

ANDREA SENFF RIBEIRO

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA DE  
COMPOSTOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Benigna  
Martinelli de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

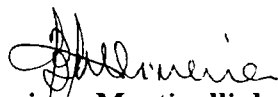
CURITIBA

2004

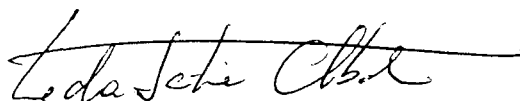
**ANDREA SENFF RIBEIRO**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA DE COMPOSTOS  
1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS**

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências –  
Bioquímica no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal  
do Paraná, pela comissão formada pelos professores:



**Profª Drª Maria Benigna Martinelli de Oliveira (Orientadora)**  
Departamento de Bioquímica de Biologia Molecular  
UFPR



**Profª Drª Leda Satie Chubatsu**  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular  
UFPR



**Profª Drª Emy Luiza Ishii Iwamoto**  
Departamento de Bioquímica  
UEM



**Profª Drª Yara Maria Correa Michelacci**  
UNIFESP



**Prof. Dr. Carlos Curti**  
USP

Curitiba, 18 de Fevereiro de 2004

Aos meus pais, Albano e Luiza

Ao meu amor, Odilon

Ao meu amigo e mentor científico,  
Silvio Sanches Veiga

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Odilon, pelo amor, apoio, paciência e compreensão. Por me fazer feliz.

Aos meus pais Albano e Luiza, pelo amor, apoio, dedicação, incentivo e por sempre acreditarem em mim.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Benigna Martinelli de Oliveira, pela confiança, estímulo, incentivo, exemplo e orientação científica.

Ao Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga, pela amizade, apoio, exemplo e orientação (científica e não-científica). Por todos os ensinamentos de como se fazer “ciência séria”.

Ao Prof. Dr. Waldemiro Gremski, pela oportunidade de fazer a iniciação científica em seu laboratório e dar início a minha ‘jornada’ científica.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Áurea Echevarria pela doação dos compostos que foram o objeto de estudo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Brentani pela doação das linhagens de melanoma utilizadas neste trabalho.

Ao Hospital do Câncer (A.C. Camargo – SP) pela doação do composto antineoplásico Muphoran® (fotemustina) utilizado neste trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Célia Regina C. Franco pela amizade e indispensável auxílio na realização e análise dos experimentos envolvendo morfologia e imunofluorescência.

Ao Prof. Dr. Phillip A. J. Gorin pela boa vontade, pela ajuda na correção dos manuscritos e pelas sugestões.

Ao Prof. Dr. Silvio Zanata pela amizade, pelo auxílio e apoio científicos.

Às professoras do Laboratório de Oxidações Biológicas, Dr.<sup>a</sup> Eva Carnieri e Dr.<sup>a</sup> Maria Eliane Merlin pelo auxílio e convívio agradáveis. Em especial, à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Cadena pelas proveitosas discussões sobre os compostos mesoiônicos e auxílio nos experimentos com mitocôndrias.

Ao grande amigo e cientista Rafael, pela ajuda, amizade, carinho e pelos conselhos científicos e não-científicos.

Às grandes amigas (componentes da elite do LMEC): Ana Isabel, Márcia, Olga e Ju Dreyfuss por todo apoio, carinho, amizade e proveitosas sugestões científicas. Às amigas Kátia e Luiza pelo carinho e ajuda experimental.

Às amigas Ju Ramos (Humberto e Duda) e Angela, pela amizade e pelo convívio (festivo e não-festivo) que tornaram a caminhada no mínimo mais divertida.

À amiga Silvia Prado pela amizade, conversas e momentos agradáveis.

À amiga Priscila I. dos Santos pela amizade, companheirismo e grande ajuda nos experimentos e na rotina do laboratório.

À amiga Andréia Capeline pelo carinho e orientação astrológica e esotérica.

Aos colegas, companheiros e amigos de Laboratório, Ana Paula, André, Mariana e Wellington pelo apoio e convívio sempre agradável. Em especial, à Guilhermina Noleto pela amizade e troca de experiências e protocolos.

Ao amigo Adriano, pela amizade, apoio, conversas, fofocas interessantes e pelos serviços de Sedex-10 prestados com tanta eficiência.

Aos colegas e amigos do Departamento: Alan, Luciano, Carol Galvão, Lilian, Roseane, Carol Mellinger, Guilherme e Stefan pelos momentos agradáveis.

Ao meu avô Bubi, à minha avó Áurea pelo amor e carinho. À minha irmã Rafaela pelo apoio e momentos agradáveis. Aos meus sogros, Diny e Vacila, pelo carinho e apoio. Ao Sérgio, pelo carinho e por suas visitas sempre agradáveis e cheias de festividades.

À Abigail e à Lola, pelo carinho e por serem criaturinhas maravilhosas.

Ao Biotério do Setor de Ciências Biológicas (UFPR), especificamente ao Sr. Cândido, a Sr.<sup>a</sup> Izele e funcionários, pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho. Em especial, ao funcionário Julio pelo auxílio no preparo dos animais e no acompanhamento dos experimentos *in vivo*.

À Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas (UFPR): Telma, Izabella, Ruth e Mariza, por sua colaboração.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica (UFPR), em especial aos professores Leda Satie Chubatsu, Emanuel M. Souza e Glaci T. Zancan, pelo proveitoso convívio científico. À Sr.<sup>a</sup> Marilza Doroti Lamour e à Srt.<sup>a</sup> Nanci P. C. de Albuquerque, pelo auxílio sempre prestado.

À CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

## SUMÁRIO

|   |              |
|---|--------------|
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>  | <b>XI</b>    |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>  | <b>XIV</b>   |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>  | <b>XV</b>    |
| <b>RESUMO.....</b>  | <b>XVII</b>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>  | <b>XVIII</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>1</b>     |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>  | <b>2</b>     |
| 2.1. COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS.....  | 2            |
| 2.2. COMPOSTOS MESOIÔNICOS.....   | 2            |
| 2.3. COMPOSTOS ESTUDADOS.....   | 8            |
| 2.3.1. Cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina.....     | 8            |
| 2.3.2. Cloreto de 4-fenil-5-[4-hidroxicinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina.....   | 11           |
| 2.3.3. Cloreto de 4-fenil-5-[2,4-difluorcinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina..... | 12           |
| 2.3.4. Cloreto de 4-fenil-5-[4-fluorcinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina.....     | 13           |
| 2.4. OS COMPOSTOS MESOIÔNICOS E SUA ATIVIDADE ANTITUMORAL...                          | 14           |
| 2.5. MELANOMA.....  | 15           |
| 2.5.1. TRATAMENTO DO MELANOMA.....  | 18           |
| 2.5.2. MODELOS DE ESTUDO DO MELANOMA.....   | 22           |
| <b>3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>  | <b>24</b>    |
| <b>4. ESTRATÉGIA GERAL.....</b>   | <b>26</b>    |



|   |           |
|---|-----------|
| <b>5. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                            | <b>27</b> |
| 5.1. MATERIAIS E REAGENTES.....                               | 27        |
| 5.2. MÉTODOS.....   | 28        |
| 5.2.1. Esterilização de Materiais.....                        | 28        |
| 5.2.2. Soluções Tampão e Meios de Cultura.....                | 28        |
| 5.2.2.1. Solução Salina Tamponada (PBS).....                  | 28        |
| 5.2.2.2. Solução Balanceada de Hanks (HBSS).....              | 29        |
| 5.2.2.3. Meios de Cultura.....                                | 29        |
| 5.2.2.4. Solução de Tripsina-EDTA.....                        | 30        |
| 5.2.2.5. Preparo das Soluções de Compostos Mesoiónicos.....   | 30        |
| 5.2.2.6. Preparo das Soluções de Agentes Antineoplásicos..... | 31        |
| 5.3. CÉLULAS.....   | 31        |
| 5.3.1. Procedimentos de Cultivo.....                          | 31        |
| 5.4. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR.....                      | 32        |
| 5.5. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....                     | 34        |
| 5.6. ANIMAIS.....   | 35        |
| 5.7. CRESCIMENTO TUMORAL <i>IN VIVO</i> .....                 | 35        |
| 5.8. ADESÃO CELULAR.....                                      | 36        |
| 5.8.1. Obtenção das Moléculas de Matriz Extracelular.....     | 36        |
| 5.8.2. Ensaio de Adesão Celular.....                          | 37        |
| 5.9. ENSAIO DE MIGRAÇÃO HAPTOTÁTICA.....                      | 38        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 5.10.     | ESTUDO MORFOLÓGICO E MORFOMÉTRICO.....   | 39        |
| 5.11.     | ESTUDO DA ORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO.....  | 40        |
| 5.12.     | ANÁLISE ESTATÍSTICA.....   | 41        |
| <b>6.</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>   | <b>42</b> |
| 6.1.      | EFEITOS DOS COMPOSTOS MESOIÔNICOS NA VIABILIDADE DAS<br>CÉLULAS B16-F10.....   | 42        |
| 6.2.      | EFEITOS DOS COMPOSTOS MESOIÔNICOS NA PROLIFERAÇÃO DAS<br>CÉLULAS B16-F10.....  | 47        |
| 6.3.      | EFEITOS DOS COMPOSTOS MESOIÔNICOS NO CRESCIMENTO DAS<br>CÉLULAS B16-F10 <i>IN VIVO</i> .....   | 51        |
| 6.4.      | EFEITO COMPARATIVO DO AGENTE ANTINEOPLÁSICO FOTEMUSTINA<br>E DO MI-D NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS B16-F10.....                                     | 58        |
| 6.5.      | EFEITO COMPARATIVO DO AGENTE ANTINEOPLÁSICO FOTEMUSTINA<br>E DO MI-D NA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS B16-F10.....                                    | 59        |
| 6.6.      | EFEITO COMPARATIVO DOS AGENTES ANTINEOPLÁSICOS<br>FOTEMUSTINA E DACARBAZINA E DO MI-D NO CRESCIMENTO DAS<br>CÉLULAS B16-F10 <i>IN VIVO</i> ..... | 59        |
| 6.7.      | EFEITOS DO MI-D NA VIABILIDADE DE CÉLULAS DE MELANOMA<br>HUMANO.....   | 66        |
| 6.8.      | EFEITOS DO MI-D NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE MELANOMA<br>HUMANO.....  | 71        |
| 6.9.      | EFEITOS DO MI-D NA ADESÃO DAS CÉLULAS MEL-85.....  | 75        |

|       |  |            |
|-------|--|------------|
| 6.10. | EFEITOS DO MI-D NA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS MEL-85.....                                  | 78         |
| 6.11. | EFEITOS DO MI-D NA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS MEL-85.....                                | 81         |
| 6.12. | EFEITOS DO MI-D NA ORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO DE ACTINA<br>DAS CÉLULAS MEL-85..... | 81         |
| 7.    | <b>DISCUSSÃO FINAL</b> .....   | <b>86</b>  |
| 8.    | <b>CONCLUSÕES</b> .....  | <b>92</b>  |
| 9.    | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | <b>93</b>  |
| 10.   | <b>ANEXO</b> .....   | <b>107</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| FIGURA 1-  | REPRESENTAÇÃO GENÉRICA DE UM COMPOSTO MESOIÔNICO   | 03 |
| FIGURA 2-  | REPRESENTAÇÃO E EXEMPLOS DOS COMPOSTOS MESOIÔNICOS DOS TIPOS A E B   | 05 |
| FIGURA 3-  | ESTRUTURAS REPRESENTATIVAS DE COMPOSTOS MESOIÔNICOS COM DESTACADA ATIVIDADE BIOLÓGICA                                | 07 |
| FIGURA 4-  | ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS CLORETO DE 4-FENIL - 5 - [ p - X - CINAMOIL ] - 1, 3, 4 - TIADIAZÓLIO - 2 FENILAMINA | 09 |
| FIGURA 5-  | ESTRUTURA DO CLORETO DE 4-FENIL-5-[4-NITROCINAMOIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINA (MI-D)                            | 11 |
| FIGURA 6-  | ESTRUTURA DO CLORETO DE 4-FENIL-5-[4-HIDROXICINAMOIL] - 1,3,4 - TIADIAZÓLIO - 2 - FENILAMINA (MI-J)                  | 11 |
| FIGURA 7-  | ESTRUTURA DO CLORETO DE 4-FENIL-5-[2,4-DIFLUORCINAMOIL] - 1,3,4 - TIADIAZÓLIO - 2 - FENILAMINA (MI-2,4DIF)           | 13 |
| FIGURA 8-  | ESTRUTURA DO CLORETO DE 4-FENIL-5-[4-FLUORCINAMOIL] - 1,3,4 - TIADIAZÓLIO - 2 - FENILAMINA (MI-4F)                   | 14 |
| FIGURA 9-  | ESTRUTURA QUÍMICA DA DACARBAZINA   | 21 |
| FIGURA 10- | ESTRUTURA QUÍMICA DA FOTEMUSTINA   | 22 |

- FIGURA 11- EFEITOS DOS COMPOSTOS MESOIÔNICOS SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10 44-46
- FIGURA 12- EFEITOS DOS COMPOSTOS MESOIÔNICOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10 49-50
- FIGURA 13- ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO* DO COMPOSTO MESOIÔNICO MI-D – CÉLULAS IMPLANTADAS INTRAPERITONEALMENTE 53
- FIGURA 14- ATIVIDADE DOS COMPOSTOS MESOIÔNICOS *IN VIVO*– MELANOMA SUBCUTÂNEO 54
- FIGURA 15- ESTRUTURAS DE RESSONÂNCIA DOS COMPOSTOS MESOIÔNICOS 1,3,4-TIADIAZÓIS ESTUDADOS: MI-D, MI-J, MI-2,4DIF E MI-4F 57
- FIGURA 16- EFEITO DO AGENTE ANTINEOPLÁSICO FOTEMUSTINA E DO COMPOSTO MESOIÔNICO MI-D SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10 60
- FIGURA 17- EFEITO DO AGENTE ANTINEOPLÁSICO FOTEMUSTINA E DO COMPOSTO MESOIÔNICO MI-D SOBRE A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10 61
- FIGURA 18- EFEITO *IN VIVO* DO COMPOSTO MESOIÔNICO MI-D COMPARADO AOS EFEITOS DOS AGENTES ANTINEOPLÁSICOS – FOTEMUSTINA E DACARBAZINA 63
- FIGURA 19- EFEITO DO COMPOSTO MESOIÔNICO MI-D EM TUMOR DESENVOLVIDO DE 8 DIAS 65

|            |   |       |
|------------|---|-------|
| FIGURA 20- | EFEITO DO MI-D SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO                             | 68-70 |
| FIGURA 21- | EFEITO DO MI-D SOBRE A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO                            | 73-74 |
| FIGURA 22- | EFEITO DO MI-D SOBRE A ADESÃO DAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO MEL-85                           | 79    |
| FIGURA 23- | EFEITO DO MI-D SOBRE A MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO MEL-85                         | 80    |
| FIGURA 24- | EFEITOS DO MI-D NA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO MEL-85                           | 83    |
| FIGURA 25- | DADOS DA ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO MEL-85 TRATADAS COM MI-D         | 84    |
| FIGURA 26- | EFEITOS DO MI-D NA ORGANIZAÇÃO DOS FILAMENTOS DE ACTINA DAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO MEL-85 | 85    |

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- AGENTES ANTINEOPLÁSICOS COM ATIVIDADE  
ANTIMELANOMA 20

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                  |   |
|------------------|---|
| BSA              | soro albumina bovina  |
| d.p.             | desvio padrão   |
| DMSO             | dimetilsulfóxido  |
| DMEM             | meio de Eagle modificado por Dulbecco                                     |
| EDTA             | ácido etilenodiaminotetracético   |
| EHS              | sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm  |
| e.p.m.           | erro padrão da média  |
| FCCP             | carbonilcianida <i>p</i> -trifluorometoxifenilhidrazona                   |
| FCR              | fase de crescimento radial  |
| FCV              | fase de crescimento vertical  |
| FITC             | isotiocianato de fluoresceína   |
| HBSS             | solução balanceada de Hanks   |
| IC <sub>50</sub> | concentração inibitória de 50%  |
| ID <sub>50</sub> | dose inibitória de 50%  |
| i.p.             | intra-peritoneal  |
| m                | média   |
| MEM              | meio essencial mínimo de Eagle  |
| MI-2,4-diF       | cloreto de 4-fenil-5-[2,4-difluorcinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina |
| MI-4F            | cloreto de 4-fenil-5-[4-fluorcinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina     |



|                      |  |
|----------------------|--|
| MI-D                 | cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina   |
| MI-J                 | cloreto de 4-fenil-5-[4-hidroxicinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina |
| MTT                  | brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio           |
| PBS                  | solução salina-fosfato tamponada                                       |
| RMN- <sup>13</sup> C | espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13          |
| RMN- <sup>1</sup> H  | espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton              |
| RPMI                 | Rosewell Park Memorial Institute                                       |
| S-180                | sarcoma 180  |
| SDS                  | dodecil sulfato de sódio   |
| SFB                  | soro fetal bovino  |
| UV                   | radiação ultravioleta  |

## RESUMO

As características estruturais dos compostos mesoiônicos, os quais possuem regiões de carga positiva e negativa distintas associadas a um sistema poliheteroatômico, possibilitam que estes compostos atravessem membranas e interajam com biomoléculas. Diversas aplicações biológicas já foram descritas para os compostos mesoiônicos. Uma série de cloretos de 4-fenil-5-[2'-Y, 4'-X ou 4'-X-cinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina foi avaliada em células de melanoma murino B16-F10 *in vitro* e em tumores resultantes da implantação subcutânea das células B16-F10 em camundongos C57BL/6. Os compostos diferem apenas no substituinte do anel cinamoil (MI-J, X = OH; MI-2,4diF, X = Y = F; MI-4F, X = F e MI-D, X = NO<sub>2</sub>). A exposição das células B16-F10 aos compostos MI-D, MI-2,4diF and MI-4F, todos na mesma concentração micromolar (50 μmol.L<sup>-1</sup>) diminuiu a viabilidade celular para 8%, 50% e 22%, respectivamente, enquanto o MI-J não apresentou nenhum efeito significativo nas mesmas condições. Contudo, baixas doses de MI-D, como 10 μmol.L<sup>-1</sup>, foram suficientes para impedir o crescimento celular por 72 h, mas para o MI-2,4diF e o MI-4F o efeito na proliferação das células B16-F10 foi observado apenas na concentração de 25 μmol.L<sup>-1</sup>. Apesar de o MI-4F ter apresentado um efeito ligeiramente melhor que o MI-2,4diF *in vitro*, seus efeitos no crescimento tumoral *in vivo* não foram significativos. O MI-D inibiu o crescimento tumoral em 77%. A maior efetividade do MI-D comparado aos compostos MI-2,4diF, MI-4F and MI-J contra as células de melanoma B16-F10 é provavelmente devido ao seu grupo atrator de elétrons (NO<sub>2</sub>), que intensifica a carga positiva do anel mesoiônico e permite uma extensiva conjugação da cadeia lateral com a porção exocíclica. Isto parece ser importante para a atividade antitumoral destes compostos contra o melanoma. O MI-D foi comparado com os antineoplásicos fotemustina e dacarbazina, cujos efeitos em melanoma são reconhecidos. O MI-D mostrou-se mais citotóxico para as células B16-F10 que a fotemustina nas mesmas condições experimentais *in vitro*. A atividade antitumoral *in vivo* das drogas foi avaliada em camundongos C57BL/6 portadores de melanoma subcutâneo (B16-F10). Os animais foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) com MI-D, fotemustina ou dacarbazina utilizando uma única dose de 57 μmol.kg<sup>-1</sup>, 24 h após a inoculação das células. No 17º dia, os tumores foram extraídos e seus pesos determinados. O MI-D inibiu o crescimento tumoral em 85%. O crescimento das células B16-F10 *in vivo* respondeu à fotemustina, e uma inibição do crescimento tumoral de ~50% foi observada. Para a dacarbazina, 57 μmol.kg<sup>-1</sup> causou uma reproduzível tendência à inibição tumoral de 27%. O MI-D também foi eficiente em inibir em 64% o crescimento de um tumor já desenvolvido de 8 dias. Os efeitos do composto MI-D foram avaliados em diferentes linhagens de melanoma humano. O MI-D diminuiu *in vitro* a viabilidade e a proliferação das células MEL-85, SK-MEL, A2058 e MEWO, mostrando uma elevada atividade citotóxica. A adesão das células MEL-85 a diferentes componentes da matriz extracelular foi avaliada em presença do MI-D. O composto reduziu a adesão à laminina, fibronectina e matrigel. A morfologia e a organização dos filamentos de actina do citoesqueleto foram alteradas pelo tratamento com MI-D. Estes resultados nas células de melanoma humano apontam o MI-D como uma droga bastante promissora contra o melanoma, que é extremamente resistente à quimioterapia. Este é um estudo encorajador no que diz respeito à possibilidade do MI-D se tornar uma nova ferramenta para o estudo e o tratamento do melanoma.

## ABSTRACT

The structural characteristics of mesoionic compounds, which contain distinct regions of positive and negative charges associated with a poly-heteroatomic system, enable them to cross cellular membranes and interact strongly with biomolecules. Potential biological applications have been described for mesoionic compounds. A series of 4-phenyl-5-(2'-Y, 4'-X or 4'-X-cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides were evaluated against B16-F10 murine melanoma cells *in vitro* and against tumours resulting from implanted B16-F10 cells in C57BL/6 mice. The compounds differ from each other only at the cinnamoyl ring substituent (MI-J, X = OH; MI-2,4diF, X = Y = F; MI-4F, X = F and MI-D, X = NO<sub>2</sub>). Exposure of B16-F10 cells to MI-D, MI-2,4diF and MI-4F, at same micromolar concentration (50 μmol.L<sup>-1</sup>) decreased the cell viability to 8%, 50% and 22%, respectively, while MI-J did not show any significant effect at the same conditions. However, a low dose as 10 μmol.L<sup>-1</sup> MI-D was enough to impair the cell growth over 72 h, but for MI-2,4diF and MI-4F the effect on B16-F10 proliferation was observed only using 25 μmol.L<sup>-1</sup> of compounds. Besides MI-4F had a slightly better effect than MI-2,4diF *in vitro*, its effects on tumor growth, was not significant. MI-D inhibited tumor growth by 77%. The MI-D effectiveness over MI-2,4diF, MI-4F and MI-J against B16-F10 melanoma cells is probably due to its stronger electron-withdrawing group (NO<sub>2</sub>), which increases the positive charge on the mesoionic ring and allow an extensive conjugation of the side chain with the exocyclic moiety. This seems important for the antitumour activity against melanoma of these compounds. MI-D was compared to the antineoplastics fotemustine and dacarbazine, whose effects on melanoma cells are recognized. MI-D was more cytotoxic to B16-F10 cells than fotemustine at the same *in vitro* experimental conditions. The *in vivo* antitumor activity of the drugs was evaluated using a B16-F10 melanoma tumor growing subcutaneously on C57BL/6 mice. Animals were intraperitoneally (i.p.) treated with MI-D, fotemustine or dacarbazine using a single dose of 57 μmol.kg<sup>-1</sup>, 24 h after cell inoculation. On the 17<sup>th</sup> day, tumors were excised and their weights were determined. MI-D inhibited tumor growth by 85%. The *in vivo* growth of of B16-F10 melanoma responded to fotemustine, and tumor growth inhibition of ~50% was observed. For dacarbazine, 57 μmol.kg<sup>-1</sup> caused a reproducible tendency towards inhibition of tumor growth of 27%. MI-D was also efficient in inhibiting by 64% the growth of an already developed tumor of eight days. The effects of mesoionic compound MI-D were evaluated upon different human melanoma cell lines. The drug decreased the viability and proliferation of MEL-85, SK-MEL, A2058 and MEWO cell lines *in vitro*, showing a great cytotoxic activity on these human cells. Adhesion of Mel-85 cells was evaluated in presence of the drug using different extracellular matrix (ECM) constituents. MI-D decreased MEL-85 adhesion to laminin, fibronectin and matrigel. The morphology and actin cytoskeleton organization of MEL-85 cells were also altered by MI-D treatment. These results on human melanoma cell lines point the mesoionic compound MI-D as a very promising drug against melanoma, which is an extremely resistant tumour to chemotherapy. This is a very encouraging study in regard to the possibility of MI-D becoming a new tool for melanoma research and treatment.

## 1. INTRODUÇÃO

Os compostos mesoiônicos são compostos heterocíclicos que apresentam regiões de carga positiva e negativa associadas a um sistema aromático poliheteroatômico, o que favorece a interação destes compostos com biomoléculas, possibilitando uma farmacodinâmica mais específica da droga. Estas características estruturais conferem ausência de uma carga líquida na molécula, o que facilita a passagem dos compostos através de membranas biológicas. Fármacos com estas características apresentam melhor perfil de biodisponibilidade, que pode refletir em melhor perfil farmacológico (melhor farmacocinética).

Os compostos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazóis têm sido estudados pelo Laboratório de Oxidações Biológicas e de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR com resultados bastante promissores, o que motivou a pesquisa da atividade biológica antineoplásica destes compostos. O presente trabalho descreve o estudo do efeito antimelanoma de quatro compostos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazóis que diferem estruturalmente entre si apenas no substituinte do anel cinamoil. A utilização de compostos estruturalmente semelhantes no estudo possibilitou uma análise da relação entre a estrutura e a atividade antitumoral destas drogas. O modelo tumoral utilizado foi o de melanoma. Esta neoplasia, cuja incidência nas últimas décadas vem aumentando drasticamente em vários países, possui uma das piores taxas de resposta à quimioterapia. Por exemplo, drogas de primeira escolha para o tratamento do melanoma, como a dacarbazina e a fotemustina, apresentam taxas de resposta na ordem de 20%. Este estudo teve como motivação a tentativa de buscar uma droga capaz de contribuir para o desenvolvimento de um tratamento eficaz para o melanoma que, em sua forma disseminada, não tem cura e apresenta péssimo prognóstico.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Compostos Heterocíclicos**

A atividade biológica de inúmeros compostos está relacionada à presença de grupos heterocíclicos em sua estrutura. Via de regra, compostos heterocíclicos possuem propriedades químicas caracterizadas por grande reatividade. As mais importantes reações nos seres vivos, como a provisão de energia, transmissão de impulsos nervosos, visão, metabolismo e transferência de informação hereditária ocorrem com a participação de grupos heterocíclicos (POZHARSKÜ et al., 1997).

Compostos heterocíclicos naturais apresentam várias aplicações como medicamentos, conferindo efeitos benéficos como também efeitos colaterais indesejáveis. Para resolver os problemas relacionados à toxicidade e com a finalidade de se buscar substâncias de aplicação farmacológica, surgiram os compostos similares sintetizados em laboratório, que apresentam a vantagem de possibilitar a realização de substituições estruturais até que os compostos com efeitos desejados sejam alcançados (POZHARSKÜ et al., 1997). Com este objetivo, muitos compostos heterocíclicos têm sido sintetizados em laboratório. Dentre estes, surgiram os chamados compostos mesoiônicos.

