methodology mentioned above, revealed that the energy levels of the *E* and *Z* isomers of **4** are nearly degenerate, with the *E* isomer only 0.11 kJ mol⁻¹ more stable than the *Z* isomer (Figure 2). Therefore, it seems fair to suggest that the structures proposed for **3a–d** are correct and that compound **4** probably adopts

the *E* configuration. The physical and chemical data for these compounds are listed in Table 1.

With their structures elucidated, all compounds were tested as immunomodulatory and anticancer agents. In an attempt to

Table 1. Physical and chemical properties of the phthalimide derivatives.						
Compd	Formula ^[a]	<i>M</i> _r [Da]	Yield [%] ^[b]	mp [°C]	<i>R</i> _f ^[c]	Clog <i>P</i> ^[d]
2a	C ₉ H ₇ N ₃ O ₃	205.17	57	203–205	0.71	−0.42
2b	C ₉ H ₇ N ₃ O ₃ S	221.23	61	264–268	0.87	0.39
2c	C ₉ H ₉ N ₃ O ₃	204.19	55	287–291	0.74	−0.84
2d	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	297.33	62	261–263	0.40	2.26
2e	C ₁₀ H ₉ N ₃ O ₃ S	235.26	45	231–233	0.66	0.74
2f	C ₁₀ H ₇ N ₃ O ₃ S	235.26	90	216–218	0.82	0.63
3a	C ₁₁ H ₇ N ₃ O ₃ S	261.25	50	221–223	0.84	0.56
3b	C ₁₂ H ₇ N ₃ O ₃ S	275.28	65	229–230	0.79	0.93
3c	C ₁₃ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	289.31	99	178–179	0.87	1.37
3d	C ₁₁ H ₇ N ₃ O ₃ S	277.26	42	264–265	0.76	0.03
4	C ₁₁ H ₉ N ₃ O ₃ S	262.29	75	221–222	0.80	1.35

[a] Analytical data for C, H, N, and S are within ±0.4% of calculated values. [b] Isolated products. [c] Solvent: EtOAc/CH₂Cl₂ (8:2); spots were visualized under UV light. [d] Determined with ALOGPS 2.1.^[26]

replicate the *in vivo* immunological aspects, we performed *in vitro* assays using the total spleen cell population that includes macrophages and lymphocytes.^[24] To this end, spleen cells from Balb/c mice were cultured in the presence of each compound at 20 μM together with concanavalin A (Con A) or lipopolysaccharide (LPS). The stimulus with Con A was thus suitable for analyzing interleukin-2 (IL-2) production and consequent lymphocyte proliferation (Figure 3a), as well as the generation of nitric oxide (NO). Interleukin-10 (IL-10) production was only detected under LPS stimulation. In all these assays, ThI was used as the reference drug (20 μM). Regarding the production of IL-2 (a proliferative cytokine), it was observed that this was not altered by the presence of these phthalimides (Figure 3b), except for phthalimide **2b**, which decreased IL-2 production by 50% relative to LPS-treated splenocytes as an experimental control. Likewise, the proliferative effect induced by Con A was not drastically impaired by any of these phthalimides (Figure 3a). Under the same conditions, we also examined the effects of these phthalimides on the production of interferon-γ (IFN-γ), a pro-inflammatory cytokine associated with antitumor and antiviral protection.^[25] Apart from compound **3c**, which altered the production of IFN-γ, we did not observe significant suppression of IFN-γ secretion by splenocytes in response to Con A (figure S3, Supporting Information).