### **2.2. Compostos Mesoiônicos**

O termo mesoiônico foi sugerido pela primeira vez por SIMPSON (1946), para descrever moléculas cuja representação por estrutura covalente ou polar não é possível. Em 1955, BACKER e OLLIS, definiram como mesoiônicos, os compostos que apresentassem, em sua estrutura, um anel com as seguintes características:

- a) todos os átomos compartilhando um sexteto de elétrons  $\pi$  apresentando considerável energia de ressonância;

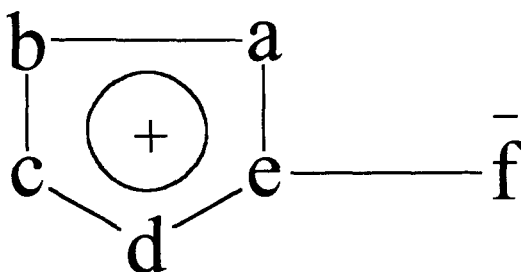
b) caráter aromático, heterocíclico, formado por cinco ou seis elementos, incapaz de ser representado por estrutura covalente;

c) carga positiva no anel heterocíclico, balanceada por uma carga negativa em átomo ou grupo exocíclico;

d) estrutura planar, ou próxima a isto.

Na década de 70, este conceito foi modificado pela recomendação de que o termo mesoiônico fosse restrito a anéis heterocíclicos de cinco membros. Assim, OLLIS e RAMSDEN (1976) propuseram a definição atual: *“um composto pode ser apropriadamente classificado como mesoiônico quando for constituído por um anel heterocíclico de 5 membros, o qual não pode ser representado satisfatoriamente por uma estrutura covalente ou polar, e que possua um sexteto de elétrons  $\pi$  associados aos 5 átomos que formam o anel”*.

Os compostos mesoiônicos podem genericamente ser representados pela estrutura demonstrada na Figura 1, onde os átomos constituintes indicados pelas letras a-f podem ser: carbono, nitrogênio, oxigênio e enxofre, com seus respectivos substituintes específicos para cada tipo de composto (OLLIS e RAMSDEN, 1976; NEWTON e RAMSDEN, 1982).



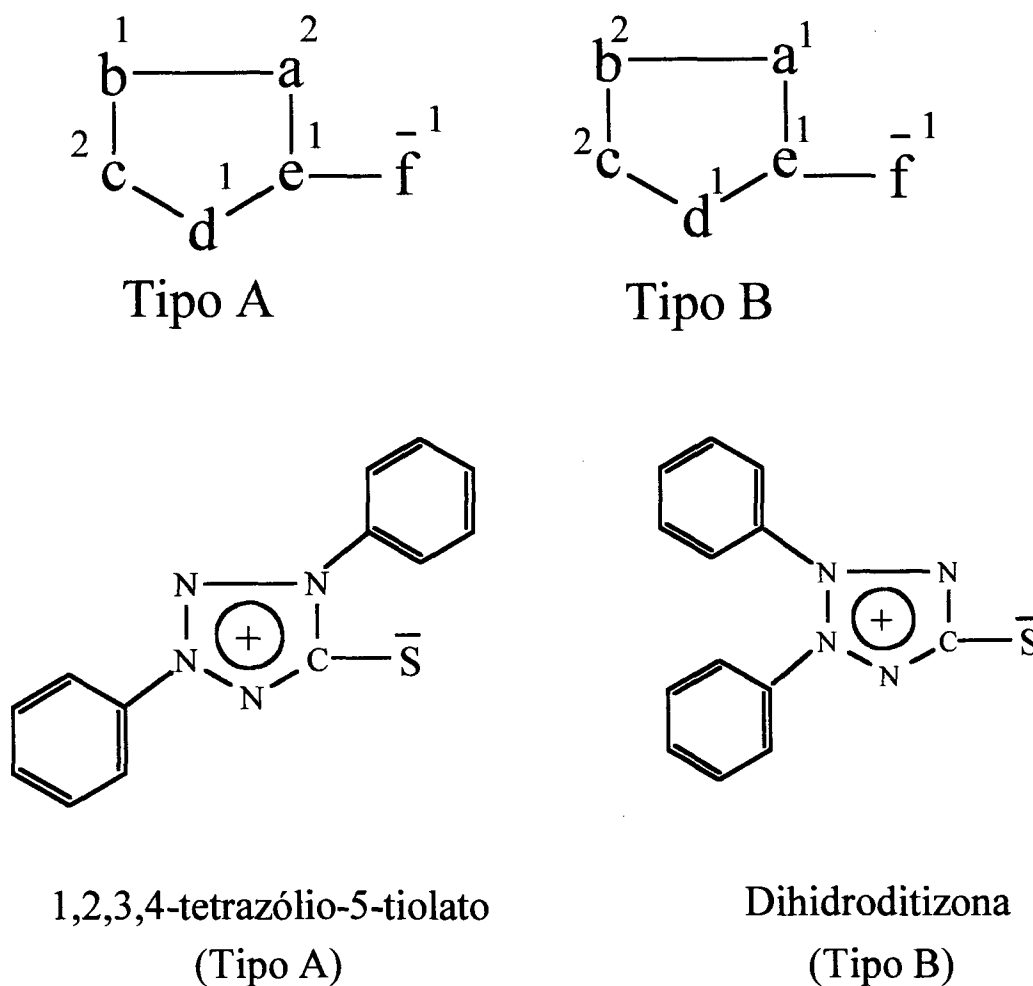
**FIGURA 1. Representação Genérica de um Composto Mesoiônico. FONTE: OLLIS e RAMSDEN, 1976; NEWTON e RAMSDEN, 1982.**

Análises dos possíveis sistemas mesoiônicos permitiram sua classificação em dois tipos (A e B), de acordo com a origem dos 8 elétrons  $\pi$  distribuídos entre o anel heterocíclico (carga positiva) e o átomo ou grupamento exocíclico (carga negativa). Na Figura 2 estão demonstradas as fórmulas genéricas e exemplos dos compostos mesoiônicos dos tipos A e B, onde os números sobrescritos indicam a origem dos 8 elétrons  $\pi$ . A partir da observação destes exemplos, ressalta-se que a classificação dos compostos mesoiônicos como do tipo A ou B depende da natureza dos substituintes do anel heterocíclico, e não apenas dos átomos que constituem o anel, pois destes fatores depende a origem dos elétrons  $\pi$  que formam o sexteto ressonante (OLLIS e RAMSDEN, 1976; NEWTON e RAMSDEN, 1982).

Como pode ser verificado nas estruturas mostradas na Figura 2, os compostos mesoiônicos possuem regiões de carga positiva e negativa, associadas a um sistema aromático poliheteroatômico. Tais características favorecem a interação destes compostos com biomoléculas, além do que a ausência de uma carga líquida na molécula, facilita a sua passagem através de membranas biológicas (KIER e ROCHE, 1967; NEWTON e RAMSDEN, 1982; CHEUNG et al., 1996). Além disso, a presença de determinados substituintes no anel está também relacionada com as possíveis atividades biológicas destes compostos (GLENNON et al., 1981; BADACHIKAR et al., 1986; CORELL et al., 1994; GRYNBERG et al., 1997).

A atividade biológica de alguns compostos mesoiônicos dos tipos A e B é comprovada por vasta literatura, sendo muitos destes compostos patenteados e, dentre eles, alguns comercialmente utilizados como medicamentos (OLLIS e RAMSDEN, 1976; NEWTON e RAMSDEN, 1982). No entanto, com relação à composição do anel mesoiônico, os que apresentam atividade biológica relevante

podem ser agrupados em quatro classes principais: as sidnonas (1,2,3-oxadiazólio-5-olatos), as sidnoniminas (1,2,3-oxadiazólio-5-aminidas), os oxatriazóis e os 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos, cujas estruturas estão representadas na Figura 3 (KIER e ROCHE, 1967).



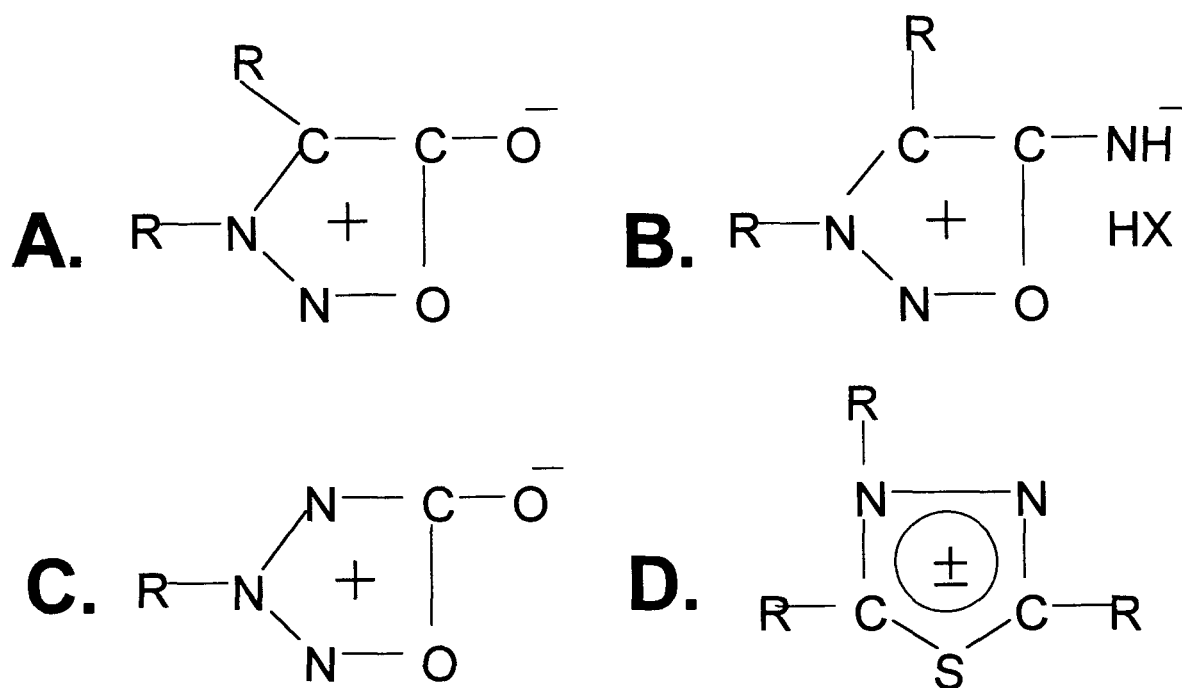
**FIGURA 2. Representação e Exemplos dos Compostos Meso-iônicos dos Tipos A e B.** Os números sobrescritos ao lado das letras representam o número de elétrons  $\pi$ , de cada átomo, que contribui para formar o sexteto ressonante. O 1,2,3,4-tetrazólio-5-tiolato é um exemplo de composto mesoiônico do tipo A e seu isômero dihidroditizona, do tipo B. FONTE: OLLIS e RAMSDEN, 1976; NEWTON e RAMSDEN, 1982.



As sidnonas (Figura 3A) foram os primeiros compostos mesoiônicos sintetizados (EARL e MACKNEY, 1935), e portanto, os mais estudados. Diversas atividades biológicas foram descritas para as sidnonas, entre elas: atividade antimicrobiana (COBURN e CARAPELLOTTI, 1976; MOUSTAFA e EISA, 1991), atividade anti-malária contra *Plasmodium berghei* (NYBERG e CHEN, 1965), atividade anti-inflamatória e analgésica (SATYANARAYANA e RAO, 1995), atividade como estimulantes do sistema nervoso central (KIER et al., 1962), atividade antitumoral contra carcinoma 755 em ratos (GRECO et al., 1962) e contra as células tumorais de carcinoma de Ehrlich, Sarcoma-180, de histiocitoma fibroso B10MCII e L1210 (GRYNBERG et al., 1992; DUNKLEY e THOMAN, 2003).

As sidnoniminas (Figura 3B) são compostos muito parecidos com as sidnonas, porém menos estáveis (EADE e EARL, 1946). Foi demonstrado que as sidnoniminas possuem efeito sobre o sistema cardiovascular (MAJID et al., 1980; REHSE et al., 1993 a, b). Estes compostos exibiram efeitos antitrombóticos e vasodilatadores *in vivo*, relacionados com sua capacidade de liberação de óxido nítrico, e também potentes efeitos antiplaquetários e vasoativos (REHSE et al., 1993 a, b).

Os oxatriazóis mesoiônicos (Figura 3C) têm apresentado muitas aplicações biológicas para diversos derivados. Os efeitos mais importantes desta classe de compostos mesoiônicos estão relacionados à sua capacidade intrínseca de liberar óxido nítrico (KAURUP et al., 1994; KANKAANRANTA et al., 1996). Estudos mostraram atividade antitrombótica, de inibição da agregação plaquetária, fibrinolítica, trombolítica e broncolítica (REHSE e MARTENS, 1993; REHSE e KONIG, 1995; COREL et al., 1994; KANKAANRANTA et al., 1996), e atividade antitumoral contra células hematopoiéticas malignas (VILPO et al., 1997).



**FIGURA 3. Estruturas Representativas de Compostos Meso-iônicos com Destacada Atividade Biológica. (A) sidnonas (1,2,3-oxadiazólio-5-olato). (B) sidnoniminas (1,2,3-oxadiazólio-5-aminida). (C) oxatriazóis (1,2,3,4 oxatriazólio-5-olato). (D) 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos (1,3,4-tiadiazólio-2-tiolato). FONTE: KIER e ROCHE, 1967.**

Importantes atividades biológicas têm sido demonstradas para os compostos 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos (Figura 3D). Pode-se citar: a) atividade antibacteriana *in vitro* para *Staphylococcus aureus*, *Diplococcus pneumoniae* e *Escherichia coli* (STEWART e KIER, 1965); b) inibição da enzima adenosina 3',5'-monofosfato fosfodiesterase, devido a sua similaridade estrutural com as xantinas naturais, conhecidos inibidores da fosfodiesterase (GLENNON et al., 1981); c) atividade *in vitro* antifúngica e antibacteriana para *E. coli*, *Streptococcus faecalis*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseus*, e os fungos *Candida albicans*, *Cryptococcus*

*neoformans*, *Rhodotorula* sp., *Penicillium* sp., *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporothrix schenckii* (LIMA et al., 1986); d) atividade contra *Saccharomyces cerevisiae* e atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (MONTANARI et al., 1992; MONTANARI et al., 1997); e) atividade antitumoral (GRYNBERG et al., 1997); f) atividade contra as formas promastigotas e amastigotas da *Leishmania amazonensis* (DA SILVA et al., 2002); entre outras.

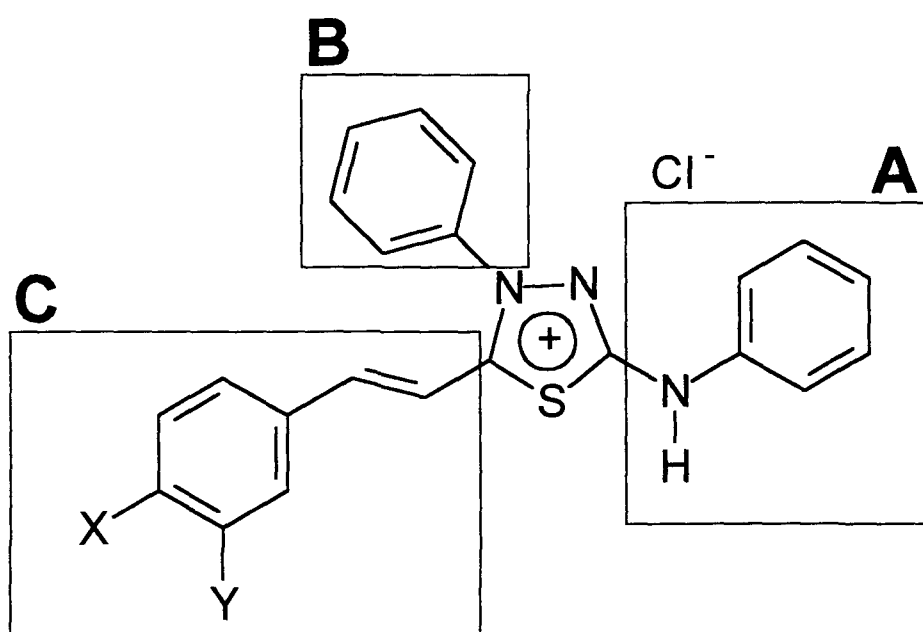
### **2.3. Compostos 1,3,4-Tiadiazóis Mesoiónicos Estudados nesta Tese**

Os compostos 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos utilizados neste trabalho constituem uma série de derivados em que a única diferença estrutural é o grupo substituinte do anel cinamoil (Figura 4). Os quatro compostos são: cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D), cloreto de 4-fenil-5-[4-hidroxicinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-J), cloreto de 4-fenil-5-[2,4-difluorcinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-2,4diF) e cloreto de 4-fenil-5-[4-fluorcinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-4F) (Figuras 5 a 8).

#### **2.3.1. Cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina**

O cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D) (Figura 5) teve sua estrutura determinada por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e espectroscopia de massa (GRYNBERG et al., 1997). O MI-D possui atividade desacopladora em mitocôndrias (CADENA et al., 1998). O composto é capaz de: a) diminuir o coeficiente de controle respiratório e a taxa ADP/O; b) causar colapso do potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) dependente da sua concentração; c) aumentar a atividade de ATPase em mitocôndrias intactas, mas inibir esta atividade na mitocôndria

desacoplada por carbonilcianida *p*-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP). Estes efeitos nas funções mitocondriais parecem estar relacionados com as alterações provocadas pelo MI-D na permeabilidade e fluidez de membranas (CADENA et al., 2002). O composto MI-D apresentou atividade contra as formas promastigotas e amastigotas da *Leishmania amazonensis* com IC<sub>50</sub> de 1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e 52,92  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente (DA SILVA et al., 2002).



**FIGURA 4. Estrutura Química dos Derivados Cloreto de 4-fenil-5-[*p*-X-cinamoyl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina.** O anel central (sem destaque) representa, de acordo com a nomenclatura adotada o grupo "tiadiazólio". (A) Substituinte do C2, radical fenil amina. (B) Substituinte do N4, radical fenil. (C) Substituinte do C5, radical cinamoyl. FONTE: KIER e ROCHE, 1967.

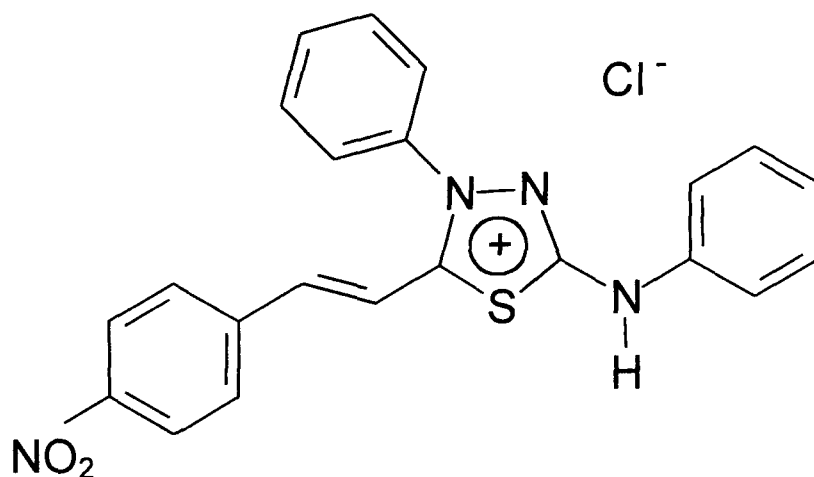
GRYNBERG et al. (1997) avaliando a atividade antitumoral do MI-D, verificaram aumento da sobrevivência de animais portadores de tumores intraperitoneais. Os modelos estudados foram de Sarcoma 180 (S180) e de Carcinoma de Ehrlich, e o

tratamento consistiu em aplicações intraperitoneais de MI-D nos camundongos, em protocolos de duas doses. Em S180 foi utilizado um protocolo de tratamento consistindo de administração de MI-D nos dias 1 e 6 após a inoculação das células tumorais, sendo este protocolo realizado com as doses de 10 e 30 mg.kg<sup>-1</sup>. Os autores demonstraram significativo aumento da sobrevida dos animais portadores de tumor. No modelo de carcinoma de Ehrlich, o tratamento consistiu de duas doses de 25 mg.kg<sup>-1</sup> de MI-D nos dias 1 e 5 após a inoculação das células tumorais. Este protocolo também foi capaz de aumentar a sobrevida dos animais, e ainda, os parâmetros hematológicos dos animais não portadores de tumor não foram alterados quando os animais foram tratados com 15 mg.kg<sup>-1</sup> de MI-D. Em células HeLa, o composto mesoiônico MI-D atua como um agente indutor de apoptose (CADENA, 1999), um efeito provavelmente relacionado com aqueles exercidos sobre as funções mitocondriais como descrito por CADENA et al. (1998). Recentemente, CARDOSO (2000) demonstrou em ratos que o composto MI-D possui ação analgésica, antipirética e anti-inflamatória *in vivo*, nas doses de 0,8 mg.kg<sup>-1</sup>, 1 mg.kg<sup>-1</sup> e 8 mg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

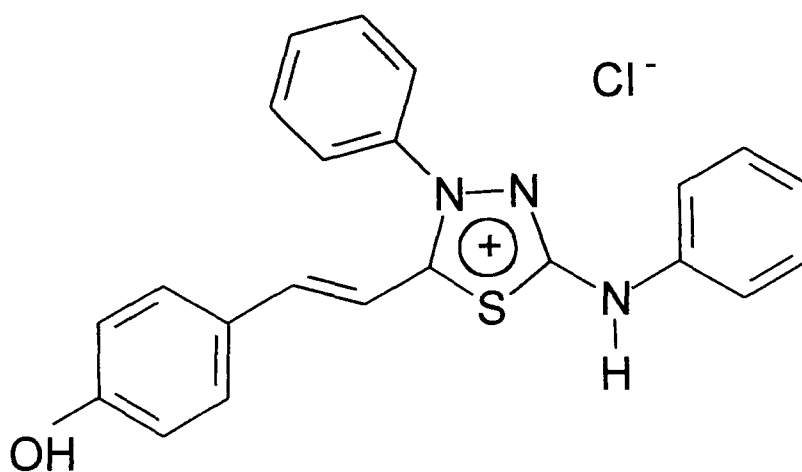
### **2.3.2. Cloreto de 4-fenil-5-[4-hidroxicinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina**

O cloreto de 4-fenil-5-[4-hidroxicinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-J) é derivado 1,3,4- tiadiazólio precursor do composto mesoiônico 4-fenil-5-[4-hidroxicinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida (Figura 6). Sua estrutura foi determinada por RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e espectroscopia de massa (GRYNBERG et al., 1997). O MI-J difere do composto mesoiônico MI-D pela substituição do grupamento nitro (-NO<sub>2</sub>) por uma hidroxila (-OH) no anel cinamoil. GRYNBERG et al. (1997) avaliaram a atividade antitumoral do MI-J e, assim como para o MI-D, verificaram

aumento da sobrevivência dos animais portadores de Sarcoma 180 (S180) e de Carcinoma de Ehrlich intraperitoneais.



**FIGURA 5. Estrutura Química do Cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinnamoi]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D). FONTE: GRYNBERG et al., 1997.**

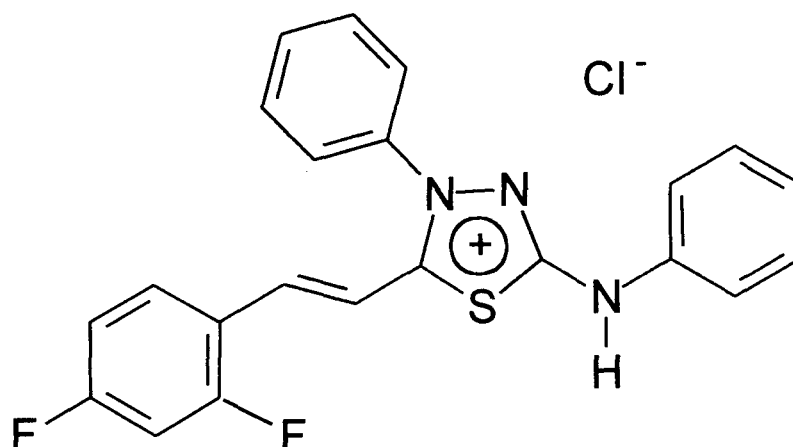


**FIGURA 6. Estrutura Química do Cloreto de 4-fenil-5-[4-hidroxicinnamoi]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-J) FONTE: GRYNBERG et al., 1997.**

O tratamento para os animais portadores de S-180 utilizava administração intraperitoneal de MI-J em duas ou três doses. No protocolo consistindo de duas aplicações, nos dias 1 e 5 após a inoculação das células, a dose de  $30 \text{ mg.kg}^{-1}$  foi utilizada, já no protocolo consistindo de três aplicações, nos dias 1, 2 e 6, foram utilizadas as doses de 30, 46 e  $60 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Ambos os protocolos foram eficientes em aumentar a sobrevida dos animais. No modelo de carcinoma de Ehrlich o tratamento consistiu de duas doses de  $25 \text{ mg.kg}^{-1}$  de MI-J, nos dias 1 e 5 após a inoculação das células tumorais. Este protocolo de tratamento com o composto MI-J aumentou a sobrevida dos animais portadores de tumor. Os parâmetros hematológicos de animais não portadores de tumor não foram alterados quando administrados  $15 \text{ mg.kg}^{-1}$  de MI-J. O composto MI-J mostrou atividade contra as formas promastigotas e amastigotas da *Leishmania amazonensis* com  $\text{IC}_{50}$  de  $7,58 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $113,21 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente (DA SILVA et al., 2002). Nenhum outro estudo foi desenvolvido com este composto, não sendo, portanto, conhecido se a troca do grupo  $\text{NO}_2$  por OH altera as características do composto quanto aos efeitos biológicos a ele relacionados.

### **2.3.3. Cloreto de 4-fenil-5-[2,4-difluorcinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina**

O cloreto de 4-fenil-5-[2,4-difluorcinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-2,4diF) é derivado 1,3,4-tiadiazólio precursor do composto mesoiônico 4-fenil-5-[2,4-difluorcinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida (Figura 7). Sua estrutura foi determinada por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e espectroscopia de massas (DOS SANTOS e ECHEVARRIA, 2001). O MI-2,4diF difere do composto mesoiônico MI-D pela substituição do grupamento nitro ( $-\text{NO}_2$ ) por um átomo de flúor ( $-\text{F}$ ) e a adição de um segundo átomo de flúor na posição 2.

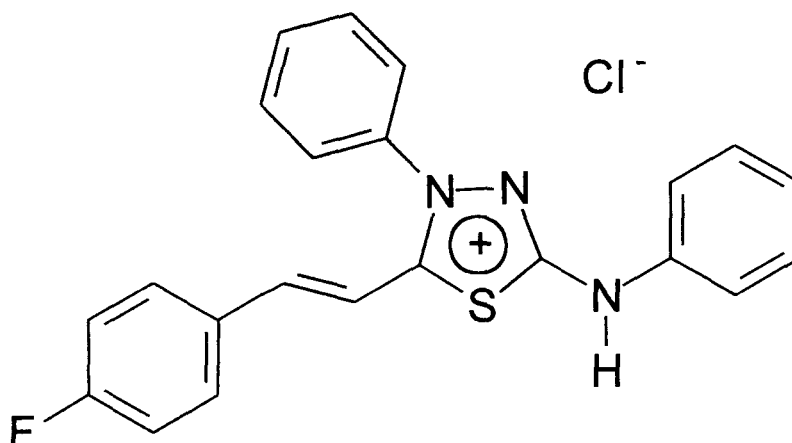


**FIGURA 7. Estrutura Química do Cloreto de 4-fenil-5-[2,4-difluorcinnamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-2,4diF) FONTE: DOS SANTOS e ECHEVARRIA, 2001.**

#### **2.3.4. Cloreto de 4-fenil-5-[4-fluorcinnamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina**

O cloreto de 4-fenil-5-[4-fluorcinnamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-4F) é derivado 1,3,4-tiadiazólio precursor do composto mesoiônico 4-fenil-5-[4-fluorcinnamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida (Figura 8). Sua estrutura foi determinada por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e espectroscopia de massa (DOS SANTOS e ECHEVARRIA, 2001). O MI-4F difere do composto mesoiônico MI-D pela substituição do grupamento nitro ( $-\text{NO}_2$ ) por um átomo de flúor ( $-\text{F}$ ). O composto MI-4F apresentou atividade contra as formas promastigotas e amastigotas da *Leishmania amazonensis* com  $\text{IC}_{50}$  de  $0,92 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $5,37 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente (DA SILVA et al., 2002).





**FIGURA 8. Estrutura Química do Cloreto de 4-fenil-5-[4-fluorocinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-4F) (A). FONTE: DOS SANTOS e ECHEVARRIA, 2001.**

#### **2.4. Os Compostos Meso-iônicos e sua Atividade Antitumoral**

Como já citado anteriormente GRYNBERG et al. (1997) demonstraram que os compostos meso-iônicos MI-D e MI-J provocam inibição significativa do crescimento ascítico de Sarcoma-180 e do crescimento do Carcinoma de Ehrlich, quando administrados por via intraperitoneal. Porém, a excessão do composto MI-D cujos efeitos sobre o metabolismo energético e sobre membranas estão determinados, ainda não há dados na literatura que esclareçam o mecanismo da ação antitumoral destes compostos meso-iônicos, e particularmente, seus efeitos sobre tumores mais agressivos e metastáticos também não foram avaliados. Os compostos meso-iônicos MI-2,4diF e MI-4F foram recentemente sintetizados (DOS SANTOS e ECHEVARRIA, 2001) e ainda não há nenhum estudo avaliando uma possível atividade antitumoral.

## 2.5. Melanoma

O melanoma origina-se de melanócitos, as células pigmentadas normalmente presentes na epiderme (camada externa da pele) e, por vezes, na derme (camada interna de pele). Os melanócitos humanos normais aderem na membrana basal da epiderme e com seus dendritos, alcançam os queratinócitos nas camadas superiores da epiderme para distribuir seu pigmento, a melanina. Este pigmento encontra-se nos melanosomos e fornece a proteção contra os efeitos prejudiciais da radiação ultravioleta (UV) (HERLYN e SATYAMOORTHY, 2001).

Os melanócitos são provenientes de células pluripotentes da crista neural. Sua sobrevivência, migração para a pele, e diferenciação está relacionada à expressão de determinadas moléculas, não apenas nas células que migram, mas também nos outros tipos celulares justapostos e na matriz extracelular (HERLYN e SATYAMOORTHY, 2001).

O melanoma ocorre quando os melanócitos tornam-se malignos. A maioria das células pigmentadas está na pele e, neste caso, quando o melanoma surge é designado Melanoma Cutâneo. O melanoma ainda pode ocorrer nos olhos (Melanoma Ocular ou Melanoma Intraocular). Raramente, o melanoma aparece nas meninges, no trato digestivo, nos linfonodos, ou outras áreas onde os melanócitos são encontrados (SOBER e KHO, 1995).

Existem quatro morfotipos de melanoma: melanoma de disseminação superficial, melanoma lentiginoso maligno, melanoma acrolentiginoso e melanoma nodular. Os três primeiros tipos possuem um período de crescimento superficial (denominado radial – fase de crescimento radial, FCR), em que a lesão aumenta de tamanho, mas não penetra em profundidade. Durante este período de crescimento, o melanoma tem maior capacidade de ser curado por excisão cirúrgica. O quarto

tipo, o melanoma nodular, manifesta-se como uma lesão profundamente invasiva, capaz de sofrer metástases precoces (fase de crescimento vertical - FCV) (SOBER e KHO, 1995; LOTZE et al., 2001).

O melanoma de disseminação superficial corresponde a 60-70% dos casos de melanoma, ocorrendo em qualquer local e sendo mais comum no tronco e nas mulheres, nas pernas. A idade média dos pacientes à época do diagnóstico é de 40-50 anos (SOBER e KHO, 1995; LOTZE et al., 2001).

O melanoma lentiginoso maligno ocorre nas superfícies expostas ao sol e representa 5% dos casos de melanoma. Geralmente acomete indivíduos idosos com idade média de 70 anos (SOBER e KHO, 1995; LOTZE et al., 2001).

O melanoma acrolentiginoso é relativamente incomum; ocorre na região plantar, região palmar, leito ungueal e nas mucosas. A idade média na época do diagnóstico é de 60 anos e este tipo de melanoma corresponde a 1-3% de todos os melanomas (SOBER e KHO, 1995; LOTZE et al., 2001).

O melanoma nodular é o segundo tipo mais comum, correspondendo a 15-30% dos casos de melanoma. Este melanoma pode ocorrer em qualquer local, mas são geralmente encontrados no tronco, cabeça e pescoço. E as pessoas diagnosticadas com este tipo de melanoma tem em média 40-50 anos (SOBER e KHO, 1995; LOTZE et al., 2001).

O estadiamento do melanoma está intimamente relacionado com a sobrevida dos pacientes e é feito de acordo com o grau de disseminação da neoplasia: local, regional ou distante. Quando confinado à pele, o melanoma é classificado como estadio I e II. O estadio I refere-se a tumores recentes e, portanto, com baixo risco, e o estadio II refere-se a tumores mais desenvolvidos, de risco intermediário. Metástases nos linfonodos regionais caracterizam o estadio III e metástases

distantes, ocorrendo principalmente na pele, pulmões, fígado, cérebro e ossos, definem o estadió IV da neoplasia (LOTZE et al., 2001).

Cerca de 85% dos pacientes portadores de melanoma cutâneo apresentam longa sobrevivida após a excisão cirúrgica precoce do tumor inicial. Porém, o melanoma é uma neoplasia agressiva e, no estado disseminado, possui poucas opções eficazes de tratamento e péssimo prognóstico. A sobrevivida média do melanoma metastático é de 6 a 9 meses e a terapia quimioterápica sistêmica atual apresenta resposta significatica em apenas uma minoria dos pacientes. (WACK et al., 2001; HUNCHAREK et al., 2001; LOTZE et al., 2001).

O prognóstico do melanoma é afetado por diversas variáveis, incluindo a idade do paciente, sexo, local do tumor primário, espessura do tumor, ulceração do tumor, taxa de mitose das células tumorais, presença de invasão linfovascular, presença de linfócitos infiltrados e presença de metástases nos linfonodos, na pele ou em outros órgãos (LOTZE et al., 2001). Entre estes fatores, a espessura tumoral (Breslow), a presença de ulcerações e de metástases são considerados como os melhores indicadores para prognóstico (BALCH et al., 2001).

A incidência do melanoma tem aumentado em diversos países; nos EUA foi a neoplasia com aumento mais expressivo, tendo o número de casos dobrado nas últimas três décadas (RIES et al., 2002). No Brasil, existem estimativas de que em 2003 ocorreriam 4.370 novos casos de melanoma e que ocorreriam 1.125 óbitos decorrentes desta neoplasia. Os estados brasileiros com as maiores incidências de melanoma são: São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina (INCA, 2003).

Os raios ultravioleta são o mais importante, talvez o único, agente causador do desenvolvimento do melanoma (LOTZE et al., 2001). Os fatores de risco para o

melanoma são: pele clara e inabilidade de bronzeamento, cabelos e olhos claros e a presença de sardas (HERLYN e SATYAMOORTHY, 2001). Exposições à luz solar intensa e história de queimaduras pelo sol, especialmente na infância, estão associadas com o desenvolvimento do melanoma. Contudo, a susceptibilidade do paciente e o histórico familiar também apresentam grande importância nesta neoplasia (HERLYN e SATYAMOORTHY, 2001).

### **2.5.1. Tratamento do Melanoma**

Embora a cirurgia seja o tratamento preferencial nos casos de melanoma, levando a boas taxas de cura quando o tumor é detectado e retirado em estágio inicial, no estágio disseminado do melanoma o procedimento cirúrgico é ineficaz (RODRIGUEZ-VICENTE et al., 1998). O tratamento para o estadió IV do melanoma é a quimioterapia sistêmica que, muitas vezes, é empregada como efeito paliativo (RODRIGUEZ-VICENTE et al., 1998; LOTZE et al., 2001). Quando comparado com outras neoplasias, o melanoma apresenta uma das piores taxas de resposta à quimioterapia. Infelizmente, poucos agentes demonstraram atividade antitumoral significativa contra o melanoma metastático (RODRIGUEZ-VICENTE et al., 1998; HUNCHAREK et al., 2001; LOTZE et al., 2001). No intuito de aumentar a resposta à quimioterapia, muitas pesquisas têm avaliado os efeitos da imunoterapia como terapia adjuvante ao tratamento quimioterápico. Recentemente, o uso de citocinas (interferons e interleucinas) tem apresentado efeitos promissores, porém em apenas uma pequena porcentagem dos pacientes (WACK et al., 2001; LOTZE et al., 2001). A utilização de vacinas e de terapia gênica para o tratamento do melanoma também tem sido estudada (RAGUPATHI et al., 2003; SLINGLUFF et al., 2003; HOOD et al., 2002; KISHIDA et al., 2003; NETTELBECK et al., 2004).

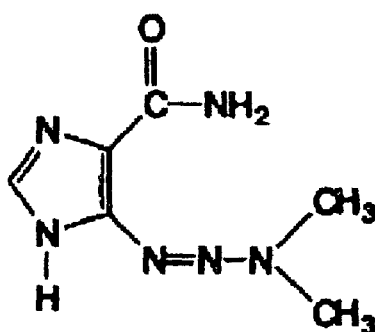
Os agentes quimioterápicos que têm sido amplamente utilizados no tratamento do melanoma metastático são: agentes alquilantes (dacarbazina) (HUNCHAREK et al., 2001; LOTZE et al., 2001), análogos da platina (LOTZE et al., 2001), nitrosouréias (fotemustina) (RODRIGUEZ-VICENTE et al., 1998; LOTZE et al., 2001) e toxinas tubulares (vinblastina) (LOTZE et al., 2001) (Tabela 1).

A dacarbazina (Figura 9) é considerada o agente de referência no tratamento do melanoma, com taxa de resposta de 14% a 20% e uma média de duração da resposta de 4 a 6 meses. A dacarbazina também é utilizada em combinação com outros agentes, e estudos mostram que estas associações poderiam ser, em alguns casos, mais efetivas que a dacarbazina sozinha (HUNCHAREK et al., 2001). Mas, ainda faltam estudos que comprovem a maior efetividade destas associações (LOTZE et al., 2001). A dacarbazina é uma prodroga que, para exercer seu efeito antineoplásico, necessita de metabolização pelas enzimas microssomais hepáticas. O intermediário formado decompõe-se espontaneamente no derivado ativo que metila o DNA das células. Esta lesão no DNA não permite a correta replicação, ocorrendo quebra das cadeias de DNA e morte celular (SLAPAK e KUFÉ, 1994; COLVIN, 2001; COLOMBO et al., 2001).

**TABELA 1. Agentes com Atividade Antimelanoma**

| <b>Agente Antineoplásico</b> | <b>Taxa de Resposta (%)</b> |
|------------------------------|-----------------------------|
| <b>Agentes Alquilantes</b>   |                             |
| Dacarbazina                  | 20                          |
| Dibromodulcitol              | 20                          |
| <b>Nitrosouréias</b>         |                             |
| Carmustina                   | 13                          |
| Lomustina                    | 16                          |
| Semustina                    | 16                          |
| Fotemustina                  | 25                          |
| <b>Agentes Antimitóticos</b> |                             |
| Vincristina                  | 12                          |
| Vinblastina                  | 13                          |
| Vindesina                    | 14                          |
| Taxol                        | 17                          |
| <b>Análogos da Platina</b>   |                             |
| Cisplatina/Carboplatina      | 15                          |
| <b>Citocinas</b>             |                             |
| Interferon-alfa              | 15                          |
| Interleucina-2               | 17                          |

**FONTE:** LOTZE et al., 2001.



**FIGURA 9. Estrutura Química da Dacarbazina. FONTE: COLVIN, 2001.**

O outro agente antineoplásico bastante utilizado nos casos de melanoma é a fotemustina (Figura 10), uma cloroetilnitrosouréia que apresenta uma taxa de resposta de 25%. A fotemustina é lipofílica e devido a sua excelente penetração no sistema nervoso central, é utilizada principalmente nos casos de melanoma disseminado com metástase cerebral. Normalmente estes casos de melanoma são refratários à maioria dos agentes devido à barreira hemato-encefálica (HUNCHAREK et al., 2001; LOTZE et al., 2001). A ação da fotemustina ocorre através da alquilação do DNA celular, sendo a alquilação da guanina-O<sup>6</sup> a grande responsável pela sua toxicidade. A lesão no DNA leva ao efeito citotóxico da droga (HAYES et al., 1997).

O tratamento com agentes quimioterápicos geralmente leva à resistência das células tumorais à droga. O mecanismo de resistência aos agentes alquilantes permite que as células tumorais reparem as lesões provocadas pelas drogas no DNA, anulando seus efeitos citotóxicos e escapando da morte celular (COLVIN, 2001).



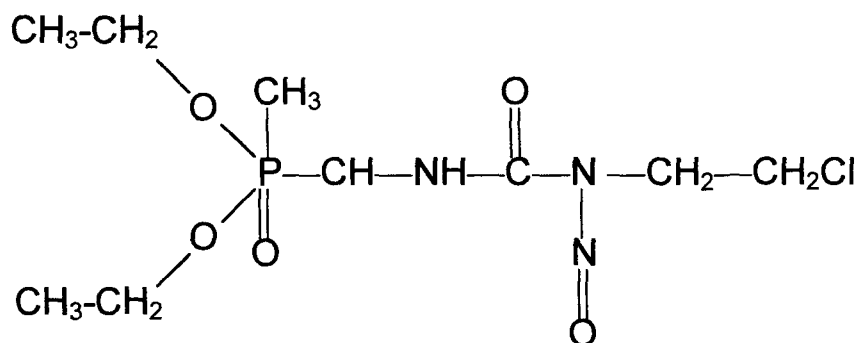


FIGURA 10. Estrutura Química da Fotemustina. FONTE: HAYES et al., 1997.

### 2.5.2. Modelos de Estudo do Melanoma

Muitos avanços no entendimento da biologia tumoral ocorreram nos últimos anos, contudo, muitos aspectos dos processos de invasão e metástase tumoral não são totalmente entendidos (HANAHAN e WEINBERG, 2000; YOSHIDA et al., 2000). Grande parte dos trabalhos em biologia tumoral utilizam métodos de cultura de células e tecidos; porém, o estudo de processos complexos, como o desenvolvimento de tumores, é limitado quando se utiliza ensaio *in vitro*. O melanoma espontâneo raramente ocorre em roedores, porém, pode ser induzido em camundongos (TIETZE e CHIN, 2000). Modelos murinos de tumores de pele representam boas aproximações da neoplasia humana; permitindo o estudo das várias etapas envolvidas na progressão tumoral (VAN DYKE e JACKS, 2002). Estes modelos tumorais permitem o desenvolvimento e a avaliação de novas drogas e procedimentos terapêuticos.

As linhagens de melanoma murino como B16, K1735, Cloudman S91-M3 e suas várias sublinhagens são freqüentemente utilizadas como modelos nesta área.

As três linhagens são altamente tumorigênicas e frequentemente utilizadas como modelos de crescimento tumoral *in vivo*: a linhagem B16 cresce espontaneamente em camundongos C57BL/6, a linhagem K1735 se desenvolve em camundongos C3H através da indução por radiação ultravioleta e a linhagem Cloudman S91-M3 se desenvolve espontaneamente em camundongos DBA/2 (PETER et al., 2001).

Modelos de melanoma em camundongos que levam em conta a radiação ultravioleta, fator de risco importante para o melanoma, têm sido desenvolvidos. Modelos animais que utilizam linhagens humanas de melanoma e camundongos imunodeficientes também têm sido apresentados e melhorados (BERKING e HERLYN, 2001). Linhagens de camundongos transgênicos e com genes deletados têm sido utilizadas para o estudo do melanoma. Camundongos apresentando as alterações genéticas observadas no melanoma humano de origem hereditária já foram desenvolvidos e estudados (TIETZE e CHIN, 2000; SOTILLO et al., 2001).

Apesar de não poderem ser diretamente extrapolados para os seres humanos, os modelos murinos de melanoma possibilitam um melhor entendimento desta neoplasia e de seu desenvolvimento, bem como constituem ferramentas experimentais importantes que possibilitam o estudo de novas drogas e novas estratégias terapêuticas, que podem fornecer subsídio para um tratamento clínico mais eficaz para o melanoma.

### 3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A seção 1 (Introdução) identificou a avaliação do potencial farmacológico dos compostos mesoiônicos na terapia antitumoral e a necessidade de se buscar novas drogas para o tratamento do melanoma como motivações deste trabalho. A revisão da literatura mostra que embora vários dos compostos mesoiônicos estejam bem estudados e até sendo usados como medicamentos, a série de 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos escolhida para este trabalho é pouco conhecida. Estudos de atividade biológica foram realizados com alguns destes compostos; nestes estudos os compostos MI-D e MI-J apresentaram atividade antitumoral quando testados em Sarcoma-180 e Carcinoma de Ehrlich (GRYNBERG et al., 1997). Porém, não há dados na literatura que elucidem o modo de ação antitumoral destes compostos, bem como ainda não foi verificada a sua ação em tumores mais agressivos e metastáticos. Especificamente, a atividade contra o melanoma nunca foi estudada.

Uma vez que apenas poucos agentes demonstraram substancial atividade antitumoral contra o melanoma metastático (HUNCHAREK et al., 2001), a descoberta de novas drogas ou novos protocolos de tratamento com melhores taxas de resposta é urgente. O presente estudo pretende contribuir com uma avaliação da atividade biológica dos quatro 1,3,4-tiadiazóis apresentados na revisão bibliográfica:

- cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D)
- cloreto de 4-fenil-5-[4-hidroxicinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-J)
- cloreto de 4-fenil-5-[2,4-difluorcinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-2,4diF)
- cloreto de 4-fenil-5-[4-fluorcinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-4F)

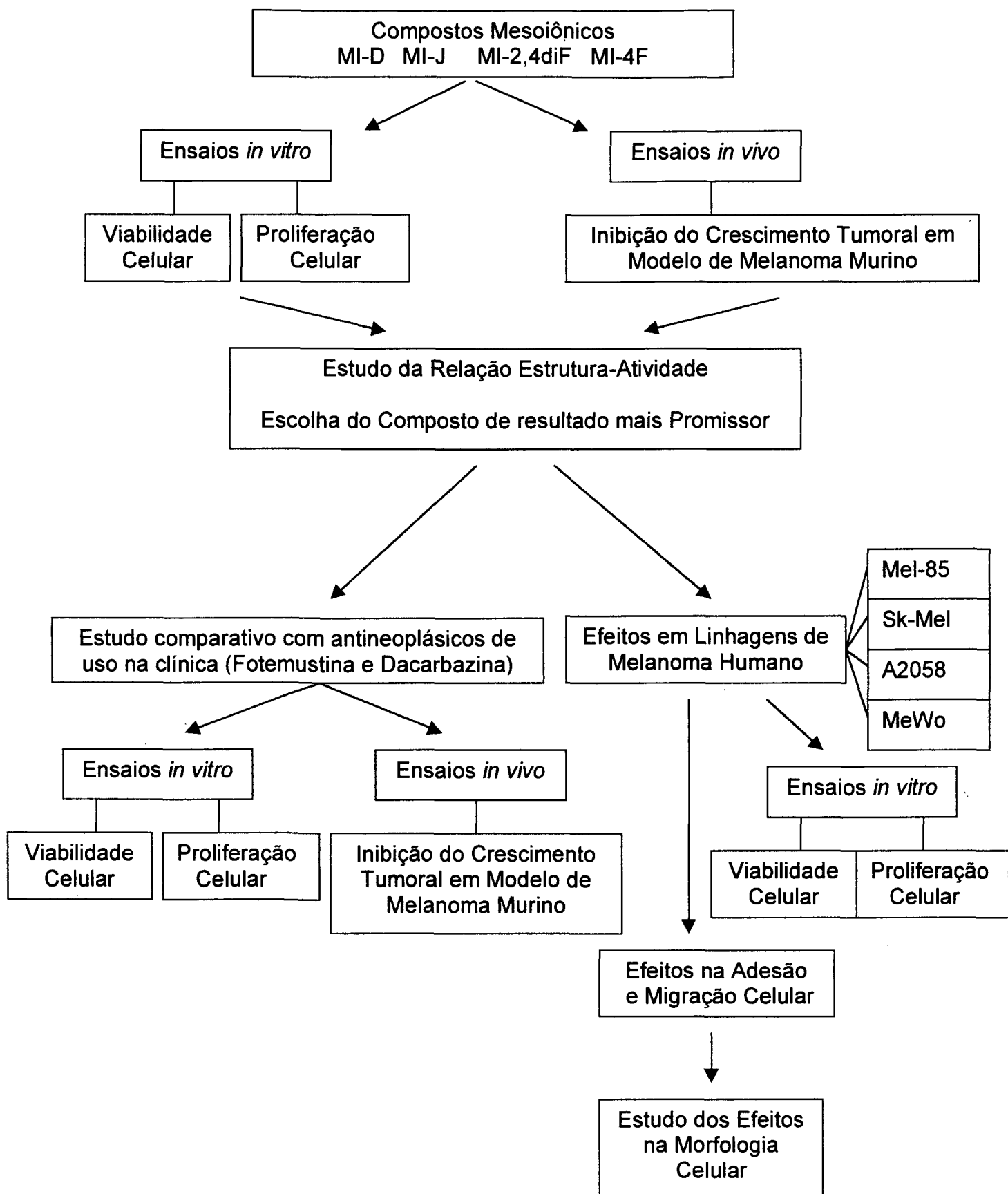
Especificamente, o projeto tem como objetivo geral a avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* dos compostos mesoiônicos MI-D, MI-J, MI-2,4diF e MI-4F em células de melanoma murino B16-F10, avaliando a relação estrutura-atividade

biológica. Visa também buscar perspectivas de utilização do composto de resultado mais promissor como quimioterápico, comparando os efeitos deste com o efeito causado por agentes antineoplásicos de uso estabelecido na clínica e avaliando a ação do composto mesoiônico em linhagens de melanoma humano.

Para alcançar estes objetivos, o trabalho foi realizado nas seguintes etapas:

- a) avaliação do efeito dos compostos mesoiônicos MI-D, MI-J, MI-2,4diF e MI-4F e o agente antineoplásico fotemustina na viabilidade e na proliferação das células de melanoma murino B16-F10 *in vitro*.
- b) avaliação dos efeitos antitumorais *in vivo* dos compostos mesoiônicos MI-D, MI-J, MI-2,4diF e MI-4F e dos agentes antineoplásicos fotemustina e dacarbazina utilizando modelo experimental com melanoma murino (células B16-F10) em camundongos C57BL6.
- c) avaliação dos efeitos do composto mesoiônico MI-D na viabilidade e na proliferação de células de melanoma humano (MEL-85, SK-MEL, A2058 e MEWO).
- d) avaliação dos efeitos do composto mesoiônico MI-D sobre a adesão e a migração celular em componentes da matriz extracelular.
- e) avaliação dos efeitos do composto mesoiônico MI-D sobre a morfologia e organização do citoesqueleto celular.

#### 4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Materiais e Reagentes

Os reagentes: albumina soro bovina (BSA), fenilsulfonaftaleína (vermelho de fenol), ácido N-2(4-hidroxietilpiperazina)-N'2-etano-sulfônico (HEPES), azul de Trypan, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), cristal violeta, borax, azul de toluidina, glicerol e ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA).

O Tris e o dodecil sulfato de sódio (SDS) foram comprados da Gibco (Bethesda, EUA) e o  $\beta$ - mercaptoetanol da Bio-Rad (Madison, EUA).

As membranas de acetato de celulose com poros de 0,22  $\mu$ m e os filtros descartáveis estéreis com membrana de acetato de celulose com poros de 0,22  $\mu$ m foram da Millipore®.

Os meios de cultura utilizados neste trabalho: meio essencial mínimo de Eagle (MEM), meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e RPMI1640 foram comprados da Cultilab (Campinas, Brasil). O soro bovino fetal (SFB) foi adquirido da Laborclin (Pinhais, Brasil). A penicilina e gentamicina foram compradas da Gibco (Bethesda, EUA). Todo material plástico utilizado para cultura de células (garrafas de cultura de monocamadas e placas de cultura) eram da marca TPP (Trasadingen, Suíça). As placas de Transwell para os ensaios de migração celular foram adquiridas da Costar Corporation (Cambridge, MA, EUA).

Os compostos mesoiônicos estudados neste trabalho (MI-D, MI-J, MI-2, MI-4F) foram sintetizados e caracterizados estruturalmente na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (GRYNBERG et al., 1997; DOS SANTOS e ECHEVARRIA, 2001) e gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Áurea Echevarria.

Os agentes antineoplásicos fotemustina (Muphoran®) e dacarbazina (Fauldacar®) foram gentilmente doados pelo Hospital A.C. Camargo (São Paulo) e pelo Hospital Erasto Gaertner (Curitiba), respectivamente.