Production of NO in splenocytes stimulated with Con A was decreased by all the phthalimides (Figure 4a), thereby enabling us to establish a set of interesting SAR data. Analysis of the phthalimides belonging to the **2a–f** series showed that the unsubstituted derivative **2a** is active in inhibiting the production of NO, but it is only half as potent as ThI. Comparison of the inhibitory activities of **2b** and its bioisostere **2a** revealed the latter to be twice as active and to have potency similar to that of ThI. More interestingly, the replacement of the S atom of **2b** by NH in **2c** led to a guanidine derivative that is almost inac-

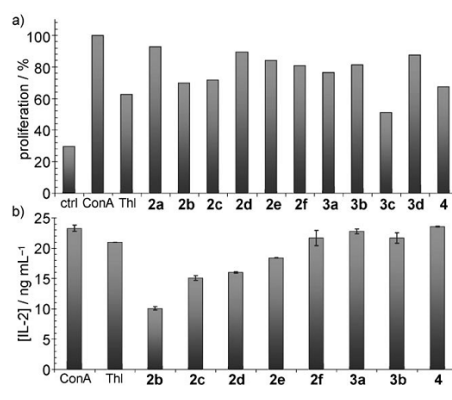


Figure 3. a) Proliferation response of Balb/c mouse splenocytes stimulated with Con A (2.5 μg mL^{−1}) alone and in conjunction with phthalimides or ThI (each at 20 μM); the cell proliferation induced by Con A was monitored by the percentage of AlamarBlue reduction after 62 h treatment with the tested compounds; data are the average of three replicates. b) Effect of phthalimides and ThI (each at 20 μM) on the production of IL-2 by Balb/c mouse splenocytes (5 × 10⁶) stimulated with Con A (5 μg mL^{−1}); IL-2 content in the supernatant from splenocyte culture was measured after 24 h by sandwich ELISA (BD Bioscience); data are the mean ± SD of values obtained in triplicate.

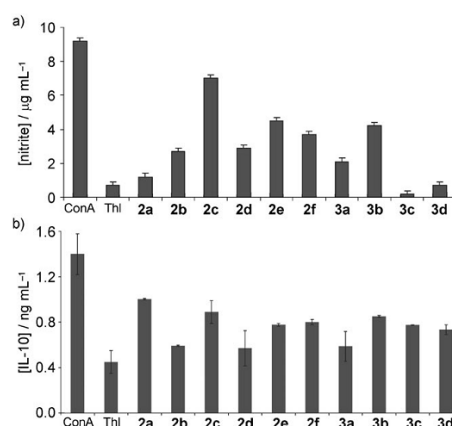


Figure 4. a) Effect of phthalimides and ThI (each at 20 μM) on NO production by Balb/c mouse splenocytes (5 × 10⁶) stimulated with Con A (5 μg mL^{−1}); the content of NO in the supernatant of splenocyte culture was determined with the Griess reagent after incubation for 72 h; absorbance was measured at λ 540 nm; nitrite concentration was calculated from a NaNO standard curve, and data are the mean ± SD of values obtained in triplicate. b) Effect of phthalimides and ThI (each at 20 μM) on the production of IL-10 by Balb/c mouse splenocytes (5 × 10⁶) stimulated with LPS (5 μg mL^{−1}); IL-10 content in the supernatant from cultured cell was measured after 72 h by sandwich ELISA (BD Bioscience); data are the mean ± SD of values obtained in triplicate.

CHEMMEDCHEM

tive at the tested dose. On the one hand, replacing the R² H atom of **2b** with a phenyl group in **2d** led to equipotent compounds. Replacement of hydrogen by methyl groups (compounds **2e** and **2f**), on the other hand, led to a steady decrease in potency to inhibit NO production.

Regarding the inhibition of NO by phthalimides containing the thiazolin-4-one ring (compounds **3a–d**), it was possible to draw up an interesting set of SAR data. On the one hand, replacement of the thiosemicarbazide subunit of **2b** with the thiazolin-4-one ring in **3a** led to equipotent compounds. On the other hand, with the exception of thiazolin-4-one **3c**, which was as potent as Thl in decreasing NO levels, the other thiazolin-4-ones displayed low efficacy in inhibiting NO production. Although tested in triplicate, NO was not detected in spleen cells treated with thiosemicarbazone **4** at 20 μM . In general, the inhibition of NO displayed by these compounds is attractive, because NO plays a pivotal role in tumor growth and inflammatory processes.^[10d] As proof of this, the modulation of NO may be directly associated with different cell activities, including angiogenesis.^[10a]

Additional experiments were performed involving the measurement of IL-10, as this cytokine controls the overproduction of pro-inflammatory molecules such as NO, tumor necrosis factor- α (TNF- α), and IFN- γ . Figure 4b shows that the tested phthalimides decrease IL-10 levels to a significant degree, although not to the extent observed with Thl. There was a decrease in IL-10 levels in the case of all the phthalimides, with inhibition of 30–57% relative to cells treated with LPS alone, while the value for suppression of IL-10 by Thl was 70%. This attenuation in IL-10 secretion is in accordance with our earlier observation that these compounds inhibit NO synthesis.

It is possible to draw some conclusions in light of these findings. First, these compounds share immunosuppressive properties to some degree and achieve this by maintaining low IL-10 production and suppressing NO synthesis; however, this comes with the notable advantage that these compounds do not affect the immune response elicited by T-lymphocytes. Second, the results for lymphocyte proliferation, IL-2 and IFN- γ syntheses suggest that these phthalimides do not possess general immunosuppressive properties, a characteristic that is highly desirable in new immunomodulatory drug candidates. These findings provide evidence that these phthalimides act on the immune system, halting the spread of tumor metastases. It is also plausible that these compounds may sustain anti-tumor immunity dependent on T-cells.

In view of the way these compounds act on the immune system, it is reasonable to investigate their anticancer properties. These phthalimides were thus first evaluated in vitro against four tumor cell lines: MDA/MB-435 (breast), HL-60 (leukemia), HCT-8 (colon), and SF-295 (glioblastoma). Table 2 summarizes the IC₅₀ values for these compounds, using doxorubicin (Dox) as the control drug and Thl as the reference phthalimide. Apart from sulfoxide derivative **3d**, which is capable of inhibiting the growth of all four cell lines tested, all the others were inactive (IC₅₀ > 300 μM). In the same assay, Thl was not able to inhibit the proliferation at the highest dose of 300 μM . Likewise, using mouse erythrocytes, neither these phthalimides

Table 2. In vitro cytotoxic activity of compounds against human tumor cells.

Compd	IC ₅₀ [μM] ^[a]			
	MDA/MB-435	HCT-8	SF-295	HL-60
2a	> 300	> 300	223 (147–225)	216 (119–320)
2b	> 300	> 300	> 300	> 300
2c	> 300	> 300	> 300	> 300
2d	> 300	> 300	> 300	176 (156–196)
2e	> 300	> 300	> 300	> 300
2f	> 300	> 300	> 300	> 300
3a	> 300	> 300	> 300	> 300
3b	> 300	> 300	> 300	> 300
3c	> 300	> 300	> 300	> 300
3d	16 (13–17)	31.6 (24–41)	10 (8–13)	8.0 (5.6–11.3)
4	> 300	> 300	> 300	> 300
Dox ^[b]	2.5 (2.5–5.0)	2.5 (2.5–5.0)	5.7 (4.7–6.2)	5.0 (2.5–5.0)
Thl ^[c]	> 300	> 300	> 300	121 (91–162)

[a] Values measured after incubation for 72 h; 95% confidence interval obtained from at least three independent experiments; SD values in parentheses. [b] Doxorubicin. [c] Thalidomide.

nor Thl led to hemolytic action, even at the highest concentration of 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (data not shown), confirming that these compounds do not have in vitro antiproliferative effects and do not act on the cell membranes of erythrocytes.