O Entellan e os solventes dimetilsulfóxido (DMSO), etanol e xilol foram comprados da Merck (São Paulo, Brasil). A faloidina conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi fornecida pela Molecular Probes (Eugene, EUA). O paraformaldeído e o Fluormont-G® foi comprado da Electron Microscopy Sciences (Washington, EUA). Os demais reagentes utilizados também foram adquiridos da Merck do Brasil, todos com pureza analítica (P.A.).

## **5.2. Métodos**

### **5.2.1. Esterilização de Materiais**

Todo material de vidro utilizado para os procedimentos de cultivo de células (frascos de vidro para armazenamento de soluções, frascos de descarte de material, lamínulas, equipamento para filtração sob pressão, rolhas, tampas, pipetas de vidro, eppendorfs e ponteiras de pipetas automáticas) foram esterilizados em autoclave (Fanen) a 120°C, durante 30 minutos, a 1 atm.

### **5.2.2. Soluções Tampão e Meios de Cultura**

#### **5.2.2.1. Solução Salina Tamponada (PBS)**

A solução salina-fosfato tamponada (PBS) foi preparada como solução estoque concentrada 5x. Esta solução concentrada era constituída por 680 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl, 13,4 mmol.L<sup>-1</sup> de KCl, 40,5 mmol.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e pH ajustado foi para 7,4. A solução foi esterilizada em autoclave (120°C, 1 atm, 30 minutos) e

armazenada a 4°C. Para o uso, a solução foi diluída com água bidestilada estéril, recém-preparada em aparelho Corning Glass Work, modelo AG 10a.

#### **5.2.2.2. Solução Balanceada de Hanks (HBSS)**

A solução balanceada de Hanks (HBSS) é constituída da mistura das soluções A e B, as quais foram preparadas como soluções estoque (concentradas 20x) e armazenadas a 4°C. A solução A era constituída de 2,73 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl, 107 mmol.L<sup>-1</sup> de KCl, 25 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> e 27 mmol.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. A solução B era constituída por 8,5 mmol.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 111 mmol.L<sup>-1</sup> de glicose. As duas soluções foram preparadas em água bidestilada em volume de 50 mL e armazenadas a 4°C. Para o uso, as soluções A e B foram misturadas (1:1), diluídas com água bidestilada e o pH foi ajustado para 7,4. A solução de Hanks foi esterilizada por filtração em membranas estéreis com poros de 0,22 µm (Millipore®) em câmara de fluxo laminar vertical (VECO).

#### **5.2.2.3. Meios de Cultura**

Os meios de cultura utilizados neste trabalho foram o meio essencial mínimo de Eagle (MEM, Cultilab, Campinas, Brasil), meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Cultilab) e RPMI1640 (Cultilab). Os meios de cultura foram reconstituídos em água bidestilada e esterilizados por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm (Millipore®) sob pressão em aparelho Sartorius. Após o procedimento de filtração, alíquotas do meio foram deixadas em estufa 37°C, para acompanhamento do aparecimento de eventuais contaminantes. Os meios foram mantidos congelados ou em geladeira a 4°C. Para os experimentos os meios foram suplementados com quantidade adequada de soro fetal bovino estéril



(Laborclin), previamente inativado a 56°C em banho-maria por 30 minutos. O pH do meio foi ajustado com quantidades adequadas de solução de bicarbonato de sódio (7,5%, p/v) esterilizado em autoclave a 120°C e 1 atm por 30 minutos, e para o tamponamento do meio em pH 7,4 foi utilizado HEPES 20 mmol.L<sup>-1</sup> esterilizado por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm (Millipore®).

#### **5.2.2.4. Solução de Tripsina-EDTA**

A solução de tripsina-EDTA foi constituída de 137 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl, 5,4 mmol.L<sup>-1</sup> de KCl, 5 mmol.L<sup>-1</sup> de glucose, 0,42 mmol.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,44 mmol.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,3 mmol.L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>, 0,53 mmol.L<sup>-1</sup> de EDTA, 50 mg% de tripsina (1:250) e 2 mg% de vermelho de fenol, sendo o pH ajustado para 7,4. A solução foi esterilizada por filtração a vácuo e armazenada a -20°C.

#### **5.2.2.5. Preparo das Soluções de Compostos Mesoiónicos**

Para uso *in vitro* os compostos mesoiônicos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e as soluções estoque foram esterilizadas por filtração em membranas descartáveis estéreis hidrofóbicas com poros de 0,22 µm (Millipore®). Para utilização nos ensaios, estas soluções estoque foram diluídas em meio de cultura, a fim de obter-se a concentração final desejada para cada situação experimental. Para minimizar a interferência do solvente nos experimentos *in vitro*, várias soluções estoque dos compostos mesoiônicos foram preparadas. Desta forma a quantidade de DMSO presente nos experimentos foi sempre a mesma (0,12%), independente da concentração utilizada do composto mesoiônico. Para cada experimento realizado com os compostos mesoiônicos foi sempre feito um controle

contendo a mesma quantidade do solvente usado nas situações experimentais (0,12%). Para uso nos experimentos *in vivo* os compostos mesoiônicos foram diluídos em óleo de girassol comercial (Liza®).

#### **5.2.2.6. Preparo das Soluções de Agentes Antineoplásicos**

A solução de fotemustina (Muphoran®) foi preparada em etanol 95% (v/v) e a dacarbazina (Fauldacar®) foi dissolvida em solução aquosa contendo ácido cítrico (1:1 p/p) e manitol (1:3,5 p/p), como indicado pelos fabricantes. Para minimizar a interferência do solvente nos experimentos, várias soluções estoque de fotemustina foram preparadas e, para os ensaios, estas soluções estoque foram diluídas em meio de cultura, a fim de obter-se a concentração final desejada para cada situação experimental. Desta forma a quantidade de etanol presente nos experimentos foi sempre a mesma (0,045%), independente da concentração utilizada do agente antineoplásico. Em todos os experimentos realizados foi sempre feito um controle contendo a mesma quantidade de solvente das situações experimentais (0,045%) que continham a fotemustina. Para os experimentos *in vivo* foram utilizados os mesmos solventes indicados pelos fabricantes.

### **5.3. Células**

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: de melanoma murino B16-F10 e de melanoma humano MEL-85, SK-MEL, A2058 e MEWO, as quais foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Ricardo R. Brentani do Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer (São Paulo).

### 5.3.1. Procedimentos de Cultivo

Todas as linhagens celulares estudadas neste trabalho tiveram as condições de cultivo adaptadas para o Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. *In vitro* estas células se desenvolvem em monocamadas e foram cultivadas em garrafas estéreis (TPP) com meio de cultura, acrescido de soro fetal bovino (SFB), 20 mmol.L<sup>-1</sup> de HEPES e 8 mmol.L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sódio para ajustar o pH em 7,4. A linhagem B16-F10 foi cultivada em MEM contendo 7,5% SFB. As linhagens MEL-85 e MEWO foram cultivadas em RPMI contendo 10% SFB, a linhagem SK-MEL em RPMI contendo 15% SFB e as células A2058 em DMEM contendo 10% SFB. As culturas foram mantidas em estufa (Sanyo), em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, com umidade controlada de 95% e temperatura constante de 37°C. Os repiques foram realizados seguindo a rotina do laboratório utilizando, para descolar as células, solução de EDTA 2 mmol.L<sup>-1</sup>, no caso das linhagens humanas, ou solução de tripsina-EDTA, no caso da linhagem murina B16-F10. Para armazenamento das linhagens, as células (10<sup>7</sup>.mL<sup>-1</sup>) foram suspensas em meio de cultura, acrescido de soro fetal bovino 40% (v/v) e DMSO 10% (v/v), e congeladas inicialmente a -70°C, e a seguir em nitrogênio líquido. Para uso as células foram descongeladas a 37°C e semeadas no meio adequado como já descrito. Após adesão das células à superfície da garrafa (~4h), o meio foi trocado, eliminando-se o meio de congelamento contendo o DMSO e eventuais células mortas. A monocamada de células foi rotineiramente observada em microscópio invertido (Olympus, modelo CK2).

#### 5.4. Ensaio de Viabilidade Celular

Os ensaios de viabilidade celular das linhagens de melanoma foram realizados na ausência e presença dos compostos estudados. Após crescimento celular por 24 - 48 h em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C as células foram incubadas com o composto nestas mesmas condições, utilizando-se diferentes concentrações da droga (2,5 a 75  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e diferentes tempos de incubação, sendo 1, 3, 24, 48 e 72 horas, para a linhagem B16-F10 e 24 e 48 horas, para as linhagens humanas. Os ensaios foram realizados no mínimo 3 vezes e sempre em duplicata. Nos controles o meio continha quantidades adequadas de veículo: 0,12% de DMSO (v/v), para os compostos mesoiônicos e 0,045% de etanol (v/v), para a fotemustina. As células ( $5 \times 10^4$ ) foram plaqueadas em placas de 24 poços e após 24 horas foi adicionado o composto mesoiônico nas concentrações de 2,5; 5,0; 10; 25; 50; 75  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , seguindo-se a incubação durante os tempos determinados. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi centrifugado a 4000xg por 3 minutos, e o sobrenadante descartado. As células foram descoladas das placas com solução de EDTA 2  $\text{mmol.L}^{-1}$  e as placas lavadas duas vezes com PBS, a fim de que todas as células fossem coletadas. As células soltas em EDTA, juntamente com o PBS das lavagens foram submetidas à centrifugação (4000xg por 3 minutos). Os centrifugados de células foram unidos, ressuspensos em PBS e mantidos em banho de gelo até o momento da determinação da viabilidade celular (por período não superior a 20 minutos). A viabilidade celular foi, então, quantificada através do método de Azul de Trypan. Este teste de viabilidade utiliza como princípio a exclusão do corante vital Azul de Trypan (PHILLIPS, 1973). O corante Azul de Trypan, preparado na concentração de 0,4% p/v em PBS, foi utilizado na proporção de 1:10 (corante:amostra) e as células contadas em câmara de Neubauer em microscópio

ótico (OLYMPUS, mod.KW1). O percentual de viabilidade foi calculado conforme a equação:

$$CV (\%) = 100 \times (NC/NC + C)$$

Onde: CV, células viáveis; NC, células não coradas e C, células coradas pelo Azul de Trypan. A viabilidade dos controles, sempre que necessário, foi normatizada para 100%.

### **5.5. Ensaios de Proliferação Celular**

Os ensaios de proliferação celular foram realizados na ausência e presença dos compostos mesoiônicos. As células ( $5 \times 10^3$  células/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços e deixadas por 16 h em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C para que aderissem. O meio foi, então, substituído por outro sem adição de SFB para que todas as células estacionassem na fase G<sub>0</sub> do ciclo celular. Após 24 h, o meio sem SFB foi trocado por meio contendo SFB e as células mantidas por mais 24, 48 e 72 h na presença e na ausência do composto em estudo. Foram utilizadas diferentes concentrações das drogas (0,5 a 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Nos controles o meio continha quantidades adequadas de veículo: 0,12% de DMSO (v/v), para os compostos mesoiônicos e 0,045% de etanol (v/v), para a fotemustina. A proliferação celular foi quantificada através do método de MTT (MOSMANN, 1983). Os resultados foram expressos em número de células, que foi determinado através de curva padrão (número de células x absorbância) construída para cada linhagem celular. Este método baseia-se na atividade metabólica de células viáveis, com o uso do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazil-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), formando um produto colorido (sal formazan, que é insolúvel em água). Após o tempo determinado de tratamento das células o meio contendo o composto mesoiônico em estudo foi retirado

adicionando-se, então, a solução de MTT ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) em HBSS. Após 3 horas de incubação a  $37^\circ\text{C}$  em estufa de  $\text{CO}_2$ , o sobrenadante foi retirado e o solvente DMSO foi adicionado para solubilizar os cristais de formazan formados. A absorbância da solução resultante foi determinada em leitor de microplaca (Bio-Rad) utilizando filtro de  $550 \text{ nm}$  com referência em  $655 \text{ nm}$ , onde o branco foi o DMSO. Previamente ao experimento de proliferação celular, o método foi padronizado e a relação entre número de células viáveis e a quantidade de formazan gerado foi avaliada através de uma curva padrão de número de células por absorbância. A absorbância foi diretamente proporcional ao número de células e a linearidade se estendeu por toda a faixa avaliada, de  $2 \times 10^3$  a  $24 \times 10^3$  células/poço. No final dos ensaios, a correlação entre o teste colorimétrico e o exame visual microscópico das células foi verificada.

## **5.6. Animais**

Neste trabalho foram utilizados camundongos isogênicos C57BL/6 machos e fêmeas com idade entre 2 e 4 meses e peso em torno de 20-22 g. Os animais provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná foram mantidos em temperatura controlada ( $24^\circ\text{C}$ ), com livre acesso à alimentação e à água e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os grupos controle e tratado foram formados por no mínimo 5 animais cada.

## **5.7. Crescimento Tumoral *in vivo***

As monocamadas células B16-F10 foram descoladas das garrafas de cultura utilizando a solução de EDTA  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ , lavadas em PBS e sua concentração ajustada para  $2,5 \times 10^6$  células. $\text{mL}^{-1}$  em PBS. Desta suspensão,  $200 \mu\text{L}$  contendo  $5 \times$

$10^5$  células foi inoculado por via intraperitoneal (i.p.) ou via subcutânea (s.c.) na região dorsal dos camundongos. Após 24 h da implantação das células tumorais B16-F10, os camundongos foram inoculados por via intraperitoneal com soluções dos compostos mesoiônicos ou soluções dos agentes antineoplásicos, preparadas em seus respectivos solventes, na concentração de  $57 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ . O esquema de tratamento utilizado foi de uma única dose administrada 24 horas após a inoculação das células. Os animais do grupo controle foram inoculados com o veículo da droga, em idênticas condições. Os agentes antineoplásicos foram administrados na mesma dose e seguindo o mesmo protocolo para efeito de comparação.

Para a avaliação final dos efeitos dos compostos nos animais tratados o crescimento tumoral foi determinado através da massa dos tumores nos dois grupos de animais. O experimento foi encerrado no 17º dia, quando então os animais foram sacrificados por anestesia com éter etílico. Os tumores foram retirados, pesados e fotografados.

O percentual de inibição do crescimento do tumor foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Percentual de Inibição (\%)} = 100 (A - B)/A,$$

onde: A, massa média dos tumores do grupo controle; e B, massa média dos tumores do grupo tratado (BLASCHEK et al., 1992; REN et al., 1995).

Alternativamente, experimentos utilizando um protocolo de tratamento composto de 3 doses de  $57 \mu\text{mol.kg}^{-1}$  de MI-D nos dias 8, 9 e 10, após a inoculação das células, foram realizados. Em todos os casos os animais foram sacrificados após 17 dias e a avaliação final foi realizada como descrito acima.

## **5.8. Adesão Celular**

### **5.8.1. Obtenção das Moléculas de Matriz Extracelular**

As proteínas da matriz extracelular utilizadas nos ensaios de adesão foram purificadas no Laboratório de Matriz Extracelular do Departamento de Biologia Celular, UFPR sob orientação do Professor Dr. Silvio Sanches Veiga. A fibronectina foi obtida a partir de plasma humano fresco (ENGVALL e RUOSLAHTI, 1977; AKIYAMA e YAMADA, 1985). A laminina foi purificada a partir do Sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) através de extração com EDTA e posterior cromatografia em gel filtração e troca iônica (PAULSSON et al., 1987). O matrigel foi purificado a partir do Sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), através de sucessivas precipitações com tampão Tris 50 mmol.L<sup>-1</sup> contendo 3,4 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl (tampão de alto sal), seguidas de tratamento com uréia para solubilização das proteínas e diálises para eliminação da uréia (KLEIMAN et al., 1986).

### **5.8.2. Ensaios de Adesão Celular**

Para os experimentos de adesão celular foi utilizada a linhagem humana MEL-85 e os ensaios utilizaram proteínas da matriz extracelular - matrigel, laminina e fibronectina. Os ensaios de adesão seguiram o protocolo descrito por SAIKI et al. (1989) e foram realizados em placas de 96 poços sensibilizadas com a proteína da matriz extracelular (laminina, fibronectina ou matrigel) por período de 2 horas. A adesão celular foi quantificada através do corante cristal violeta. Os poços foram sensibilizados com laminina, fibronectina ou matrigel na concentração de 10 µg.mL<sup>-1</sup>; para controle negativo foi utilizada uma solução de BSA 1% (p/v). As placas foram então mantidas por 1h em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e em seguida foram colocadas por 12 h a 4°C. A proteína não aderida foi aspirada e os poços foram



lavados com PBS estéril. Adicionou-se, então, solução estéril de PBS contendo 1% de BSA e a preparação foi incubada durante 1h a 37°C em estufa com atmosfera de 2% de CO<sub>2</sub>, para bloquear os sítios inespecíficos. A placa foi, então, lavada com meio sem soro e 5 x 10<sup>4</sup> células MEL-85/poço foram acrescentadas em meio sem soro com diferentes concentrações de MI-D (0,5; 1; 2,5 e 5 μmol.L<sup>-1</sup>). A placa contendo as células foi então incubada a 37°C por 2 h em estufa com atmosfera de 2% de CO<sub>2</sub>, e os parâmetros de adesão e espalhamento celular foram observados. Após 2 h, as células não aderidas foram aspiradas e aquelas aderidas à placa foram fixadas em metanol por 10 minutos em temperatura ambiente. Às células aderidas às moléculas em questão adicionou-se, então, a solução do corante cristal violeta, preparado a 0,2% em etanol 2%. Após 2 a 5 minutos, os poços foram exaustivamente lavados (10 vezes com PBS) e, o corante eluído com 200 μL de solução de citrato de sódio 0,05 mol.L<sup>-1</sup> em etanol 50%, durante 10 minutos. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (Micro-Elisa Reader, Bio-Rad) utilizando filtro de 540-550 nm.

### **5.9. Ensaio de Migração Haptotática**

A migração das células MEL-85 através de gradiente de substrato protéico foi realizado de acordo com método descrito por MISHIMA et al. (1998). Foram utilizadas câmaras “transwell” de motilidade contendo poços superior e inferior separados por uma membrana de policarbonato, contendo poros de 8 μm de diâmetro e tratada para cultura. Primeiramente, a face inferior da membrana de policarbonato foi sensibilizada com fibronectina ou matrigel (10 μg.mL<sup>-1</sup>) em PBS por 40 minutos a 37°C. Este procedimento permite o estabelecimento de um gradiente de fase sólida insolúvel. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com BSA 1%. As

células MEL-85 ( $5 \times 10^5$ ) foram então adicionadas à câmara superior e incubadas por 4 h a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Nestes experimentos as células foram incubadas com 2,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de MI-D. Após as 4 h de incubação, as células na face superior da membrana foram removidas utilizando-se um cotonete. As membranas foram fixadas com solução de paraformaldeído a 2% por 10 minutos e coradas com solução de azul de toluidina, preparado a 2% em borax, por 10 minutos. Para eluição do corante utilizou-se tampão constituído por 62  $\text{mmol.L}^{-1}$  de Tris pH 6,8, 0,2% de dodecil sulfato de sódio (SDS) (p/v), 10% de glicerol (v/v) e 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol (v/v). A absorbância foi medida em 595 nm utilizando um leitor de microplacas (MicroElisa Reader - BioRad). Os experimentos foram realizados em triplicata e a migração celular dos controles foi normatizada para 100%. Para confirmar a integridade das moléculas proteicas utilizadas como substrato e também a integridade das células MEL-85 um experimento de adesão celular foi realizado simultaneamente ao ensaio de migração.

#### **5.10. Estudo Morfológico e Morfométrico**

As células MEL-85 foram cultivadas em lamínulas de vidro (13 mm) por 16 h a 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A seguir, MI-D nas concentrações finais de 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  foi adicionado, seguindo-se incubação por 2 h, nas mesmas condições. Após o tratamento com MI-D, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com solução de paraformaldeído 2% por 30 minutos a 4°C. As células foram, então, coradas por Giemsa (1:5, por 8 minutos), lavadas em água destilada, desidratadas em soluções crescentes de etanol (70 a 100%), diafanizadas em xilol e, então, as lâminas foram montadas com Entellan. Os controles foram submetidos às mesmas condições, sendo que o meio de cultura utilizado continha a mesma

quantidade do veículo que as amostras tratadas (0,12% de DMSO). As células foram observadas em microscópio (Olympus BX40) e as imagens celulares foram adquiridas em aumento de 400x, em tons de cinza, utilizando o “software” Image-Plus versão 4.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). Para a análise morfométrica, diversos campos das lâminas foram utilizados e cerca de 400 células foram analisadas para cada concentração do composto mesoiônico. O “software” utilizado para este estudo foi o ImageTool versão 3.00 (Universidade do Texas, San Antonio, EUA) e os parâmetros correspondentes à área, alongação e esfericidade foram analisados. Este programa avalia a área das células como o número de pixels do polígono e posteriormente, este valor foi convertido em % para uma melhor avaliação da análise (considerando o valor das células controle como 100%). A alongação foi calculada como a razão entre o comprimento do eixo maior e o comprimento do eixo menor. Esta razão corresponde a um valor maior ou igual a 1; se o resultado for igual a 1, o objeto é totalmente circular ou um quadrado e quanto mais o valor é maior que 1, mais alongado é o objeto. A esfericidade foi calculada como:  $(4 \times \pi \times \text{área})/\text{perímetro}^2$ . O resultado é um valor entre 0 e 1. Quanto mais próximo de 1, mais próximo de um círculo perfeito é o objeto e quanto mais distante de 1, mais distante de uma forma circular está o objeto.

#### **5.11. Estudo da Organização do Citoesqueleto**

O estudo da organização do citoesqueleto foi realizado através da técnica de imunofluorescência, como descrito por KUSANO et al. (2000). Para o ensaio, as células MEL-85 foram cultivadas em lamínulas de vidro estéreis (13 mm de diâmetro). Após crescimento de 16 h, as células foram incubadas em presença de  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de MI-D por 2 h. Nos experimentos controles, o meio de cultura continha

a mesma quantidade de solvente que as amostras tratadas (0,12% de DMSO). As células foram então lavadas duas vezes com PBS e fixadas com solução de paraformaldeído 2% em PBS por 30 minutos a 4°C. As lamínulas foram incubadas com solução de glicina 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, preparada em PBS, por 3 minutos, lavadas com PBS e então bloqueadas com PBS contendo 1% de BSA por 30 minutos a 25°C. Após 3 lavagens com PBS, as lamínulas foram incubadas com faloidina conjugada com fluoresceína (FITC) (Molecular Probes) (LÖW e WIELAND, 1974) por 1 hora. Após lavagem, as lâminas foram montadas utilizando fluormont-G® e observadas em microscópio confocal de fluorescência (Nikon Eclipse 800). Imagens das células foram adquiridas utilizando o aumento de 600x e software de captura de imagens Radiance 2100 (Bio-Rad).

### **5.12. Análise Estatística**

Todos os resultados foram submetidos à análise estatística, sendo as repetições e o tratamento avaliados. Os resultados dos ensaios *in vitro* foram submetidos à análise de variância (ANOVA – duplo sem repetição); e para avaliar as diferenças entre os tratamentos e controle foi utilizado o teste de Tuckey que permite estabelecer a diferença mínima significativa entre duas médias. Os ensaios *in vivo* foram avaliados estatisticamente através de análise de variância para duas amostras e aplicação do teste T. A significância foi definida como  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  ou  $p < 0,001$ .

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Efeitos dos Compostos Mesoiónicos na Viabilidade das Células B16-F10

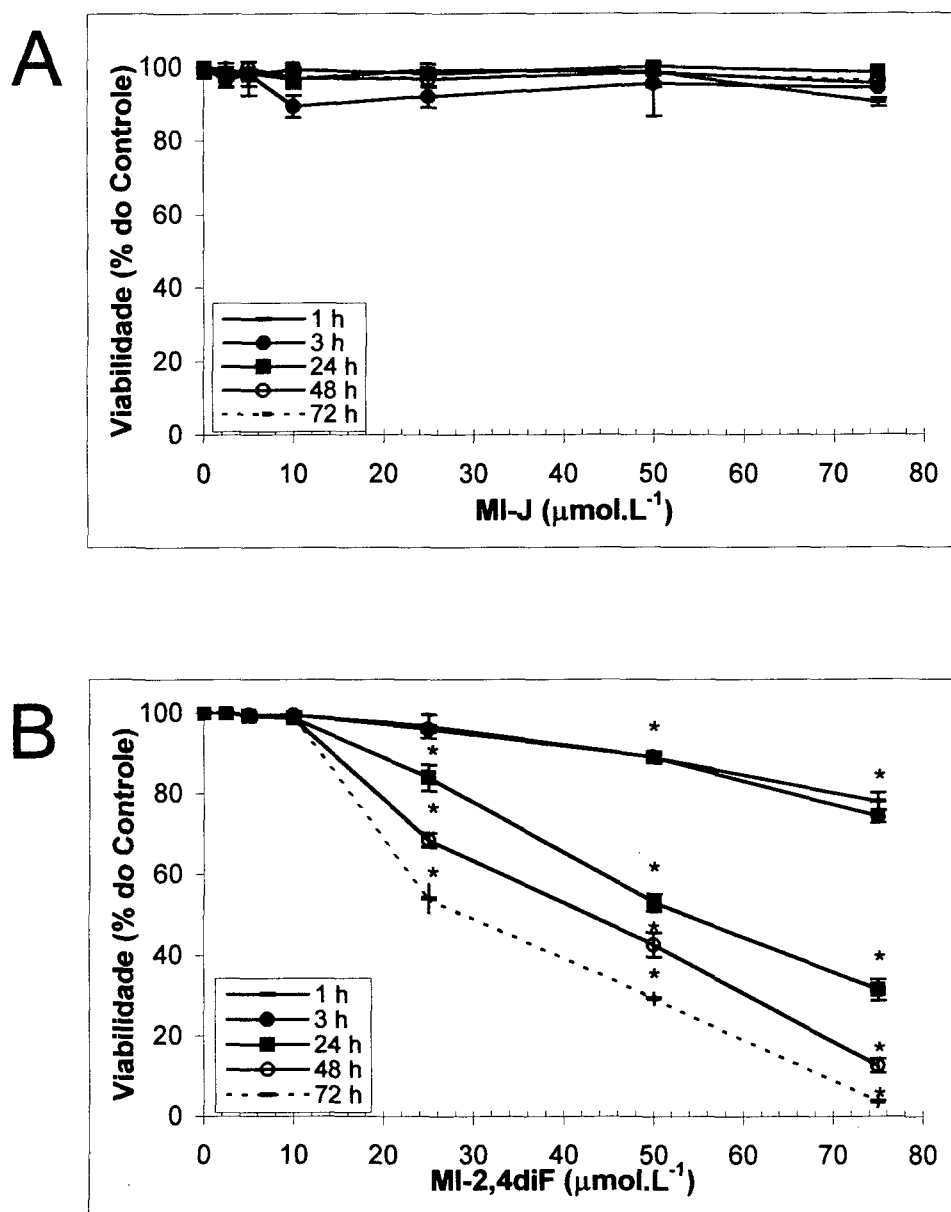
Os experimentos cujos resultados estão apresentados na Figura 11 tiveram por finalidade avaliar os efeitos da série de compostos mesoiônicos sobre a linhagem de células de *melanoma murino*. Nestes experimentos, a viabilidade celular foi avaliada através do método de Azul de Trypan após os tempos de 1, 3, 24, 48 e 72 horas de exposição aos compostos mesoiônicos utilizados nas concentrações finais de 2,5; 5,0; 10; 25; 50 e 75  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Verifica-se na Figura 11A que o composto MI-J, cujo substituinte é o grupo  $-\text{OH}$ , não apresentou atividade citotóxica para as células B16-F10 nas concentrações utilizadas mesmo após 72 h de incubação.