These preliminary observations are not inconsistent, because in order to effect antitumor activity, Thl and its analogues undergo biological metabolism.^[9a] To ascertain this, the antitumor properties of selected compounds were investigated in mice bearing 180 sarcoma (Figure 5). In this case, our in vivo results were more promising. Three of the most potent NO inhibitors

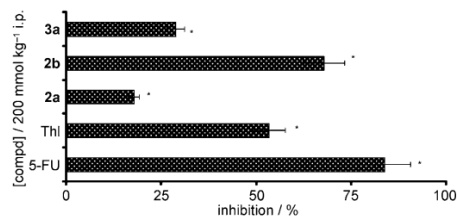


Figure 5. Antitumor effects of phthalimides in mice transplanted with S-180 sarcoma. Results are expressed as the mean value \pm SEM for $n=8$ animals. Percent inhibition was obtained by comparison with the control group, which received only vehicle (data not shown); * $p < 0.01$ relative to control by ANOVA followed by Student Newman–Keuls test.

that decreased IL-10 levels (**2a–b** and **3a**) were first screened for general toxicity in mice treated intraperitoneally with these compounds at a single dose of 200 $\mu\text{mol kg}^{-1}$. The animals were monitored for signs of general toxicity, including behavior and feeding, until 72 h post-treatment. This experiment showed that such compounds are neither lethal in mice nor cause tissue damage. The same dose was therefore used for in vivo antitumor evaluation. In the model using male Swiss mice bearing the solid S-180 sarcoma, compounds **2a**, **2b**, and

3a were administered intraperitoneally for seven consecutive days after 24 h of tumor transplant. Figure 5 shows that, in contrast to semicarbazide **2a**, which is almost inactive, its bioisostere thiosemicarbazide **2b** is a potent antitumor agent and is endowed with potency similar to that of Thl. The bioisosteric exchange of thiosemicarbazide **2b** with thiazolin-4-one **3a** decreased the antitumor activity, with **3a** being half as potent as **2b**.

From these in vivo results, some general conclusions can be drawn. The bioisosteric relationship between the semicarbazide **2a** and thiosemicarbazide **2b** suggests that the thiocarbonyl group of derivative **2b** plays an important role in this compound's antitumor properties. Moreover, the weak antitumor activity of compounds **2a** and **2c** could be due, in part, to their low calculated log *P* values^[26] (Table 1), as poor lipophilicity is often associated with problems in permeating the cell membrane. With regard to the antitumor mechanism of compound **2b**, it cannot be confirmed whether the anticancer activity is a result of direct modulation of the immune system. However, in view of prior knowledge that the processes of immunomodulation and antiangiogenesis are closely related and are both inhibited by Thl, it is reasonable to argue that modulation of cytokines or NO is, at the very least, involved to some extent in the tumor inhibition provided by these phthalimides.

In summary, a new set of phthalimides was designed in which bioisosterism and molecular hybridization were explored. We were able to identify phthalimide **2b** as the most potent anticancer and immunomodulatory agent of this series. Compound **2b** did not show cytotoxicity against splenocytes at a concentration of 20 μM , which was the dose used in the immunological assays. In other words, it is an immunomodulatory drug at concentrations that do not overtly affect mammalian cells. Despite the fact that **2b** is as effective as Thl, one drawback is that it proved to be roughly half as potent as 5-fluorouracil (5-FU) as an antitumor drug. This warrants further optimization studies with a view to improving the antitumor properties of this prototype.

Experimental Section

The Supporting Information details the synthesis of the compounds outlined in Scheme 1. Pharmacological and computational studies conducted can also be found in the Supporting Information. CCDC 757441 (**2b**) contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

Acknowledgements

This study received support from the Brazilian National Council of Research (CNPq; grant numbers 471834/2006-8, 479982/2008-2, and 473699/2008-7). L.C.D.C. and S.M.T.C. hold a FACEPE scholarship. The authors acknowledge the assistance of Diogo Moreira for stimulating and helpful discussions during the preparation of this manuscript.

Keywords: antitumor agents • hydrazones • immunomodulation • molecular hybridization • phthalimides

- [1] a) S. E. Street, E. Cretney, M. J. Smyth, *Blood* **2001**, *97*, 192–197; b) C. Hastie, J. R. Masters, S. E. Moss, S. Naaby-Hansen, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 12595–12603.
- [2] C. Ruegg, A. Yilmaz, G. Bieler, J. Bamat, P. Chaubert, F. J. Lejeune, *Nat. Med.* **1998**, *4*, 408–414.
- [3] a) V. Shankaran, H. Ikeda, A. T. Bruce, J. M. White, P. E. Swanson, L. J. Old, R. D. Schreiber, *Nature* **2001**, *410*, 1107–1111; b) T. Berg, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 687–688.
- [4] a) J. B. Marriott, G. W. Muller, D. Stirling, A. G. Dalgleish, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2001**, *1*, 675–682; b) Y. Hashimoto, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 461–479; c) S. K. Teo, *AAPS J.* **2005**, *7*, E14–E21; d) N. Vargesson, *Bioassays* **2009**, *31*, 1327–1336.
- [5] Y. Hashimoto, *Arch. Pharm.* **2008**, *341*, 536–547.
- [6] X. Meng, D. Han, S. Zhang, W. Guo, R. Cui, Z. Li, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1169–1174.
- [7] a) M. V. Almeida, F. M. Teixeira, M. V. N. Souza, G. W. Amarante, C. C. de S. Alves, S. H. Cardoso, A. M. Mattos, A. P. Ferreira, H. C. Teixeira, *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 223–236; b) S. G. Stewart, D. Spagnolo, M. E. Polomska, M. Sin, M. Karimi, L. J. Abraham, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5819–5824; c) H. W. Man, P. Schafer, L. M. Wong, R. T. Patterson, L. G. Corral, H. Raymon, K. Blease, J. Leisten, M. A. Shirley, Y. Tang, D. M. Babusis, R. Chen, D. Stirling, G. W. Muller, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1522–1524.
- [8] a) S. M. Capistoti, T. P. Hansen, M. L. Brown, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 327–336; b) T. Noguchi, H. Fujimoto, H. Sano, H. Miyajima, Y. Hashimoto, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5509–5513; c) H. Sano, T. Noguchi, A. Miyajima, Y. Hashimoto, H. Miyachi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3068–3072.
- [9] a) M. A. H. Zahrán, T. A. R. Salem, R. M. Samaka, S. R. Agwa, A. R. Awad, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9708–9718; b) S. H. L. Kok, R. Gambhari, C. H. Chui, M. C. W. Yuen, E. Lin, R. S. M. Wong, F. Y. Lau, G. Y. M. Cheng, W. S. Lam, S. H. Chan, K. H. Lam, C. H. Cheng, P. B. S. Lai, M. W. Y. Yu, F. Cheung, J. C. O. Tang, A. S. C. Chan, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3626–3631; c) S. H. Chan, K. H. Lam, C. H. Chui, R. Gambhari, M. C. W. Yuen, R. S. M. Wong, G. Y. M. Cheng, F. Y. L. Lau, Y. K. Au, C. H. Cheng, P. B. S. Lai, C. W. Kan, S. H. L. Lung-Kok, J. C. O. Tang, A. S. C. Chan, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2736–2740; d) S. M. Sondhi, R. Rani, P. Roy, S. K. Agrawal, A. K. Saxena, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1534–1538.
- [10] a) J. B. Bartlett, K. Dredge, A. C. Dalgleish, *Nature* **2004**, *427*–432, 314–322; b) L. M. Lima, P. Castro, A. L. Machado, C. A. M. Fraga, V. L. G. Moraes, E. J. Barreiro, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3067–3073; c) A. L. Machado, L. M. Lima, J. X. Araujo, Jr., C. A. M. Fraga, V. L. G. Koatz, E. J. Barreiro, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1169–1172; d) M. S. Alexandre-Moreira, C. M. Takiya, L. B. Arruda, B. Pascarelli, R. N. Gomes, H. C. F. Neto, L. M. Lima, E. J. Barreiro, *Int. Immunopharmacol.* **2005**, *5*, 485–494.
- [11] C. Shinji, S. Maeda, K. Imai, M. Yoshida, Y. Hashimoto, H. Miyachi, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7625–7651.
- [12] H. Beraldo, D. Gambino, *Mini. Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 31–39.
- [13] Y. Yu, D. S. Kalinowski, K. Kovacevic, A. R. Sifakas, P. J. Jansson, C. Stefani, C. B. Lovejoy, P. V. Bemhardt, D. R. Richardson, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5271–5294.
- [14] D. R. Richardson, P. C. Sharpe, D. B. Lovejoy, D. Senaratne, D. S. Kalinowski, M. Islam, P. V. Bernhardt, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6510–6521.
- [15] M. D. Hall, N. K. Salam, J. L. Hellawell, H. M. Fales, C. B. Kensler, J. A. Ludwig, G. Szakacs, D. E. Hibbs, M. M. Gottesman, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3191–3204.
- [16] L. M. Lima, E. J. Barreiro, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 23–59.
- [17] A. C. L. Leite, D. R. M. Moreira, M. V. O. Cardoso, M. Z. Hernandez, V. R. A. Pereira, R. O. Silva, A. C. Kiperstok, M. S. Lima, M. B. P. Soares, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1339–1345.
- [18] H. Zhou, S. Wu, S. Zhai, A. Liu, Y. Sun, R. Li, Y. Zhang, S. Ekins, P. W. Swaan, O. B. Fang, B. Zhang, B. Yan, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1242–1251.
- [19] V. L. M. Sena, R. M. Srivastava, C. A. Simone, S. M. Gonçalves, R. O. Silva, M. A. Pereira, *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 1224–1234.