O composto mesoiônico substituído com dois átomos de flúor, MI-2,4diF, apresentou efeito citotóxico após 24 h na concentração de 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (Figura 11B). Esta concentração reduziu a viabilidade celular para 50% após 72 h. O efeito citotóxico máximo (100%) foi obtido utilizando-se 75  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de MI-2,4diF e um tempo de exposição de 72 h. Em concentrações inferiores a 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , o MI-2,4diF não apresentou efeito na viabilidade das células B16-F10.

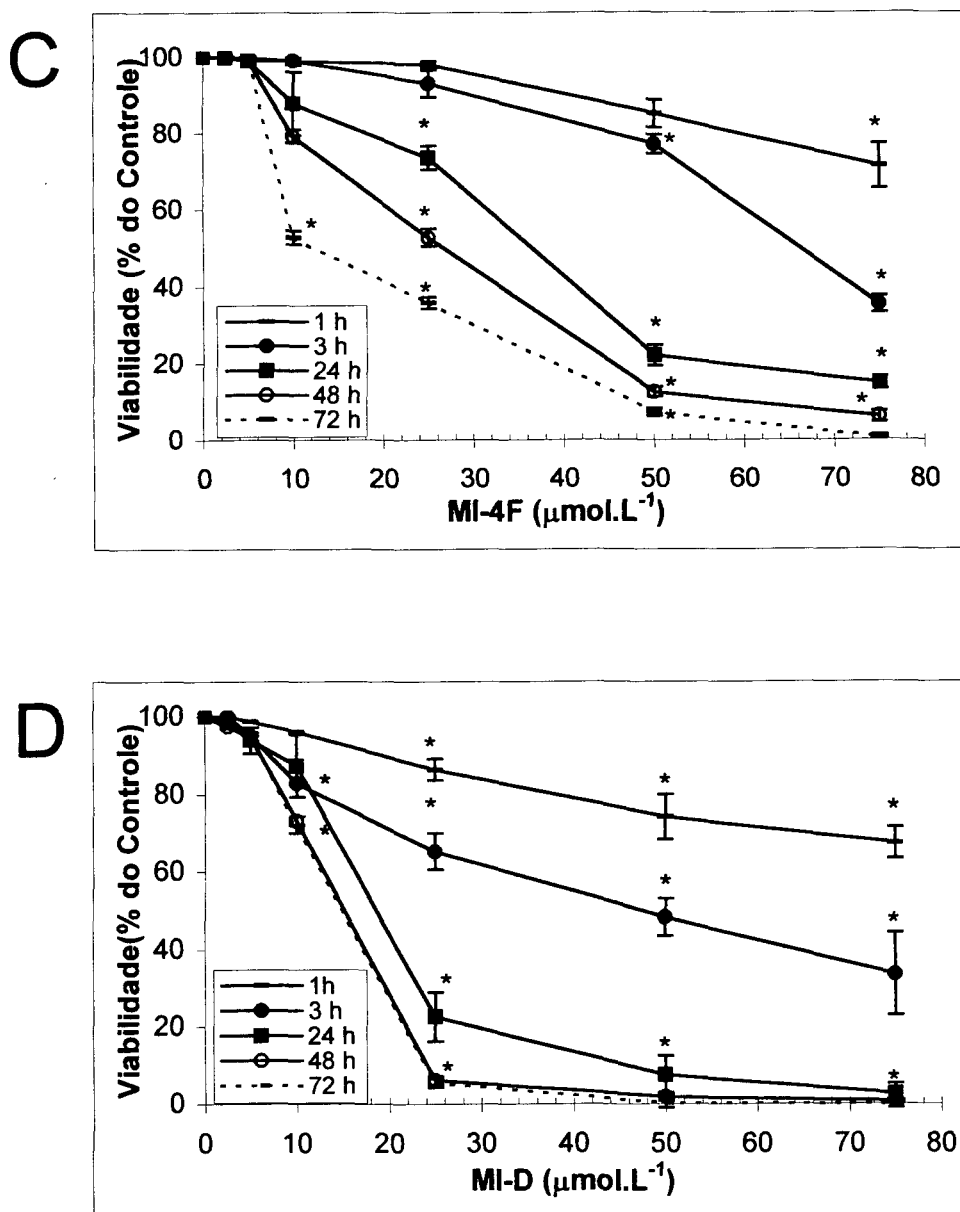
A Figura 11C mostra o efeito do derivado MI-4F sobre a viabilidade das células B16-F10. Verifica-se que a viabilidade foi reduzida a 80% quando 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e uma incubação de 48h foram utilizados, sendo que esta mesma concentração resultou em 50% de viabilidade após 72 h de tratamento. Após 3 h de incubação, o MI-4F, a 75  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , promoveu uma diminuição de 65% na viabilidade e, utilizando uma incubação de 24 h, somente 15% das células permaneceram viáveis. Portanto, o derivado monofluor parece ser mais citotóxico que o derivado difluor nestas condições experimentais.

O efeito do composto mesoiônico MI-D, cujo substituinte é o grupo  $-\text{NO}_2$ , sobre a viabilidade das células de melanoma B16-F10 está mostrado na Figura 11D. Verifica-se uma expressiva atividade citotóxica desencadeada por este derivado, que chega a reduzir a viabilidade à aproximadamente 1% na dose de  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  após 24 h. Verifica-se também que a concentração de  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  é citotóxica já a partir de 1 hora de incubação, e depois de 24 h de exposição à droga, o número de células viáveis cai a aproximadamente 20%. A concentração de  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  exerceu efeitos drásticos visto que menos de 10% das células permanecem viáveis após 24 h. O tratamento com  $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$  produz 100% do efeito citotóxico depois de 24 h. Porém, as concentrações de 2,5 e  $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$  não demonstraram efeito citotóxico mesmo após incubação de 72 h.

Portanto, à exceção do MI-J, que nas condições experimentais utilizadas não induziu efeitos citotóxicos, os compostos mono e difluor substituídos, bem como o MI-D que é nitro substituído, apresentaram efeitos tempo e dose dependentes. Comparando os efeitos na viabilidade celular, o composto MI-D mostrou 100% de efeito citotóxico após 24 h de tratamento com a concentração de  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (Figura 11E). O composto MI-2,4diF, nestas mesmas condições experimentais resultou em 50% de células viáveis. O MI-D provocou morte de todas as células com a concentração de  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e uma incubação de 48 h (Figura 11F). Neste tempo de tratamento e concentração, os compostos MI-2,4diF and MI-4F resultaram em viabilidades de 70% e 53%, respectivamente.

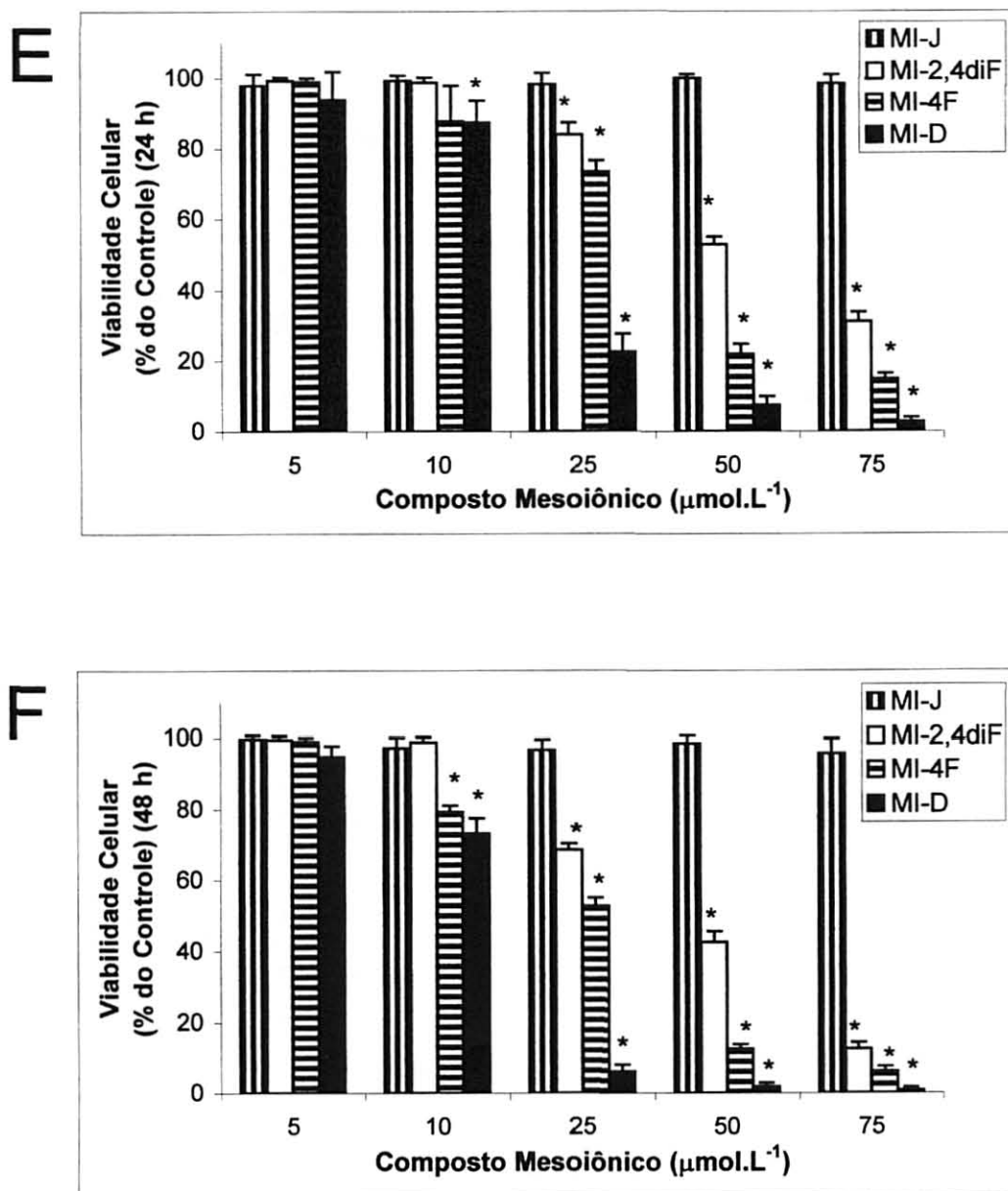


**FIGURA 11. Efeito dos Compostos Mesoioônicos sobre a Viabilidade das Células de Melanoma Murino B16-F10. (A) Composto MI-J. (B) Composto MI-2,4diF.** Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de Azul de Trypan nos tempos e concentrações indicados, como descrito em Materiais e Métodos (item 5.4.). (n = 4). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (m  $\pm$  d.p). \*, p < 0,001.



**FIGURA 11. Efeito dos Compostos Mesoiónicos sobre a Viabilidade das Células de Melanoma Murino B16-F10. (C) Composto MI-4F. (D) Composto MI-D. Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de Azul de Trypan nos tempos e concentrações indicados, como descrito em Materiais e Métodos (item 5.4.). (n = 4). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (m  $\pm$  d.p). \*, p < 0,001.**





**FIGURA 11. Efeito dos Compostos Mesoiónicos sobre a Viabilidade das Células de Melanoma Murino B16-F10. (E) Viabilidade celular após 24 h de incubação. (F) Viabilidade celular após 48 h de incubação. Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de Azul de Trypan nos tempos e concentrações indicados, como descrito em Materiais e Métodos (item 5.4.). (n = 4). Resultados expressos como média + desvio padrão (m + d.p). \*, p < 0,001.**

## 6.2. Efeitos dos Compostos Mesoiónicos na Proliferação das Células B16-F10

Para se verificar uma possível ação dos compostos mesoiônicos MI-J, MI-2,4diF, MI-4F e MI-D sobre a proliferação das células de melanoma murino B16-F10, este parâmetro foi avaliado através do método de MTT nos tempos de 24, 48 e 72 h após a incubação com os compostos nas concentrações finais de 2,5; 5,0; 10 e 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Os resultados destes experimentos estão apresentados na Figura 12. Este ensaio foi escolhido porque se trata de um ensaio amplamente utilizado para quantificar a proliferação celular, apresentando grande precisão e boa concordância com outras metodologias como a incorporação de timidina [ $\text{H}^3$ ] (MOSMANN, 1983; MAGAUD et al., 1998). A Figura 12A mostra que o composto mesoiônico MI-J não exerce efeitos significativos sobre a proliferação das células de melanoma murino nas concentrações (2,5 – 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e tempos avaliados.

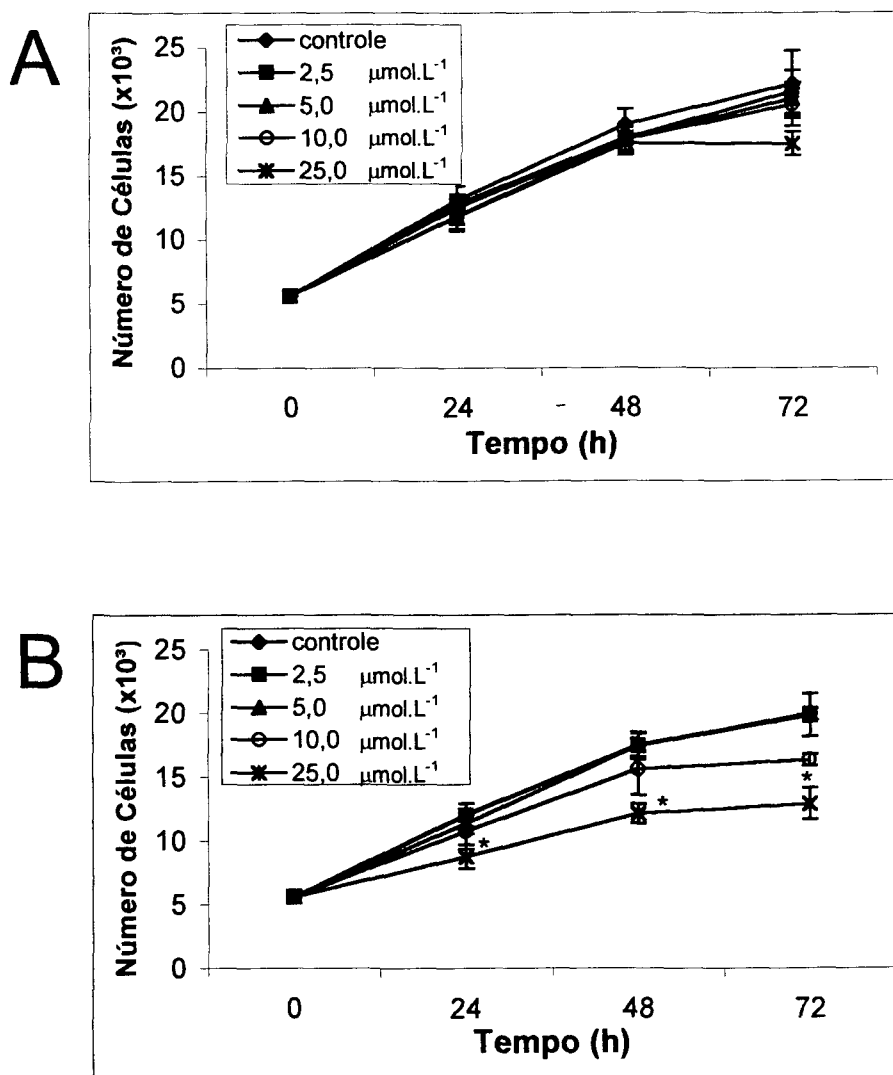
Os efeitos do MI-2,4diF sobre a proliferação das células B16-F10 estão mostrados na Figura 12B. Verifica-se que apenas a concentração de 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de MI-2,4diF apresentou efeito significativo sobre o crescimento das células de melanoma murino, diminuindo o número de células em cerca de 30% em 24 e 48 h e chegando a um máximo de 35% de inibição do crescimento após 72 h.

Os resultados obtidos com o composto MI-4F no ensaio de proliferação com as células B16-F10 estão apresentados na Figura 12C. Como pode ser observado, o crescimento celular foi afetado de forma significativa apenas quando a concentração de 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  foi utilizada, condição que inibiu o crescimento celular em cerca de 37% e 32% após 24 e 48 h, respectivamente. A diminuição no número de células quando comparado ao controle chega a 40% após 72h.

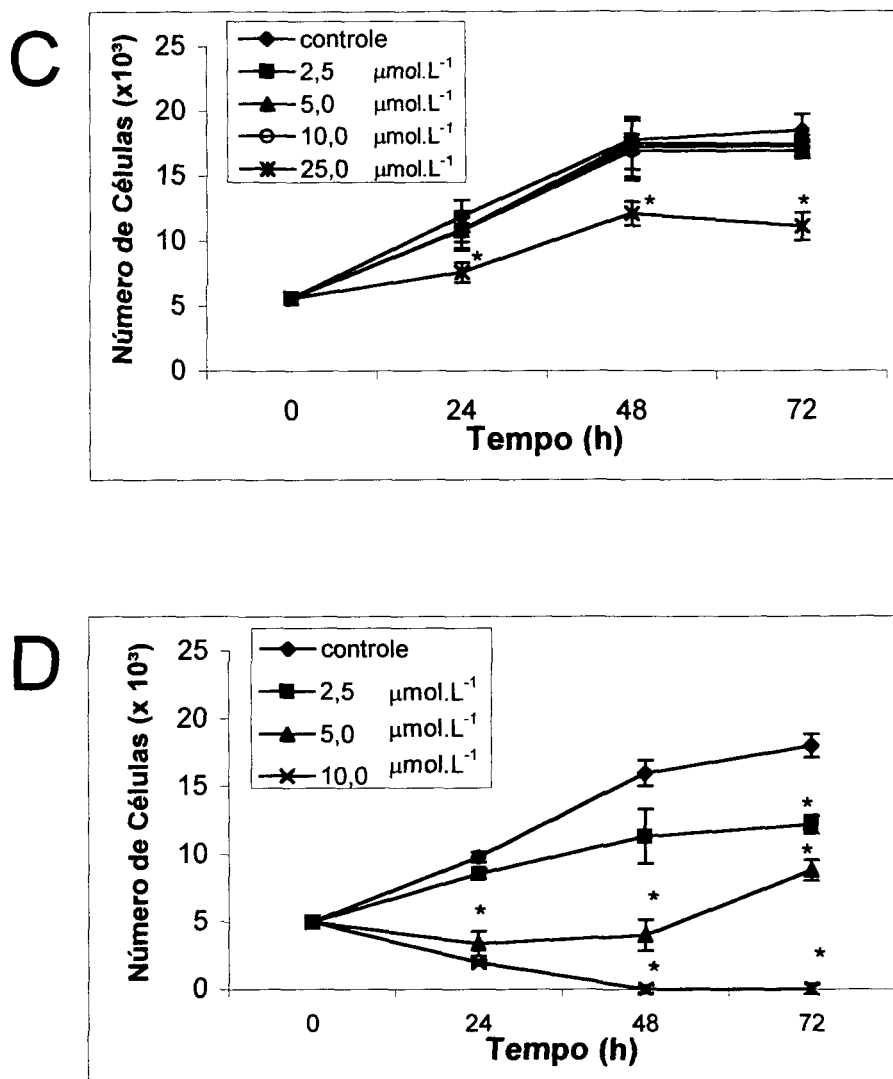
Os resultados apresentados na Figura 12D são referentes aos efeitos do composto MI-D. Verificou-se que este mostrou atividade citostática uma vez que as

concentrações subcitotóxicas utilizadas foram capazes de reduzir o número de células. A concentração de  $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , que não causa efeitos aparentes na viabilidade celular, provocou uma redução de 30% do número de células em relação ao controle. A concentração de  $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$  provocou um efeito antiproliferativo mais acentuado, uma vez que nenhum aumento no número de células ocorreu nos tempos de 24 e 48h. Porém, após 72 h ocorreu uma recuperação do crescimento celular e o número de células quase duplicou, apesar de ainda ser 50% inferior ao do controle. Utilizando a concentração de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , o composto MI-D inibiu completamente a proliferação celular.

Observando o crescimento das células B16-F10 na presença dos compostos mesoiônicos estudados, os valores encontrados para o MI-D não foram alcançados pelos outros três compostos. O MI-2,4diF e o MI-4F inibiram o crescimento das células de melanoma apenas quando a concentração de  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  foi utilizada. MI-D na concentração de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  impediu o crescimento celular durante as 72 h de experimento e, quando este composto foi utilizado nas concentrações de  $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , uma inibição significativa do crescimento das células B16-F10 também foi observada. O fato dos compostos mono e difluor e o MI-D terem mostrado resultados promissores *in vitro*, promovendo efeitos sobre a viabilidade e a proliferação celular, não significava que estes poderiam exercer efeitos *in vivo*. Isto porque os aspectos relacionados à biotransformação de uma droga freqüentemente influenciam os efeitos em suas atividades biológicas (farmacológicas e/ou toxicológicas), bem como na sua absorção, distribuição e excreção *in vivo* (STRAUGHAM et al., 1997). Assim, os compostos mesoiônicos foram avaliados *in vivo* no modelo de melanoma murino B16-F10 e camundongos isogênicos C57BL/6.



**FIGURA 12. Efeito dos Compostos Mesoiónicos sobre a Proliferação das Células de Melanoma Murino B16-F10. (A) Composto MI-J. (B) Composto MI-2,4diF. Proliferação celular avaliada pelo ensaio de MTT nos tempos e concentrações indicados, como descrito em Materiais e Métodos (item 5.5.). (n = 4). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (m  $\pm$  d.p). \*, p < 0,001.**

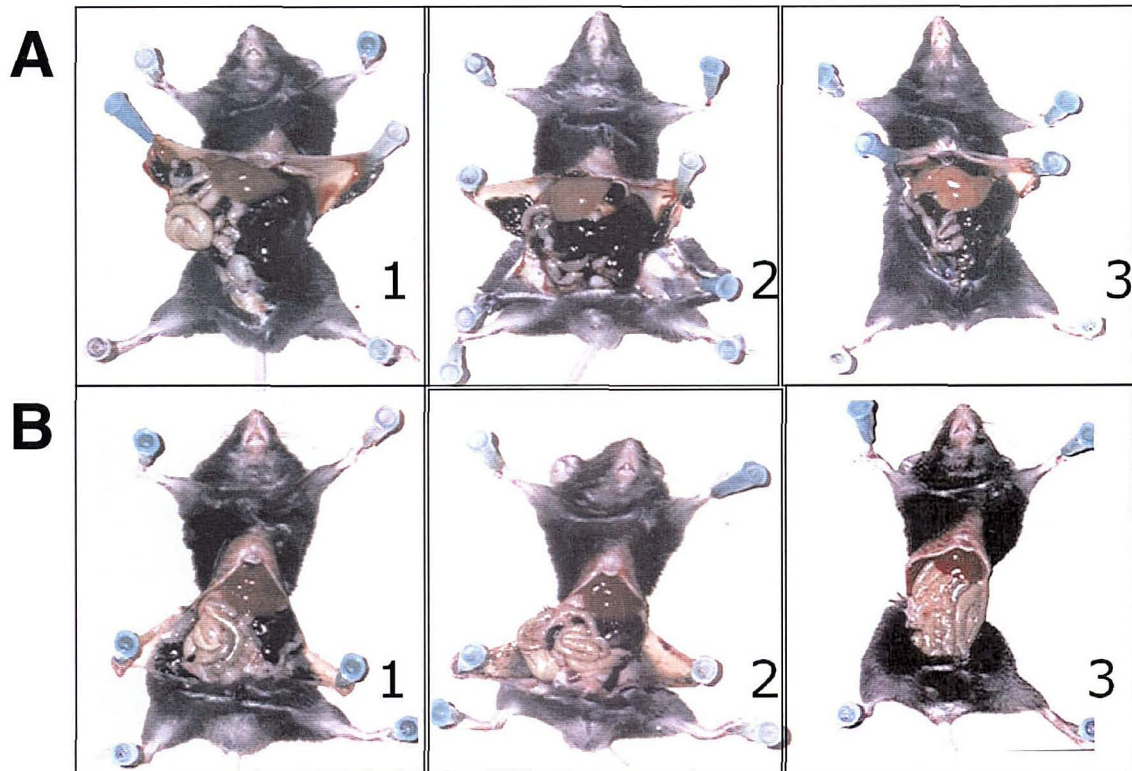


**FIGURA 12. Efeito dos Compostos Mesoioônicos sobre a Proliferação das Células de Melanoma Murino B16-F10. (C) Composto MI-4F. (D) Composto MI-D. Proliferação celular avaliada pelo ensaio de MTT nos tempos e concentrações indicados, como descrito em Materiais e Métodos (item 5.5.). (n = 4). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (m  $\pm$  d.p). \*, p < 0,001.**