CHEMMEDCHEM

- [20] P. Yogeeswari, D. Sriram, V. Saraswat, J. V. Ragavendran, M. M. Kumar, S. Murugesan, R. Thirummurugan, J. P. Stables, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, *20*, 341–346.
- [21] S. Bondock, W. Khalifa, A. A. Fadda, *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 948–954.
- [22] P. Vicini, A. Geronikaki, K. Anastasia, M. Incertia, F. Zani, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3859–3863.
- [23] H. J. C. Bezerra-Netto, D. I. Lacerda, A. L. P. Miranda, H. M. Alves, E. J. Barreiro, C. A. M. Fraga, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7924–7935.
- [24] a) X.-S. Ye, F. Sun, M. Liu, Q. Li, Y. Wang, G. Zhang, L.-H. Zhang, X.-L. Zhang, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3688–3691; b) L. Zhang, F. Sun, Q. Wang, J. Zhou, L.-H. Zhang, X.-L. Zhang, X.-S. Ye, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 756–760.
- [25] P. H. Schafer, A. K. Gandhi, M. A. Loveland, R. S. Chen, H. W. Man, P. P. M. Schnetkamp, G. Wolbring, S. Govinda, L. G. Corral, F. Payvandi, G. W. Muller, D. I. Stirling, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *305*, 1222–1232.
- [26] I. V. Tetko, V. Y. Tanchuk, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, *42*, 1136–1145.

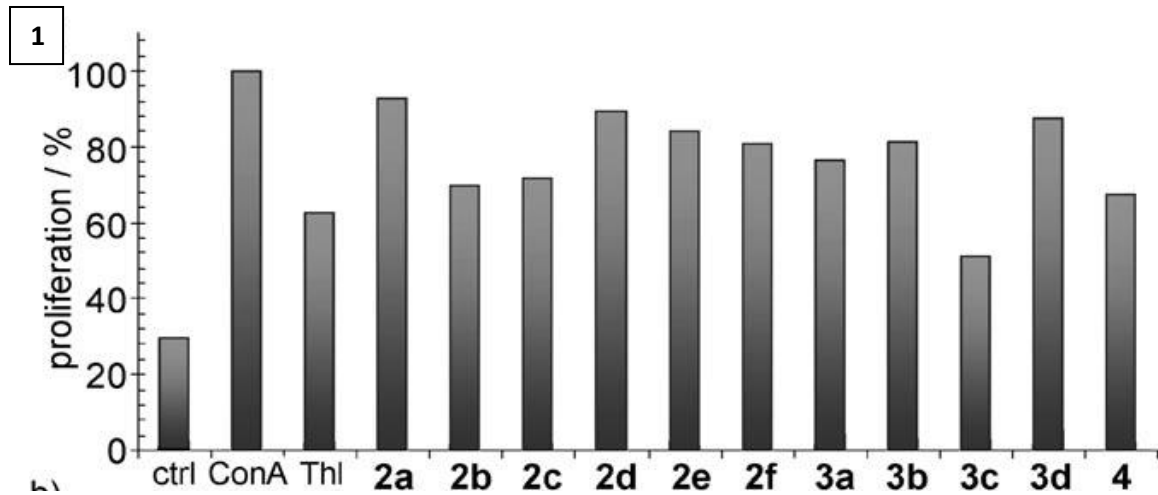
Received: December 19, 2009

Revised: January 14, 2010

Published online on January 28, 2010

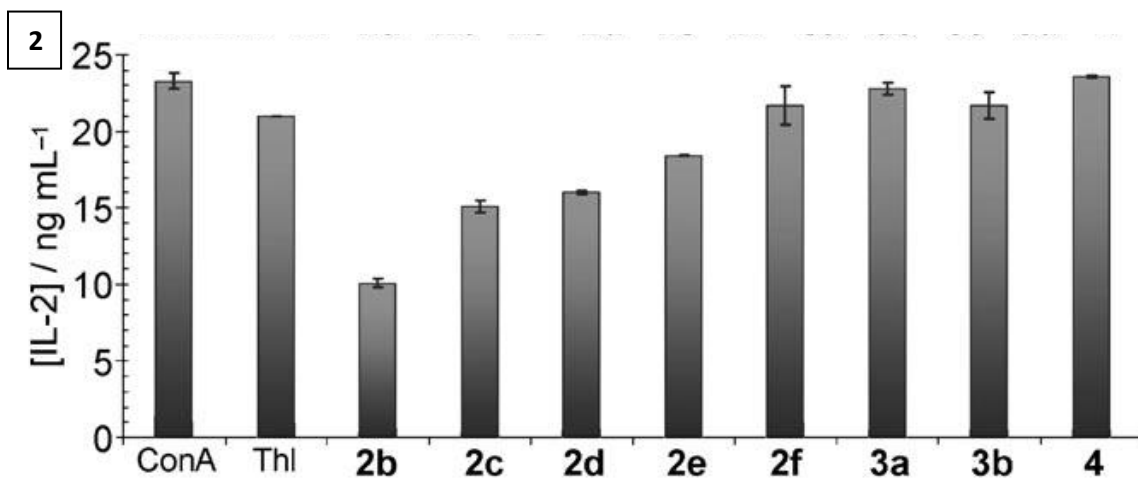
ANEXO B: Gráficos do artigo discutidos da tese.

Figura 1: Proliferação de esplenócitos isolados de camundongos Balb/c estimulados com concavalina A e tratados com a talidomida e análogos. *Alamar Blue*, 62h de incubação.