### **6.3. Efeitos dos Compostos Mesoioônicos no Crescimento das Células B16-F10 *in vivo***

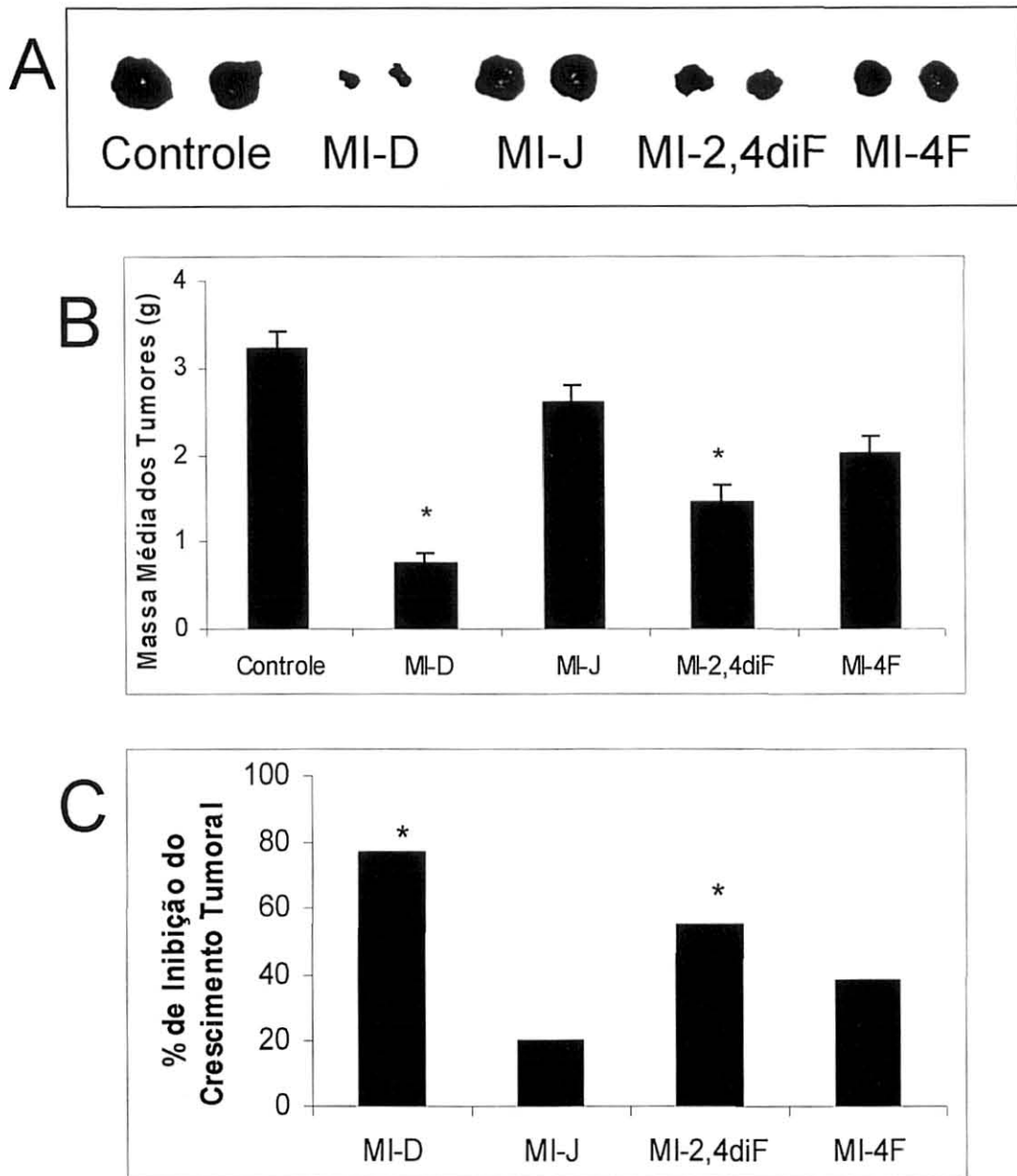
Para uma avaliação preliminar da atividade antitumoral *in vivo* do composto mesoioônico MI-D foi realizado um experimento em que o grupo controle recebeu  $5 \times 10^5$  células B16-F10 por via intraperitoneal (i.p.) no dia 0 (zero) e 200  $\mu\text{L}$  de óleo de girassol comercial (Liza®) (veículo da droga) no dia 1. O grupo tratado recebeu a mesma quantidade de células nas mesmas condições e no dia 1 recebeu o composto mesoioônico MI-D i.p. na dose de  $57 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ . Esta dose foi utilizada face aos efeitos exercidos sobre o Sarcoma 180, descritos para o MI-D (GRYNBERG et al., 1997). Após 17 dias da inoculação das células tumorais, os animais foram sacrificados e o conteúdo da região intraperitoneal pode ser visualizado (Figura 13). Cada grupo experimental foi composto por pelo menos 5 animais. Verificou-se uma inequívoca diminuição da massa tumoral nos camundongos tratados. Porém, como no crescimento intraperitoneal o tumor espalha-se pela região abdominal do animal, a quantificação do efeito antitumoral do composto ficou prejudicada. O efeito do composto MI-D mostrou-se muito reproduzível nestas condições. Vale destacar que foi observada ausência total de massa tumoral em dois animais tratados (Figura 13, animal B3), em dois experimentos independentes, o que tornou os resultados ainda mais relevantes. Entretanto, a possibilidade de que a perda da viabilidade das células inoculadas tenha sido decorrente da administração do MI-D no mesmo local onde as células foram administradas (i.p.) não pode ser excluída e, esta situação, evidentemente, impediria a proliferação das células tumorais no animal. Assim, tornou-se necessário o planejamento de condições experimentais que possibilitassem quantificar e analisar um possível efeito sistêmico não apenas do MI-D, mas dos outros compostos mesoioônicos até então não estudados.

Com a finalidade de obter informações quantitativas sobre os efeitos dos compostos mesoiônicos na diminuição do crescimento tumoral, as células B16-F10 foram inoculadas por via subcutânea na região dorsal dos animais. Os compostos mesoiônicos, ou o seu veículo (óleo de girassol), foram inoculados via intraperitoneal 24 horas após a implantação das células. O mesmo número de células B16-F10 ( $5 \times 10^5$ ) e a mesma dose ( $57 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ ) foram utilizados para todos os compostos mesoiônicos utilizados. Após 17 dias da implantação das células os animais foram sacrificados e os tumores extraídos, pesados e fotografados. A Figura 14 mostra os resultados referentes aos experimentos de inibição do crescimento tumoral *in vivo* com os compostos mesoiônicos MI-D, MI-J, MI-2,4diF e MI-4F. A foto mostrada na figura 14A refere-se a tumores representativos do experimento. As massas médias dos tumores extraídos dos animais controles e tratados estão mostrados na figura 14B, onde se observa que o desenvolvimento dos tumores foi expressivamente inferior aos do controle, quando o animal foi tratado com MI-D. Quantitativamente, o percentual de inibição do crescimento tumoral, calculado como recomendado por BLASCHEK et al. (1992) e REN et al. (1995), foi de 77% para o MI-D, 20% para o MI-J, 55% para o MI-2,4diF e 38% para o MI-4F (Figura 14C). Porém, apenas os compostos MI-D e MI-2,4diF mostraram atividade antitumoral estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) neste modelo de melanoma murino e nestas condições experimentais. A tendência à diminuição do crescimento tumoral observada no tratamento com os derivados MI-J e, principalmente com o MI-4F, apesar de reproduzível em todos os experimentos, não foi estatisticamente significativa.



**FIGURA 13. Atividade Antitumoral *in vivo* do Composto Mesoiônico MI-D - células implantadas intraperitonealmente. (A)** Animais representativos do grupo controle. **(B)** Animais representativos do grupo tratado. Foram inoculadas  $5 \times 10^5$  células B16-F10 por via intraperitoneal (i.p.). O tratamento consistiu de uma única dose de MI-D ( $57 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ ) i.p. 24 h após a injeção de células. O grupo controle recebeu o veículo (óleo inerte) no mesmo volume e via, como descrito em Materiais e Métodos (item 5.7.). Os animais foram sacrificados 17 dias após o início do experimento ( $n = 7$ ).





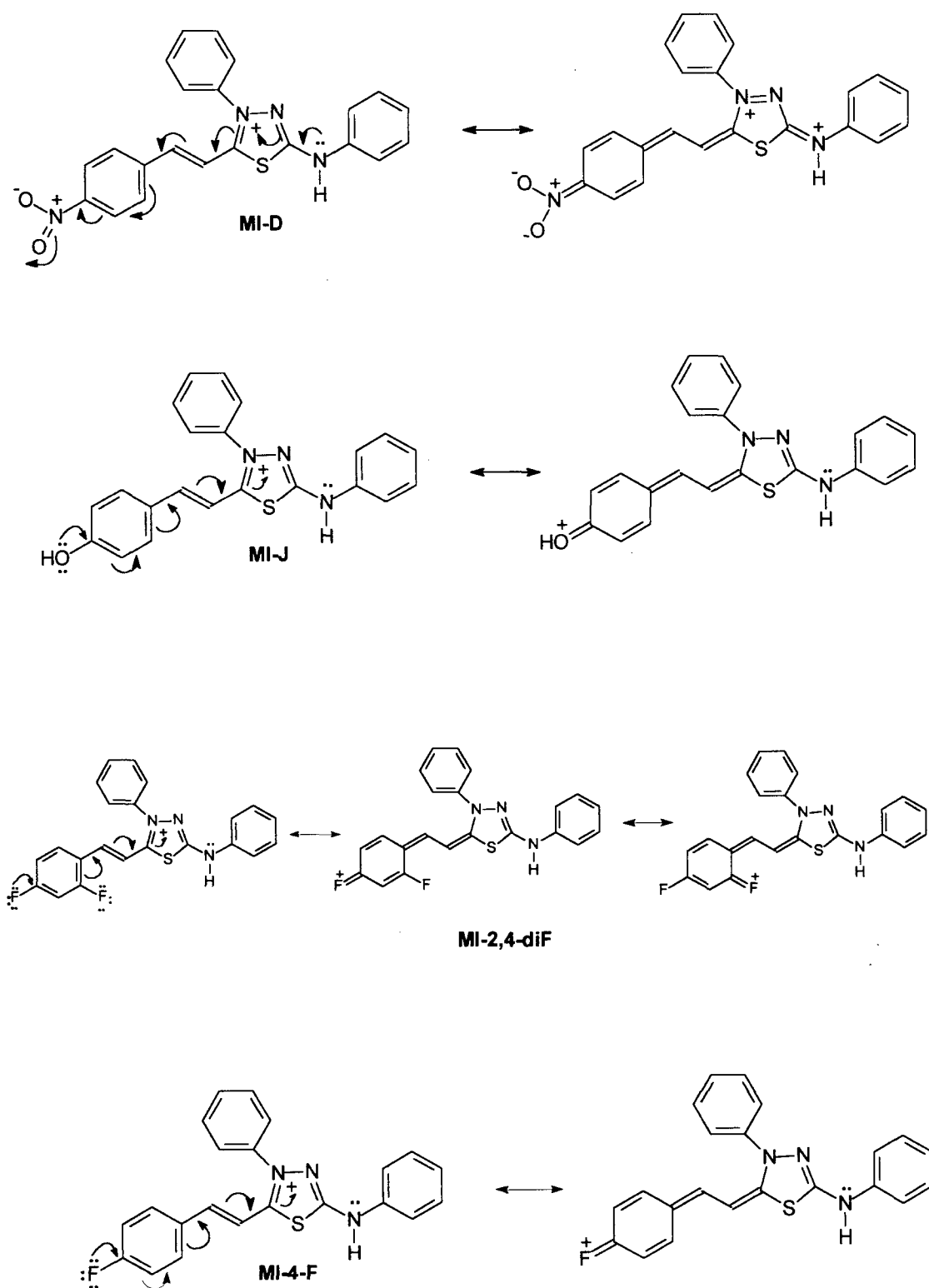
**FIGURA 14. Atividade dos Compostos Mesoioônicos *in vivo* – Melanoma Subcutâneo. (A)** Tumores representativos extraídos dos animais do grupo controle e dos animais tratados com os diferentes compostos mesoioônicos. **(B)** Massas médias dos tumores extraídos. **(C)** % de inibição do crescimento tumoral. Células B16-F10 ( $5 \times 10^5$ ) foram inoculadas por via subcutânea em camundongos C57BL/6. Uma única dose do composto mesoioônico ( $57 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ ) foi administrada por via intraperitoneal 24 h após a injeção de células. O grupo controle recebeu o veículo (óleo inerte) no mesmo volume utilizado para os animais tratados ( $100 \mu\text{L}$ ). Após 17 dias, os animais foram sacrificados e o massa dos tumores extraídos determinada, como descrito em *Materiais e Métodos* (item 5.7.). (Controles,  $n = 6$ ; MI-D,  $n = 5$ ; MI-J,  $n = 6$ ; MI-2,4diF,  $n = 5$ ; MI-4F,  $n = 5$ ). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*,  $p < 0,05$ .

Os testes *in vivo* realizados com os compostos mesoiônicos confirmaram a efetividade *in vitro* do MI-D. Entretanto, o composto MI-4F, que apresentou um efeito ligeiramente superior ao MI-2,4diF *in vitro*, *in vivo* não apresentou a mesma efetividade, visto que o MI-2,4diF inibiu o crescimento tumoral (55%) enquanto o MI-4F não apresentou efeito significativo ( $p > 0,05$ ). Este resultado pode ser decorrente da presença dos dois átomos de flúor na molécula de MI-2,4diF, que tornando-a uma molécula mais hidrofóbica, permitiria e/ou facilitaria o trânsito através das membranas.

Vale destacar que nos modelos de Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich estudados por GRYNBERG et al. (1997) tanto o composto MI-D como o MI-J causaram significativa inibição do crescimento tumoral. O composto MI-D apresentou atividade antitumoral contra Sarcoma-180 quando foi administrado em duas doses de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  ( $22,8 \text{ } \mu\text{mol.kg}^{-1}$ ), e o composto MI-J quando foi administrado em duas doses de  $30 \text{ mg.kg}^{-1}$  ( $73,64 \text{ } \mu\text{mol.kg}^{-1}$ ), nos dias 1 e 5 após a inoculação da células. Para o Carcinoma de Ehrlich a dose utilizada para os dois compostos foi de  $25 \text{ mg.kg}^{-1}$  ( $57 \text{ } \mu\text{mol.kg}^{-1}$  para o MI-D e  $61,37 \text{ } \mu\text{mol.kg}^{-1}$  para o MI-J) e foram administradas duas doses durante o tratamento, nos dias 1 e 5 após a inoculação da células tumorais. Contudo, o composto MI-D apresentou um efeito superior ao efeito do MI-J nos dois modelos tumorais. Tais resultados foram atribuídos ao substituinte, que quanto mais polar mais desloca a carga dos compostos heterocíclicos mesoiônicos, aumentando a possibilidade de interações eletrostáticas com moléculas como o DNA e proteínas (GRYNBERG et al., 1997).

No presente estudo, o MI-J não apresentou nenhum efeito nas células de melanoma murino B16-F10 tanto *in vitro* quanto *in vivo* nas condições experimentais estudadas. Pode-se propor que o resultado positivo observado nos modelos de

Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich (GRYNBERG et al., 1997) decorre, muito provavelmente, do fato de serem modelos tumorais menos agressivos que o modelo de melanoma utilizado neste trabalho. Além disso, o composto foi administrado pela mesma via em que as células tumorais foram inoculadas. Apesar do composto mesoiônico MI-J possuir uma estrutura relacionada com a do MI-D, diferindo apenas no substituinte do anel cinamoil, a natureza eletrônica dos substituintes deve ser considerada, visto que os efeitos eletrônicos influenciam a distribuição de carga no anel heterocíclico. O composto MI-J é o único que possui um grupo liberador de elétrons (-OH), contribuindo para a redução da carga positiva do anel heterocíclico (Figura 15). Por outro lado, MI-D, MI-4F e MI-2,4diF, possuem grupos atratores de elétrons (-NO<sub>2</sub> e -F), os quais contribuem para a intensificação da carga positiva no anel mesoiônico (Figura 15). Contudo, a presença do flúor como substituinte no anel proporciona um efeito doador de elétrons por ressonância e por outro lado, este átomo é atrator de elétrons por efeito indutivo, estas características resultam que o F comporta-se como um grupo acceptor de elétrons menos efetivo quando comparado com o NO<sub>2</sub>. Além disso, a combinação dos parâmetros eletrônicos e lipofílicos, expressados pelas constantes de Hammet ( $\sigma$ ), que descreve os efeitos eletrônicos de substituinte no anel benzênico, e hidrofobicidade de Hansh ( $\pi$ ), que é relativa à substituição do hidrogênio (HANSH et al., 1995), pode ser necessária para a atividade biológica de uma determinada estrutura. O derivado mais ativo, MI-D, possui  $\sigma_{\text{NO}_2} = 0,78$  e  $\pi_{\text{NO}_2} = -0,28$ , enquanto MI-J  $\sigma_{\text{OH}} = -0,37$  e  $\pi_{\text{OH}} = -0,67$ . MI-2,4diF apresenta  $\sigma_{\text{diF}} = 0,40$  e  $\pi_{\text{diF}} = 0,28$ , indicando uma combinação diferente destes efeitos (ECHEVARRIA, comunicação pessoal).



**FIGURA 15. Estruturas de Ressonância dos Compostos Meso-iônicos 1,3,4-tiadiazóis estudados : MI-D, MI-J, MI-2,4diF and MI-4F.**

Foi mostrado para esta classe de compostos mesoiônicos que grupos atratores de elétrons permitem uma conjugação extensiva da cadeia lateral com a porção exocíclica (DOS SANTOS e ECHEVARRIA, 2001). Como o composto que possui o grupo atrator de elétrons mais forte (MI-D) apresentou os efeitos biológicos mais intensos, podemos sugerir que esta conjugação seja importante para a atividade antitumoral dos compostos 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos.

#### **6.4. Efeito Comparativo do Agente Antineoplásico Fotemustina e do MI-D na Viabilidade das Células B16-F10**

Considerando que da série de compostos mesoiônicos estudados o derivado com substituinte  $-\text{NO}_2$  (MI-D) apresentou os melhores resultados, deu-se prosseguimento aos estudos com o composto MI-D. Com a finalidade de explorar o potencial do MI-D no controle do crescimento das células de melanoma, uma comparação com quimioterápicos conhecidos seria relevante. Dacarbazina e fotemustina são antineoplásicos utilizados na clínica por seus reconhecidos efeitos em melanoma (BOAZIZ, 1992; HUNCHAREK et al., 2001; LOTZE et al., 2001). Estas drogas foram utilizadas nos estudos *in vivo* deste trabalho como um controle positivo, e nas mesmas concentrações molares utilizadas para o composto mesoiônico. Nos experimentos *in vitro* foi utilizada a fotemustina, uma vez que a dacarbazina não é adequada para tal condição experimental visto que sua ativação ocorre através de enzimas microssomais hepáticas (SLAPAK e KUFE, 1994).

Os efeitos do agente antineoplásico fotemustina na viabilidade das células B16-F10 estão mostrados na Figura 16. Verifica-se que o quimioterápico tem uma discreta ação sobre as células de melanoma murino, reduzindo em apenas 10% a viabilidade celular, na concentração de  $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e após 48 e 72 h de exposição

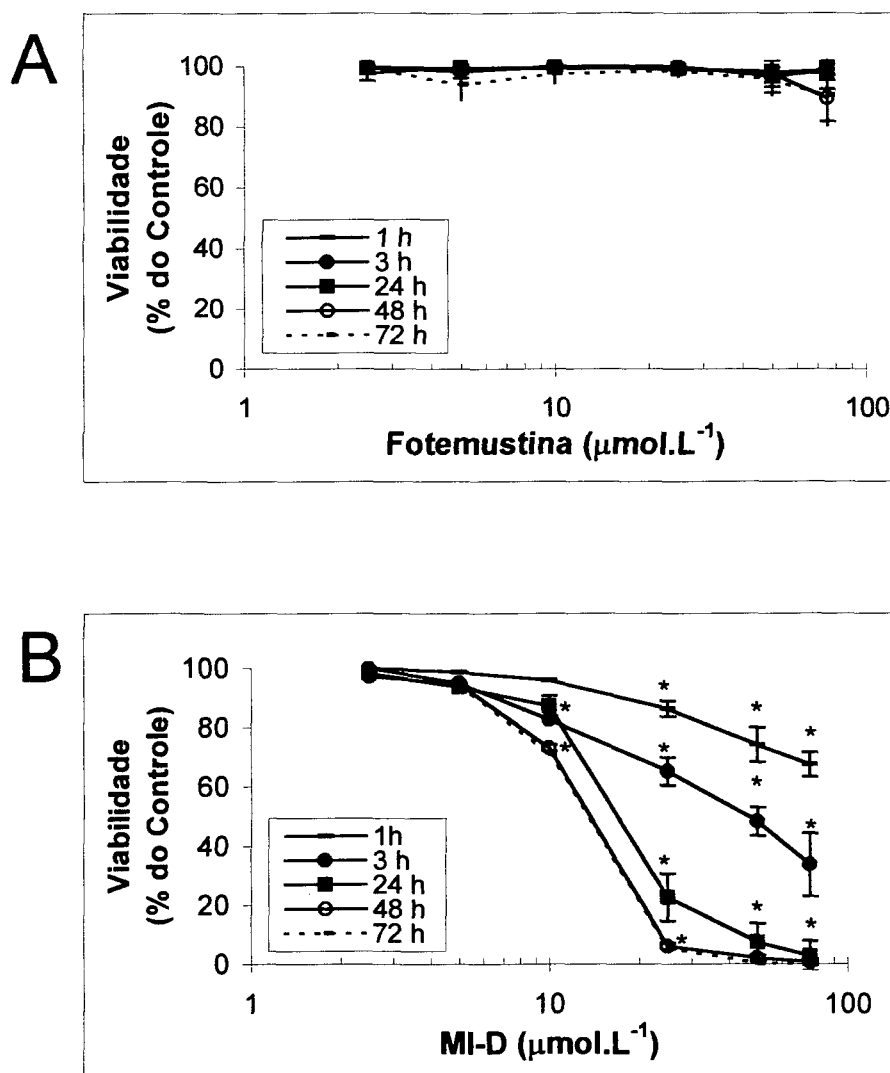
(Figura 16A). Estes resultados são consistentes com aqueles de RODRIGUEZ-VICENTE et al. (1998), que mostraram em células B16-F10 um alto valor de  $DI_{50}$  para fotemustina, de  $257 \mu\text{mol.L}^{-1}$  após 24 h de exposição a este quimioterápico. Já, o composto MI-D é extremamente citotóxico às células B16-F10, nas mesmas condições experimentais estudadas (Figura 16B).

### **6.5. Efeito Comparativo do Agente Antineoplásico Fotemustina e do MI-D na Proliferação das Células B16-F10**

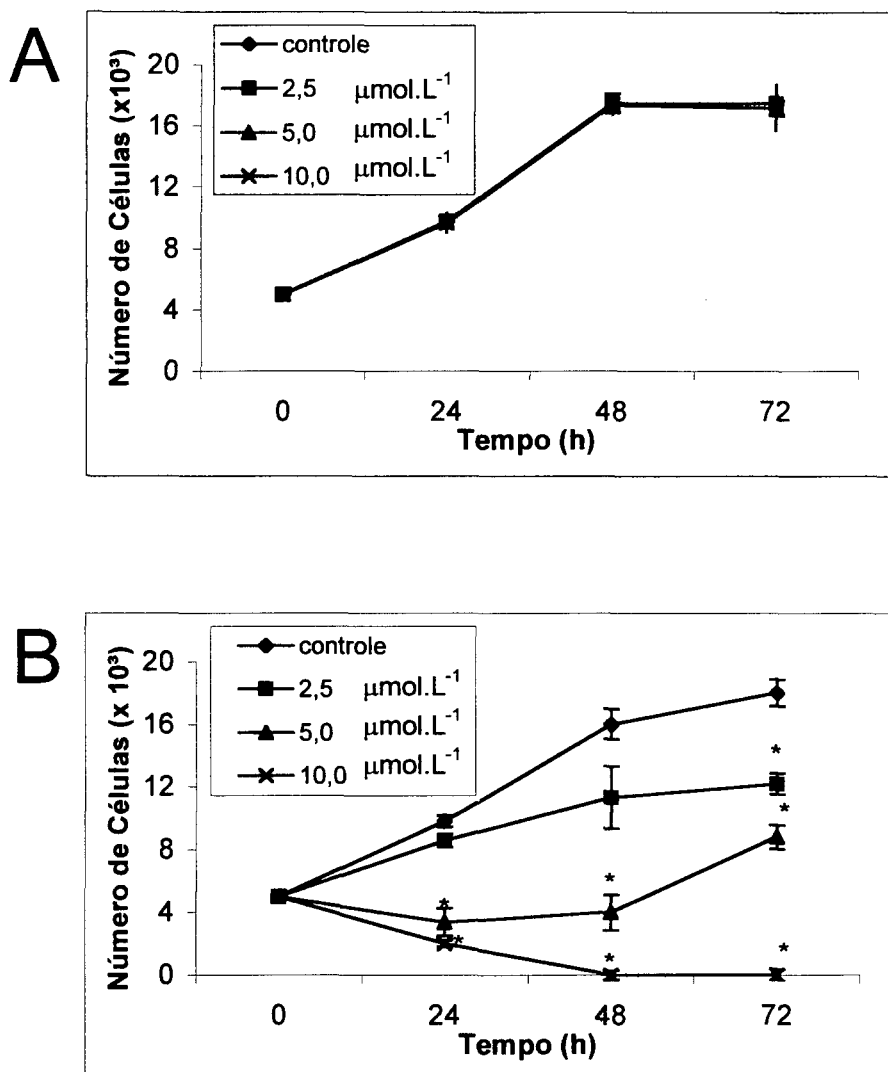
A Figura 17 mostra os efeitos do agente antineoplásico fotemustina na proliferação das células de melanoma murino. Nenhum efeito sobre o crescimento das células B16-F10 foi observado nas concentrações e tempos testados (Figura 17A). As mesmas concentrações de MI-D mostraram uma grande inibição do crescimento das células B16-F10 (Figura 17B). Estes resultados são importantes pois a propriedade de exercer efeitos em baixas concentrações é desejável para um composto com potencial aplicação como fármaco (COLOMBO et al., 2001)

### **6.6. Efeito Comparativo dos Agentes Antineoplásicos Fotemustina e Dacarbazina e do MI-D no Crescimento das Células B16-F10 *in vivo***

Para uma comparação do efeito da fotemustina, da dacarbazina e do MI-D no crescimento *in vivo* das células B16-F10, estas foram inoculadas por via subcutânea na região dorsal dos animais. Considerando a possibilidade de variações biológicas inerentes a estes ensaios, o experimento *in vivo* utilizando MI-D foi novamente realizado em paralelo com a fotemustina e a dacarbazina, para que os resultados fossem plausíveis de comparação com estes quimioterápicos.



**FIGURA 16. Efeito do Agente Antineoplásico Fotemustina e do Composto Mesoiónico MI-D sobre a Viabilidade das Células de Melanoma Murino B16-F10. (A) Fotemustina. (B) MI-D. Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de Azul de Trypan nos tempos e concentrações indicados, como descrito em Materiais e Métodos (item 5.4.). (n = 4). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (m  $\pm$  d.p). \*, p < 0,001.**

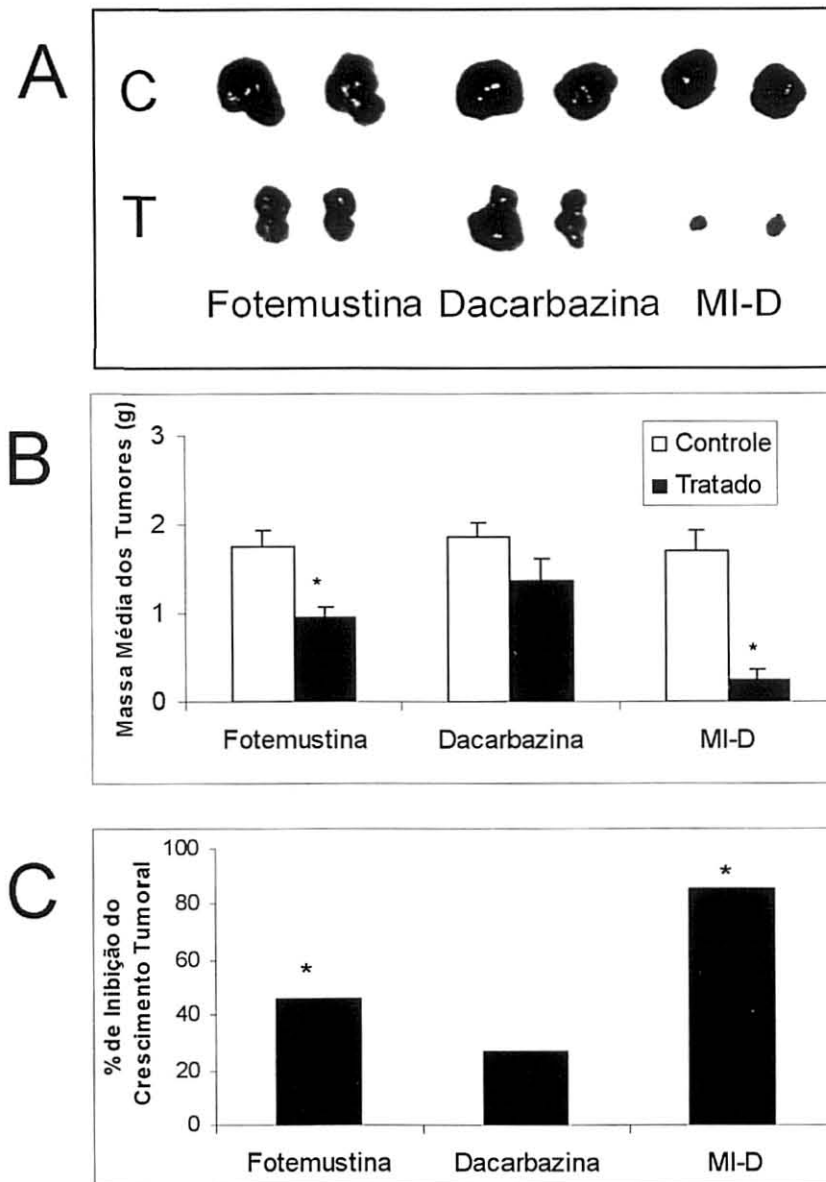


**FIGURA 17.** Efeito do Agente Antineoplásico Fotemustina e do Composto Mesoiónico MI-D sobre a Proliferação das Células de Melanoma Murino B16-F10. (A) Fotemustina. (B) MI-D. Proliferação celular avaliada pelo ensaio de MTT nos tempos e concentrações indicados, como descrito em Materiais e Métodos (item 5.5.). (n = 4). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (m  $\pm$  d.p). \*, p < 0,001.



Nesta série de experimentos foram necessários três controles, uma vez que cada droga apresentava um veículo diferente, isto é, óleo de girassol, para o MI-D; solução etanólica, para a fotemustina e solução aquosa contendo  $57 \mu\text{mol.kg}^{-1}$  de ácido cítrico e  $0,016 \mu\text{mol.kg}^{-1}$  de mannitol, para a dacarbazina. As drogas e os seus respectivos veículos foram inoculados via intraperitoneal 24 horas após a implantação das células B16-F10. O mesmo número de células B16-F10 ( $5 \times 10^5$ ) e a mesma dose de tratamento ( $57 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ ) foram utilizados para todas as substâncias estudadas. Após 17 dias da implantação das células os animais foram sacrificados os tumores extraídos, pesados e fotografados. A Figura 18 mostra os resultados referentes a um experimento representativo da inibição do crescimento tumoral *in vivo* com o composto mesoiônico MI-D e os agentes antineoplásicos fotemustina e dacarbazina. A foto mostrada na Figura 18A refere-se a tumores representativos do experimento. As massas médias dos tumores extraídos dos animais controles e tratados estão mostrados na Figura 18B. Quantitativamente, o percentual de inibição do crescimento tumoral, calculado como recomendado por BLASCHEK et al. (1992) e REN et al. (1995), foi de 85,15% para o MI-D, 46% para a fotemustina e 27 % para a dacarbazina (Figura 18C). Apesar da dacarbazina ter reproduzido uma tendência a inibição do tumor em torno de 30% nos 3 experimentos independentes, esta atividade não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

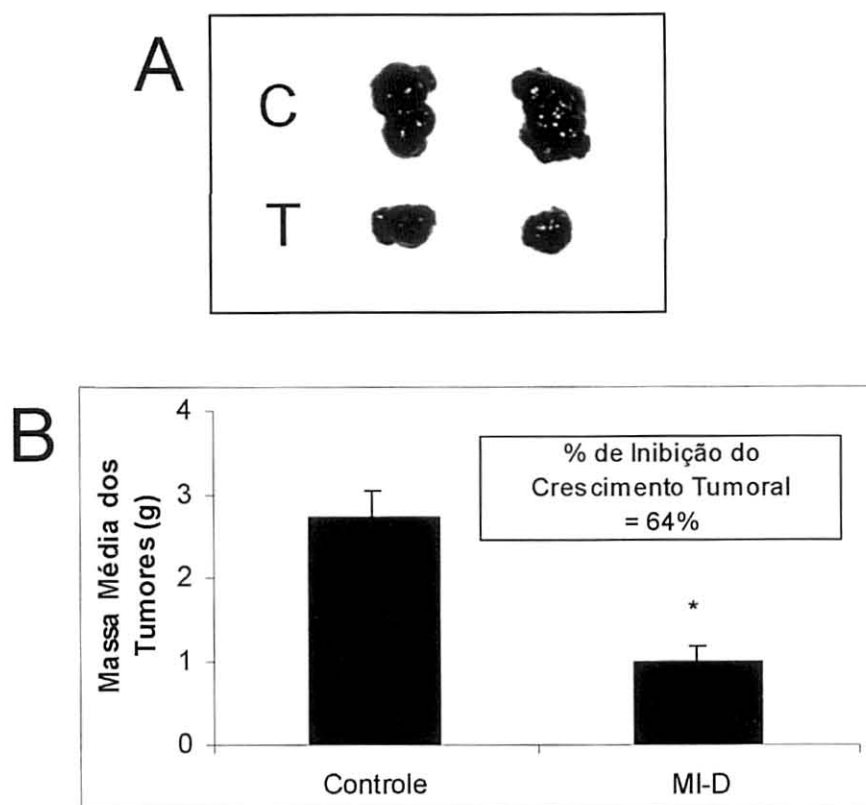
Considerando que o MI-D era administrado 24 h após a inoculação das células, a possibilidade do efeito ser devido à inibição da implantação das células de melanoma não pode ser excluída. Portanto, para avaliar se o MI-D era capaz de atuar também na inibição de um tumor já desenvolvido, um protocolo de tratamento onde o composto era administrado apenas no 8º dia após a inoculação das células foi realizado.



**FIGURA 18. Efeito *in vivo* do Composto Mesoiónico MI-D Comparado aos Efeitos dos Agentes Antineoplásicos— Fotemustina e Dacarbazina. (A)** Tumores representativos extraídos dos animais do grupo controle (C) e dos animais tratados (T). **(B)** Massas médias dos tumores. **(C)** % de inibição do crescimento tumoral. Células B16-F10 ( $5 \times 10^5$ ) foram injetadas por via subcutânea em camundongos C57BL/6. Uma única dose ( $57 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ ) do composto MI-D ou dos agentes antineoplásicos foi administrada por via intraperitoneal 24 h após a inoculação das células. O grupo controle recebeu o veículo da respectiva droga no mesmo volume utilizado para os animais tratados ( $100 \mu\text{L}$ ). Após 17 dias, os animais foram sacrificados e a massa dos tumores extraídos determinada, como descrito em Materiais e Métodos (item 5.7.). (MI-D,  $n = 5$ ; fotemustina,  $n = 7$ ; dacarbazina,  $n = 5$ ). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $m \pm e.p.m$ ). \*,  $p < 0,05$ .

Nestes experimentos onde foram avaliados os efeitos do MI-D em tumor já desenvolvido, as células B16-F10 ( $5 \times 10^5/200 \mu\text{L}$ ) foram inoculadas por via subcutânea na região subescapular direita dos animais. No dia 8 após a injeção de células foi iniciado o tratamento que consistiu de 3 doses de  $57 \mu\text{mol.kg}^{-1}$  com intervalos de 24 h, portanto os animais receberam  $57 \mu\text{mol.kg}^{-1}$  de MI-D nos dias 8, 9 e 10 após o início do experimento. Destaca-se que no oitavo dia os animais já apresentavam tumores visíveis e palpáveis ( $0,23\text{g} \pm 0,46$ , massa média dos tumores  $\pm$  e.p.m.; dado não mostrado). Os animais foram sacrificados no 17<sup>o</sup> dia, os tumores extraídos pesados e fotografados. O MI-D inibiu o crescimento tumoral significativamente ( $p < 0,05$ ) em 64% quando comparado com o controle. Na Figura 19 estão mostrados os resultados deste experimento: tumores representativos extraídos dos animais controles e tratados (Figura 19A), e seus pesos médios (Figura 19B).

O MI-D inibiu o crescimento do melanoma murino tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O composto MI-D foi efetivo não somente na inibição da implantação das células, mas também no crescimento de um tumor já desenvolvido. A dacarbazina e a fotemustina são consideradas as drogas mais ativas no tratamento do melanoma, a primeira apresentando uma taxa de resposta de 20% (HUNCHAREK et al., 2001) e a última é geralmente usada nos casos de melanoma disseminado com metástase cerebral, apresentando uma taxa de resposta de 24% (BOAZIZ, 1992). No presente trabalho, as duas drogas foram utilizadas como controles positivos e para efeito de comparação com o composto mesoiônico MI-D. Apesar de as drogas controles terem sido utilizadas em doses mais baixas do que as utilizadas nos protocolos clínicos (SLAPAK e KUFÉ, 1994), uma boa sensibilidade das células de melanoma



**FIGURA 19. Efeito do Composto Mesoioônico MI-D em Tumor Desenvolvido de 8 dias.** (A) Tumores representativos extraídos dos animais do grupo controle (C) e dos animais tratados (T). (B) Massas médias dos tumores e % de inibição do crescimento tumoral. Células B16-F10 ( $5 \times 10^5$ ) foram injetadas por via subcutânea em camundongos C57BL/6. Os animais receberam três doses ( $57 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ ) do composto MI-D por via intraperitoneal no 8º, 9º e 10º dia após a inoculação das células, em intervalos de 24 horas. O grupo controle recebeu o veículo da droga (óleo inerte) no mesmo volume ( $100 \mu\text{L}$ ) utilizado para os animais tratados. Após 17 dias, os animais foram sacrificados e a massa dos tumores extraídos determinada, como descrito em Materiais e Métodos (item 5.7.). ( $n = 5$ ). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $m \pm \text{e.p.m}$ ). \*,  $p < 0,05$ .

murino B16-F10 frente à fotemustina foi observada nos experimentos *in vivo*, os quais não corresponderam com os resultados dos ensaios *in vitro*.

Neste aspecto, HAYES et al. (1997) trabalhando *in vitro* com concentrações similares de fotemustina, mostrou uma dependência do tipo celular para o efeito final. As células humanas deficientes de capacidade de reparo por excisão do grupamento metil (Mer) mostraram-se mais susceptíveis à fotemustina. Portanto, a presença desta enzima de reparo nas células B16-F10 não pode ser descartada, o que explicaria a atividade relativamente baixa da fotemustina frente a estas células. A fotemustina administrada na concentração de  $57 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ , resultou em ~50% de inibição do crescimento tumoral. Uma vez que o MI-D na concentração de  $57 \mu\text{mol.kg}^{-1}$  causou 85% de inibição do crescimento tumoral (Figura 18), a dose necessária de MI-D para obter 50% do efeito é mais baixa, sugerindo que o composto mesoiônico é uma droga ativa e potente no modelo de melanoma utilizado. A inibição de crescimento de um tumor já desenvolvido também é um resultado muito importante para o MI-D, pois utilizado como único agente, o composto apresentou um resultado significativo na inibição do crescimento tumoral (64% - Figura 19). Os resultados de WACK et al. (2001), utilizando a dacarbazina e um modelo similar consistindo de células B16-FB17 (uma linhagem de crescimento lento), não mostraram redução do crescimento tumoral utilizando a concentração de  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  (equivalente a  $1,1 \text{ mmols.kg}^{-1}$ ), em tratamento de uma única dose administrada 7 dias após a inoculação das células, contudo, um protocolo utilizando múltiplas doses mostrou um efeito inibitório pronunciado. Porém, esta concentração é 20 vezes maior que a utilizada neste trabalho para o composto MI-D.

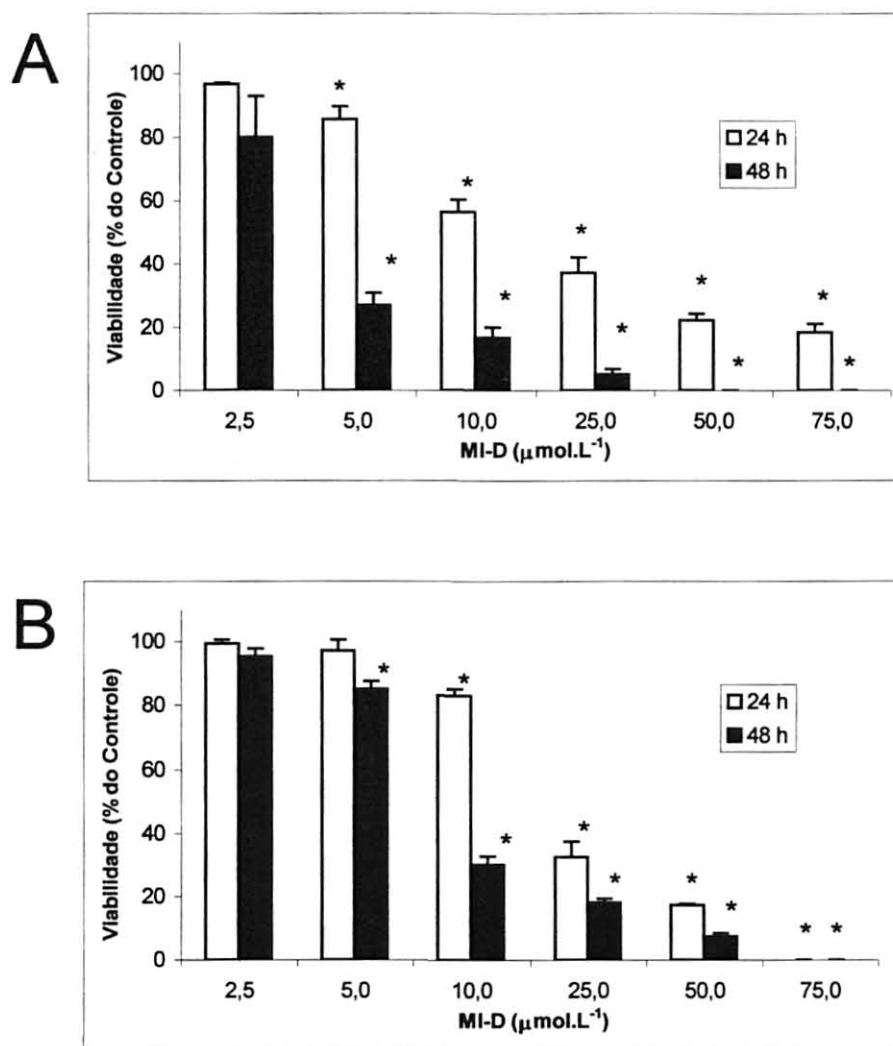
### 6.7. Efeito do MI-D na Viabilidade de Linhagens de Melanoma Humano

Tendo em vista os excelentes resultados do composto mesoiônico MI-D na atividade antitumoral nas células de melanoma murino e buscando validar este composto como um promissor quimioterápico para o tratamento do melanoma avaliamos a sua atividade *in vitro* em linhagens de melanoma humano. Foram utilizadas quatro linhagens: MEL-85, SK-MEL, A2058 e MEWO. Os resultados destes experimentos estão apresentados na Figura 20.

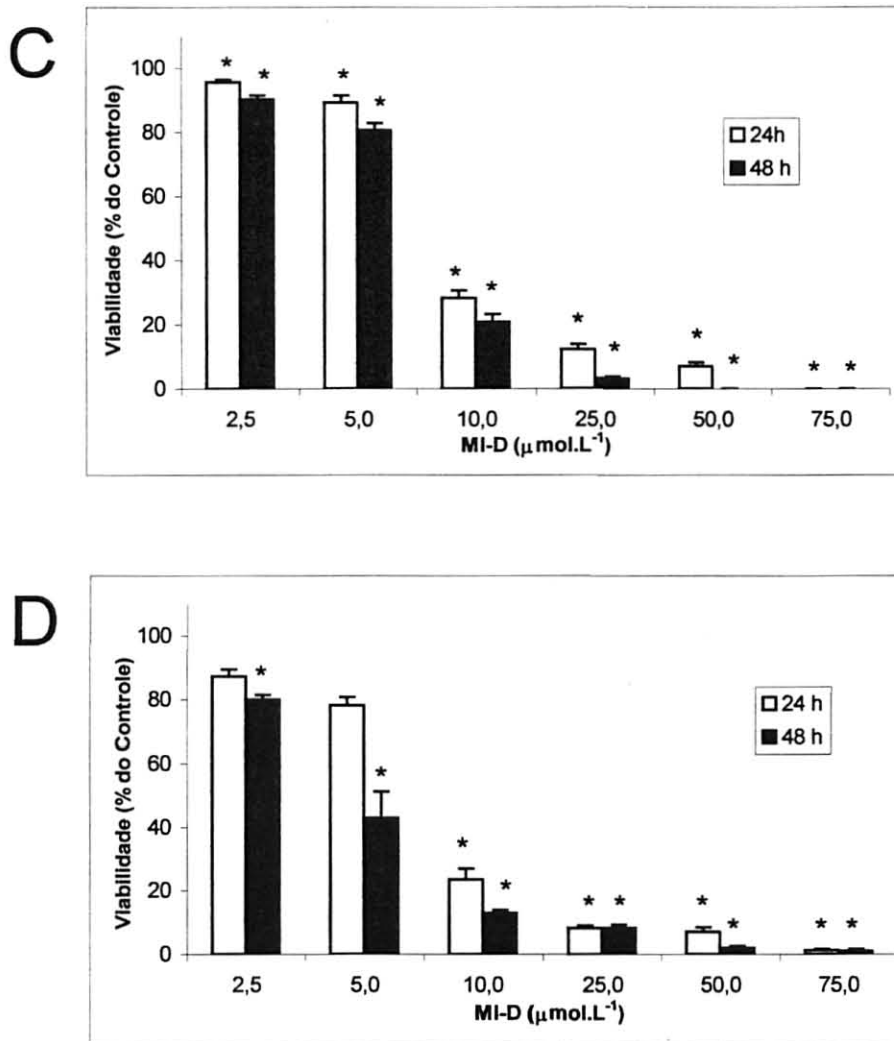
O composto mesoiônico MI-D é citotóxico para células MEL-85 (Figura 20A). Após 24 h de tratamento a concentração de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  reduziu a viabilidade a 56%; neste mesmo tempo, a concentração de  $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$  reduziu a viabilidade em 82%. Após 48 h de incubação, o efeito citotóxico máximo (100%) foi alcançado a partir da concentração de  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . A concentração de  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  reduziu o número de células viáveis em 73% após tratamento de 48 h.

As células de melanoma humano SK-MEL mostraram-se bastante susceptíveis ao tratamento com MI-D (Figura 20B). Após 24 h de tratamento, a concentração de  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  reduziu a viabilidade a 32%; enquanto  $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$  produziu 100% do efeito citotóxico. Com 48 h de incubação, o efeito de  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  aumentou, chegando a reduzir a viabilidade em mais de 80% e o efeito máximo alcançado com  $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em 24 h foi mantido. E a concentração de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  reduziu em 70% a viabilidade após 48 h de tratamento.

A viabilidade das células A2058 diminuiu em ~30% quando a concentração de MI-D foi de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e o tempo de incubação de 24 h (Figura 20C). Neste tempo, as concentrações de 25 e  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  reduziram o número de células viáveis para 12% e 7%, respectivamente. O tratamento de 48 h utilizando  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$

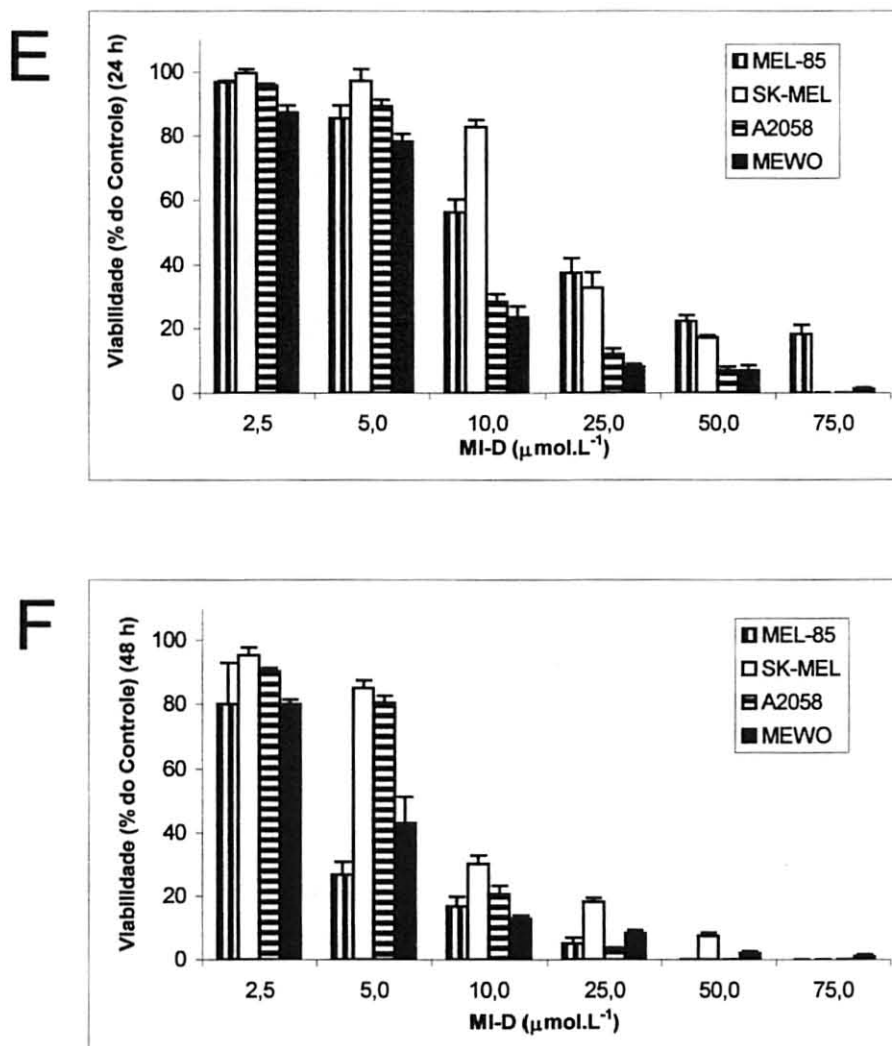


**FIGURA 20. Efeito do MI-D sobre a Viabilidade das Células de Melanoma Humano. (A) Células MEL-85. (B) Células SK-MEL.** Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de Azul de Trypan nos tempos e concentrações indicados, como descrito em Materiais e Métodos (item 5.4.). (n = 4). Resultados expressos como média ± desvio padrão (m ± d.p). \*, p < 0,001.



**FIGURA 20. Efeito do MI-D sobre a Viabilidade das Células de Melanoma Humano. (C) Células A2058. (D) Células MEWO.** Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de Azul de Trypan nos tempos e concentrações indicados, como descrito em Materiais e Métodos (item 5.4.). (n = 4). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (m  $\pm$  d.p). \*, p < 0,001.





**FIGURA 20. Efeito do MI-D sobre a Viabilidade das Células de Melanoma Humano. (E) Viabilidade celular após 24 h de incubação. (F) Viabilidade celular após 48 h de incubação. Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de Azul de Trypan nos tempos e concentrações indicados, como descrito em Materiais e Métodos (item 5.4.). (n = 4). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (m  $\pm$  d.p).**

reduziu a viabilidade para 20% e 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  quase alcançou o efeito citotóxico máximo (97%). Utilizando a concentração de 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  todas as células A2058 estavam mortas após 48 h.

As células MEWO também tiveram sua viabilidade reduzida com o tratamento com MI-D (Figura 20D). Após 24 h, 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de MI-D diminuíram a viabilidade para 23 e 8%, respectivamente. A concentração de 75  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  resultou em apenas ~1% de células viáveis depois de 24 h de tratamento. A incubação por 48 h utilizando 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  reduziu o número de células viáveis para 13% e as concentrações de 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e 75  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  provocaram 100% de morte celular.

Os efeitos do composto MI-D nas células de melanoma humano parecem ser ainda mais agressivos que aqueles observados para as células de melanoma murino B16-F10 (Figura 11D). Interessantemente, o MI-D em baixas concentrações (5,0  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) apresentou efeitos de diferentes magnitudes sobre a viabilidade das células de melanoma humano (Figuras 20E-F). Nestas condições, as linhagens MEL-85 e MEWO foram mais sensíveis ao MI-D que as linhagens SK-MEL e A2058. Os resultados de RODRIGUEZ-VICENTE et al. (1998) mostraram para as células SK-MEL um valor de  $DI_{50}$  para fotemustina, de 930  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  após 24 h de exposição a este quimioterápico, portanto os efeitos do MI-D ocorrem em concentrações muito inferiores as da fotemustina. A concentração que causa 100% do efeito citotóxico em condições experimentais similares (24 h) é 12x menor que a  $DI_{50}$  apresentada para a fotemustina.