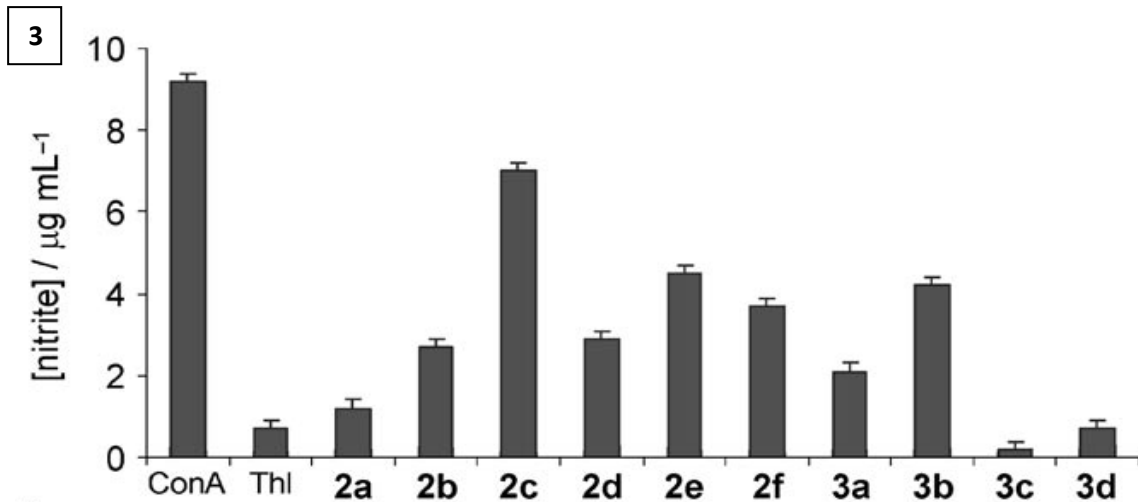
Fonte: Adaptado de PESSOA et al., 2010

Figura 2: Produção de interleucina 2 no sobrenadante de esplenócitos isolados de camundongos Balb/c estimulados com concavalina A e tratados com a talidomida e análogos. ELISA, 24h de incubação.



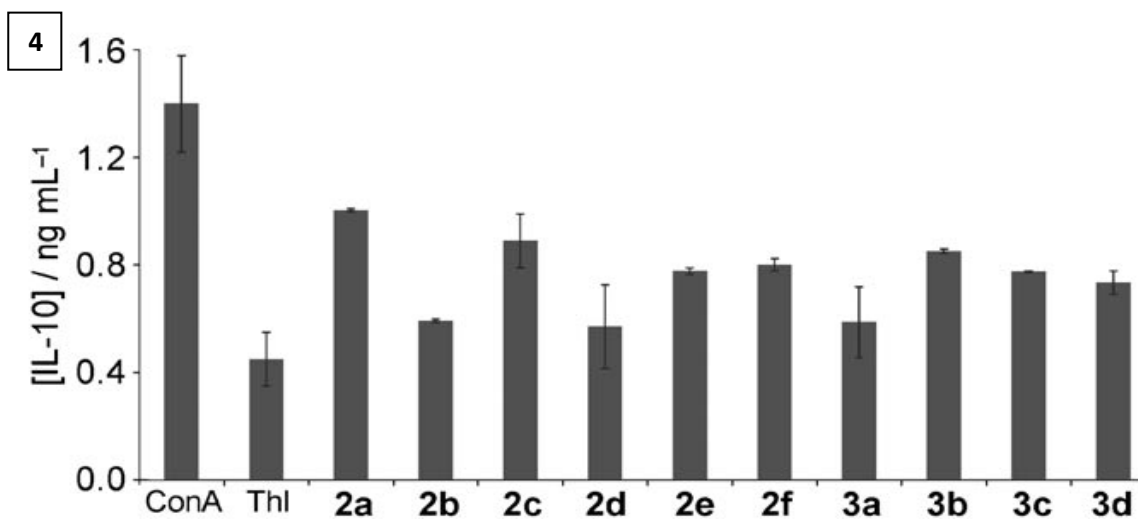
Fonte: Adaptado de PESSOA et al., 2010

Figura 3: Produção de óxido nítrico em esplenócitos isolados de camundongos Balb/c estimulados com concavalina A e tratados com a talidomida e análogos. Reagente de Griess, 72h de incubação.



Fonte: Adaptado de PESSOA et al., 2010

Figura 4: Produção de interleucina 10 no sobrenadante de esplenócitos isolados de camundongos Balb/c estimulados com concavalina A e tratados com a talidomida e análogos. ELISA, 72h de incubação.



Fonte: Adaptado de PESSOA et al., 2010