### 6.8. Efeito do MI-D na Proliferação de Linhagens de Melanoma Humano

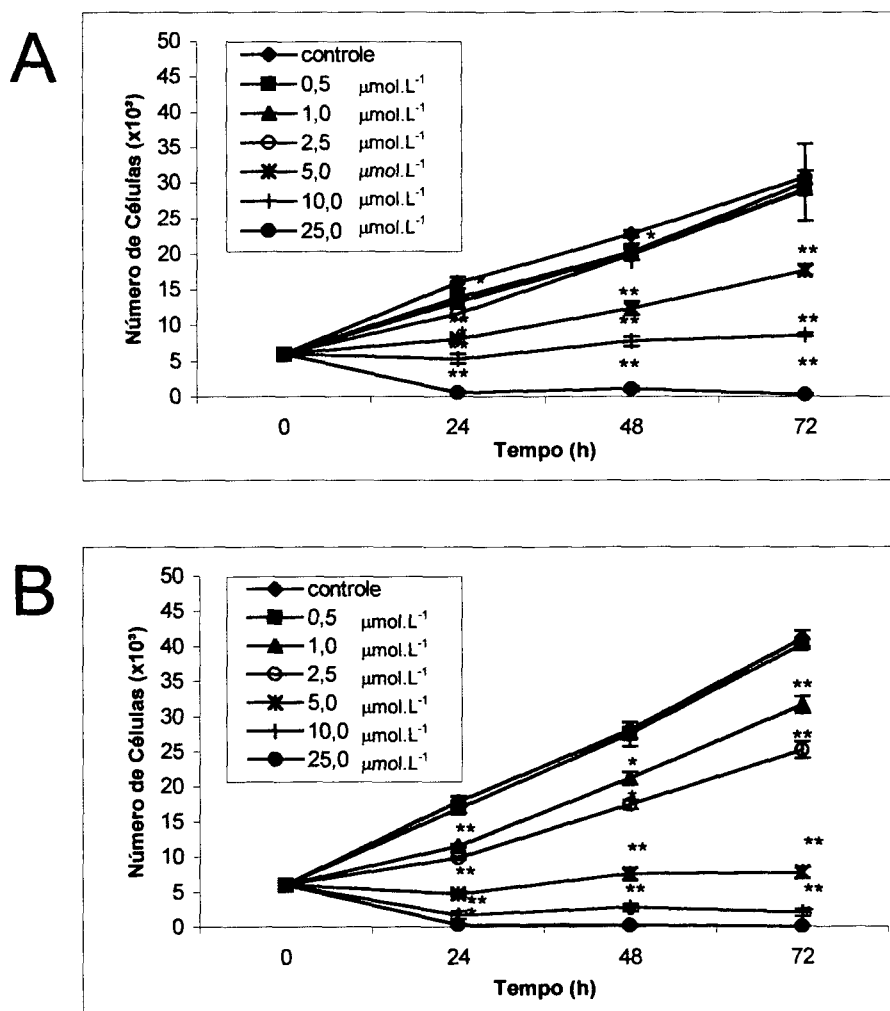
Os efeitos do MI-D no crescimento das células de melanoma humano foram avaliados utilizando uma curva de crescimento de 72 h. A proliferação das linhagens de melanoma humano foi substancialmente inibida pelo MI-D, mesmo quando concentrações subcitotóxicas ( $0,5 - 2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) foram utilizadas (Figura 21).

A proliferação das células MEL-85 foi inibida pelo composto mesoiônico MI-D, a concentração de  $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$  foi capaz de reduzir a proliferação em cerca de 50% ao longo de toda a curva (Figura 21A). Uma diminuição de 70% no número de células foi alcançada com tratamento utilizando  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de MI-D. Já a concentração de  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  inibiu completamente a proliferação celular.

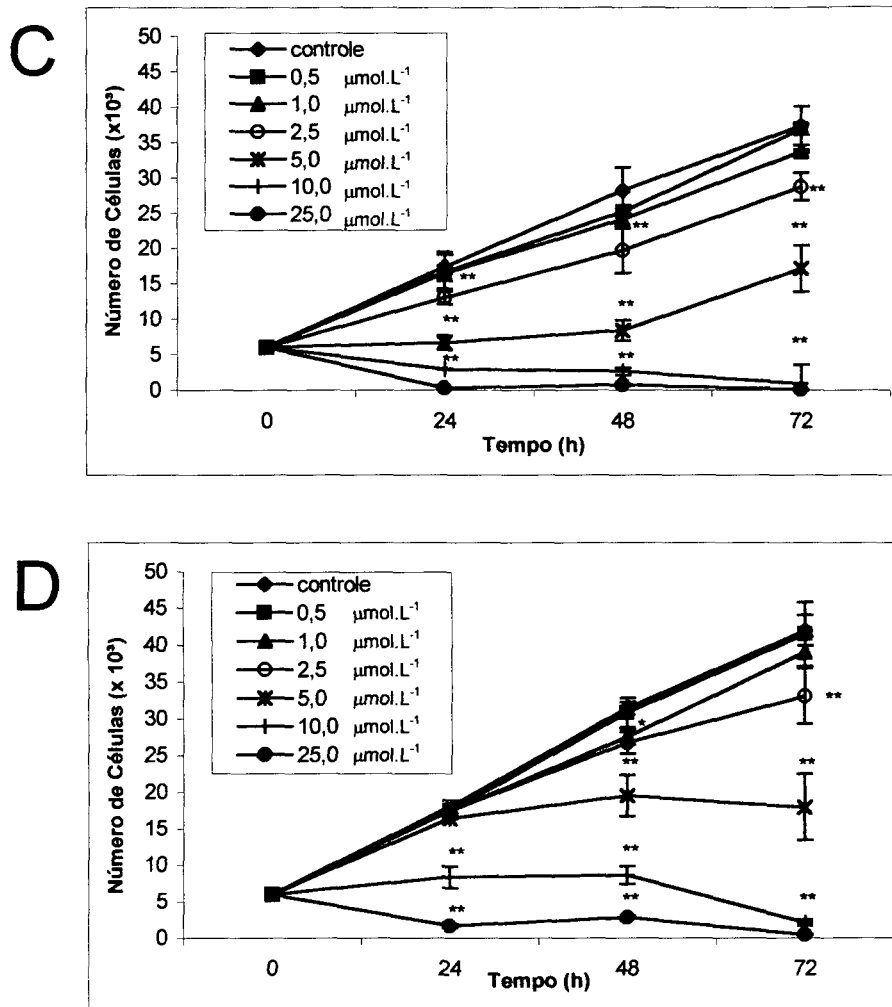
A concentração de  $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de MI-D inibiu totalmente a proliferação das células SK-MEL durante as 72 h (Figura 21B). Já a concentração de  $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  reduziu o número de células em cerca de 45% nos tempos de 24 h e 48 h, porém em 72 h a atividade antiproliferativa não foi mais estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

Os efeitos do composto mesoiônico MI-D foram bastante pronunciados na proliferação das células de melanoma humano A2058 (Figura 21C). A concentração de  $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  reduziu a proliferação em 70-77%. Quando a concentração de  $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$  foi utilizada, não foi observado crescimento celular até 48 h. Contudo, em 72 h ocorreu uma recuperação do crescimento celular e o número de células aumentou sendo de 46% do controle.

A proliferação das células MEWO foi inibida pelo MI-D, em baixas doses ( $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) foi observada uma diminuição de 25% no número de células em 48 e 72 h (Figura 21D). A concentração de  $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$  permitiu crescimento celular até apenas 24 h não havendo proliferação celular em 48 e 72 h.



**FIGURA 21. Efeito do MI-D sobre a Proliferação das Células de Melanoma Humano. (A) Células MEL-85. (B) Células SK-MEL. Proliferação celular avaliada pelo ensaio de MTT nos tempos e concentrações indicados, como descrito em Materiais e Métodos (item 5.5.). (n = 3). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (m  $\pm$  d.p). \*, p < 0,01; \*\*, p < 0,001.**



**FIGURA 21. Efeito do MI-D sobre a Proliferação das Células de Melanoma Humano. (C) Células A2058. (D) Células MEWO. Proliferação celular avaliada pelo ensaio de MTT nos tempos e concentrações indicados, como descrito em Materiais e Métodos (item 5.5.). (n = 3). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (m  $\pm$  d.p). \*, p < 0,01; \*\*, p < 0,001.**

Em todas as linhagens de melanoma humano estudadas a exposição às concentrações de 10 e 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de MI-D resultou em ausência de crescimento celular e/ou morte celular, confirmando os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular.

Observando os efeitos do MI-D na proliferação das células de melanoma humano, inibições de diferentes magnitudes podem ser verificadas. A concentração de 5,0  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  permitiu o crescimento da MEL-85 em uma taxa menor que as células controle, porém inibiu completamente o crescimento das células SK-MEL. Os efeitos do composto mesoiônico MI-D na viabilidade e na proliferação das células de melanoma humano indicam que esta droga é bastante tóxica para células humanas. Considerando que a linhagem MEL-85 foi a que se mostrou mais sensível aos efeitos do MI-D, os estudos prosseguiram com esta linhagem.

### **6.9. Efeitos do MI-D na Adesão das Células MEL-85 à Laminina, Fibronectina e Matrigel**

As células de melanoma expressam todos os principais grupos de receptores de adesão: integrinas, caderinas e moléculas de adesão celular da família das imunoglobulinas (HERLYN e SATYAMOORTHY, 2001). Da mesma forma em que o fenótipo maligno das células de melanoma muda da fase de crescimento radial (FCR) não invasiva para a fase de crescimento vertical (FCV), que possui um alto potencial metastático, também ocorrem mudanças no repertório das moléculas de adesão expressas na superfície celular (McGARY et al., 2002). A expressão da maioria das moléculas de adesão aumenta durante a progressão do melanoma. Entre os receptores que têm sua expressão aumentada estão as integrinas  $\alpha_2\beta_1$ ,

$\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_v\beta_3$ , já a integrina  $\alpha_5\beta_1$  não apresenta alterações nos seus níveis de expressão (HERLYN e SATYAMOORTHY, 2001). As moléculas de adesão participam tanto da adesão homotípica quanto da adesão heterotípica entre as células de melanoma e as células endoteliais, respectivamente. Ambos os tipos de adesão estão envolvidos na promoção de metástases em diferentes estágios do processo (McGARY et al., 2002). Durante a progressão do melanoma, a perda da expressão da E-caderina rompe a homeostase da pele liberando as células de melanoma da regulação estrutural e funcional exercida pelos queratinócitos. Paralelamente à perda da E-caderina, ocorre a expressão da N-caderina que participa da interação homotípica entre as células de melanoma, facilita a formação de junções com fibroblastos e células endoteliais e promove a migração e a sobrevivência das células de melanoma (HERLYN e SATYAMOORTHY, 2001; McGARY et al., 2002). Além da perda da E-caderina, algumas integrinas também têm suas expressões diminuídas, como é o caso da  $\alpha_v\beta_5$  e  $\alpha_6\beta_1$  (HERLYN e SATYAMOORTHY, 2001). A adesão de células neoplásicas aos componentes da matriz extracelular (MEC) é uma etapa fundamental no desenvolvimento tumoral e está especialmente envolvida nos processos de invasão e formação de metástases (MISHIMA et al., 1998). As integrinas reconhecem nas proteínas da MEC o peptídeo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) como sítio de ligação relacionado aos fenômenos de adesão celular. A sequência RGD está presente na fibronectina, no fibrinogênio, na vitronectina, na laminina e no colágeno tipo I, além de várias outras moléculas da MEC (RUOSLAHTI e PIERSCHBATER, 1987; HYNES, 1992). Porém, no caso do reconhecimento da laminina, o peptídeo RGD parece não estar envolvido na interação desta com as integrinas (ALBEDA e BUCK, 1990; HUMPHRIES, 1990;).

Os principais receptores da molécula de laminina são as integrinas  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_4$  e  $\alpha_7\beta_1$  (KÜHN e EBLE, 1994). A interação laminina-integrina em células aderentes é também dependente de receptores não-integrínicos, que parecem complementar os eventos disparados pelas integrinas, funcionando como co-receptores (VEIGA et al., 1995). Para a fibronectina, os principal receptor envolvido na tumorigênese e processos de metástase é a integrina  $\alpha_5\beta_1$ , visto que a modulação dos níveis desta integrina suprime a invasão das células tumorais em modelos de melanoma, osteossarcoma e glioblastoma (RUOSLAHTI, 1992). Além da integrina  $\alpha_5\beta_1$ , as integrinas  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_{IIb}\beta_3$  também são receptores da molécula de fibronectina (KÜHN e EBLE, 1994).

A adesão das células de melanoma humano MEL-85 aos componentes da matriz extracelular (MEC) foi avaliada utilizando como substratos laminina, fibronectina e matrigel (Figura 22). Apesar de as concentrações de  $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de MI-D provocarem uma aparente diminuição da adesão celular, estes valores não foram significativamente ( $p > 0,05$ ) diferentes do controle. Concentrações superiores ( $2,5$  e  $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) de MI-D inibiram significativamente ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ) a adesão aos componentes da MEC de maneira dependente da concentração. A adesão das células MEL-85 em laminina e fibronectina foi reduzida durante a exposição a  $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de MI-D por 2 h para 70% e 55%, respectivamente. A concentração de  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  diminui a adesão à laminina para ~65% e à fibronectina e ao matrigel para 34% e 71%, respectivamente. O composto MI-D não apenas reduziu o número de células aderidas ao substrato protéico, mas também alterou a morfologia das células MEL-85, as quais reduziram seu tamanho e

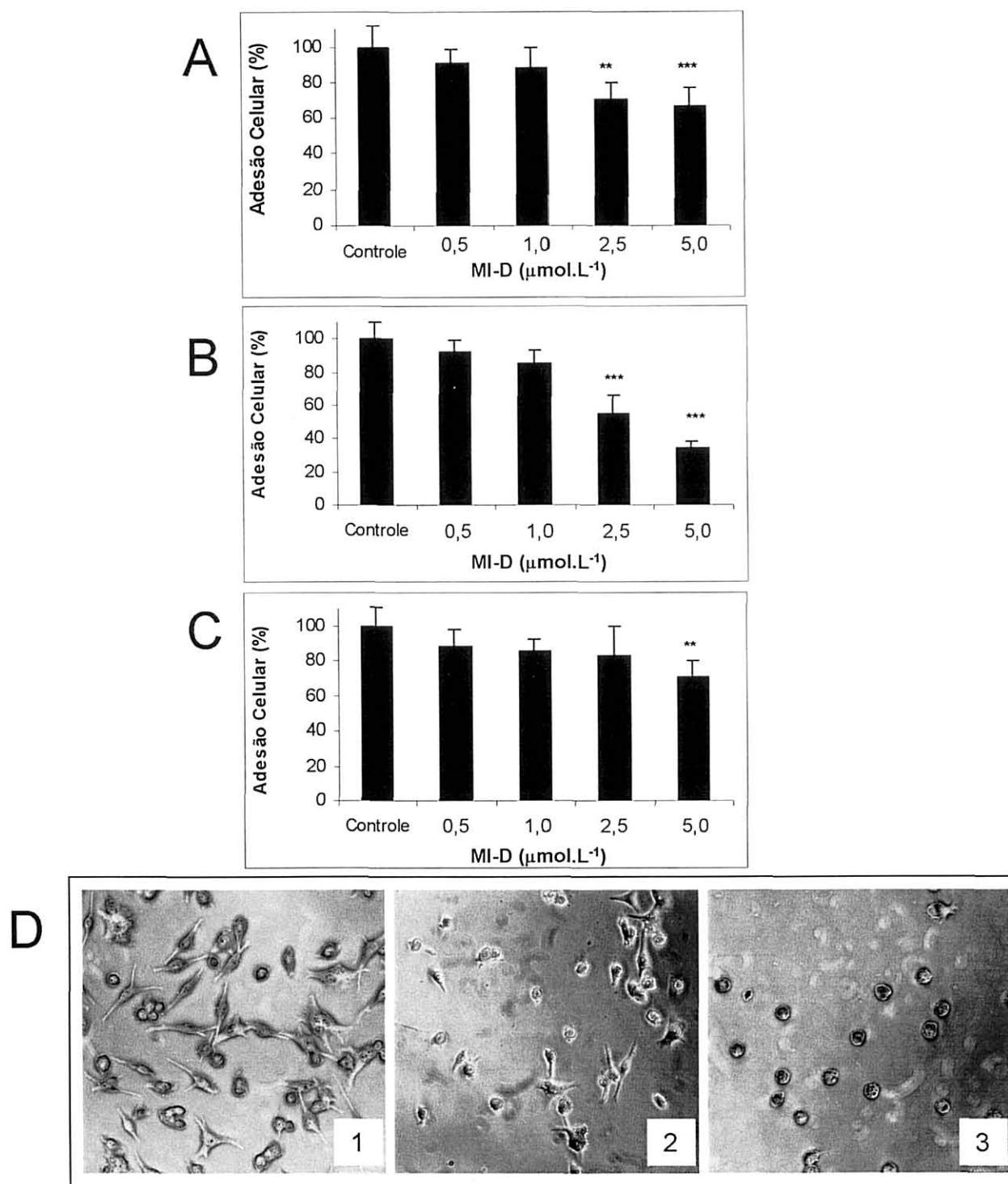


tornaram-se redondas (Figura 22D). Estes efeitos na morfologia celular foram observados frente aos três componentes da MEC utilizados.

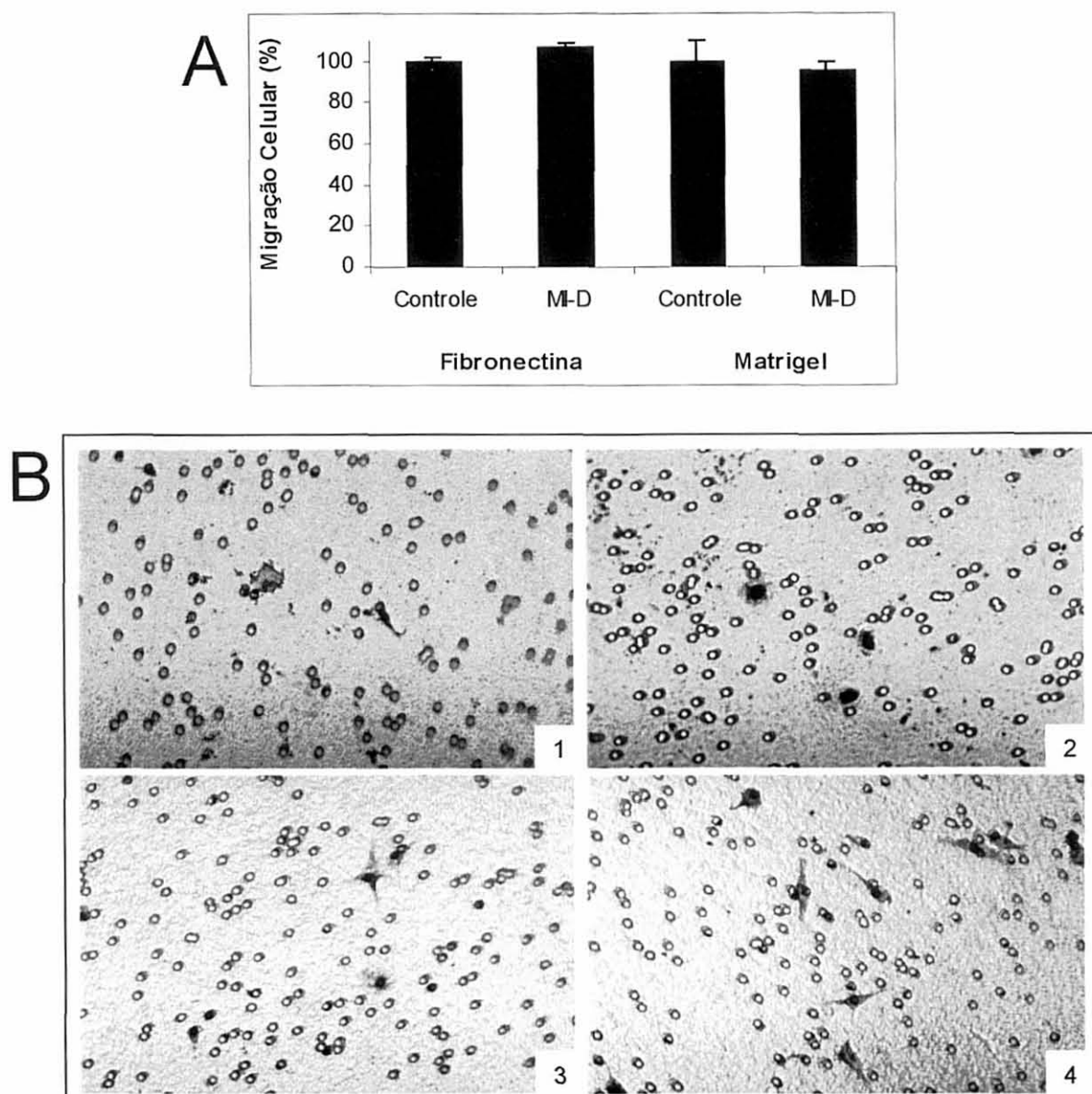
Uma vez que a adesão celular aos componentes da MEC está envolvida com os processos de progressão tumoral (MISHIMA et al., 1998), os efeitos do MI-D sobre este aspecto celular são muito importantes. Baixas doses de MI-D foram utilizadas visando minimizar os seus efeitos metabólicos e, portanto, a droga foi utilizada em concentrações subcitotóxicas para sua avaliação sobre a adesão celular às moléculas da MEC. O MI-D na concentração de  $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$  causa uma discreta diminuição de  $\sim 5\%$  na viabilidade das células MEL-85 após 2 h de tratamento. Nestas condições experimentais, o MI-D inibiu a adesão celular quando incubado com as células por 2 h. A análise das imagens do experimento mostra que o MI-D promoveu alterações significativas na morfologia das células, sugerindo uma possível ação do MI-D na organização do citoesqueleto.

#### **6.10. Efeitos do MI-D na Migração das Células MEL-85**

Os efeitos do MI-D na migração celular foram estudados utilizando ensaio de migração haptotática para fibronectina e matrigel durante 4 h na presença do composto ( $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) (Figura 23). Esta concentração não ocasiona nenhum efeito na viabilidade destas células, como pode ser observado no ensaio de viabilidade celular (Figura 20). Esta concentração subcitotóxica de MI-D não teve efeito na migração das células MEL-85 em nenhum dos substratos protéicos utilizados. Esta ausência de efeito sobre o perfil migratório das células MEL-85 é provavelmente devido à concentração utilizada ser muito baixa ( $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ).



**FIGURA 22. Efeito do MI-D sobre a Adesão das Células de Melanoma Humano MEL-85. (A) Adesão à laminina. (B) Adesão à fibronectina. (C) Adesão à matrigel. (D) Micrografias das células MEL-85 após ensaio de adesão em fibronectina (1) Controle, (2) MEL-85 tratada com MI-D 2,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e (3) MEL-85 tratada com MI-D 5,0  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Adesão celular avaliada pelo ensaio de cristal violeta nas concentrações indicadas e tempo de 2 h, como descrito em Materiais e Métodos (item 5.8.). (n = 3). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (m  $\pm$  d.p). \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001.**



**FIGURA 23. Efeito do MI-D sobre a Migração das Células de Melanoma Humano MEL-85. (A)** Migração celular em presença de MI-D  $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  utilizando fibronectina e matrigel. **(B)** Micrografia mostrando células que migraram (200x). (1) Controle, (2) MEL-85 tratada com MI-D  $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  que migraram em fibronectina; (3) Controle e (4) MEL-85 tratada com MI-D  $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  que migraram em matrigel. As membranas ( $0,8 \mu\text{m}$ ) das placas de transwell foram sensibilizadas com  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de fibronectina ou matrigel. As células MEL-85 ( $5 \times 10^5$ ) foram adicionadas ao poço superior e as placas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 4 h. As células foram fixadas e coradas, o corante eluído e a absorbância medida em 595 nm, como descrito em Materiais e Métodos (item 5.9.). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $m \pm d.p$ ).

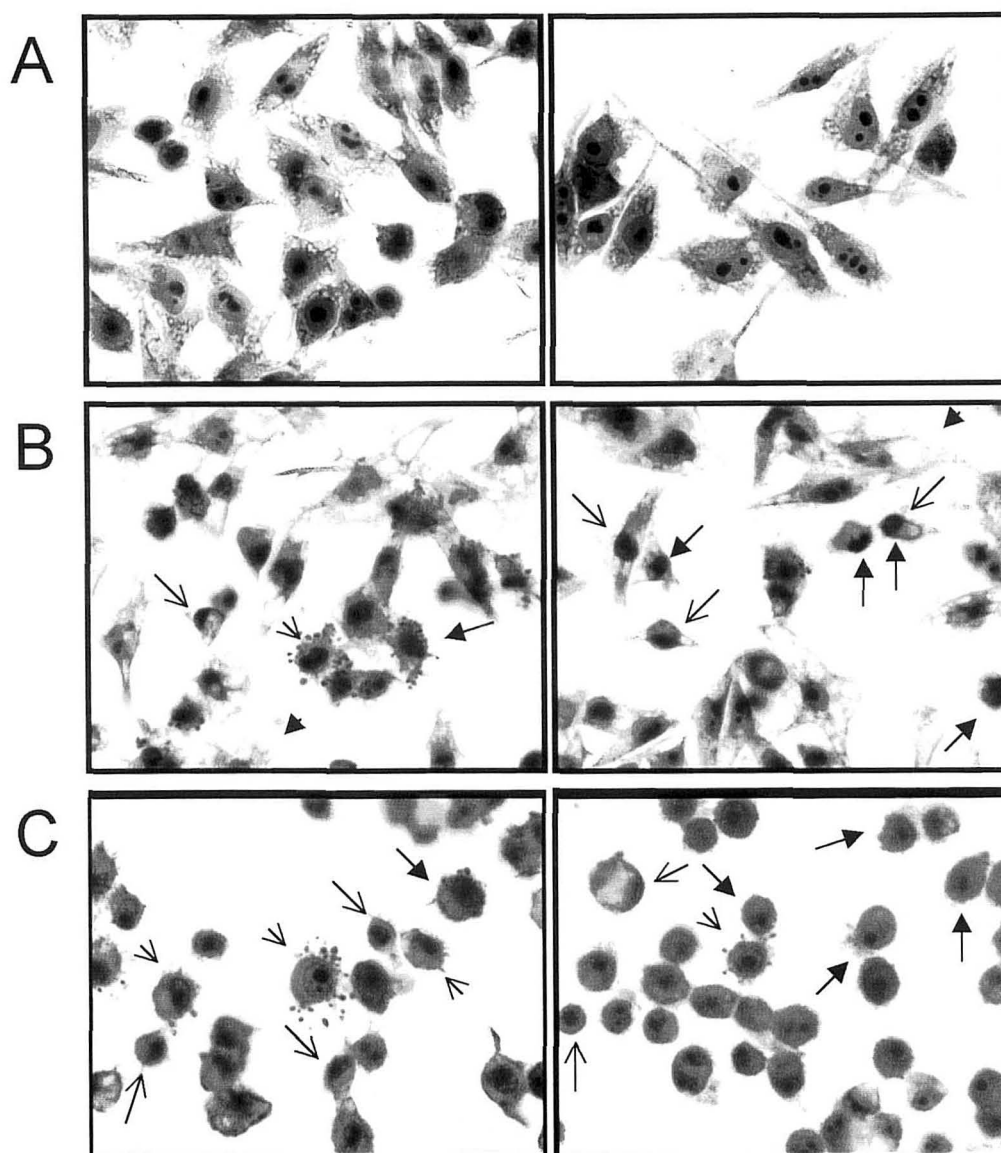
### **6.11. Efeitos do MI-D na Morfologia das Células MEL-85**

Os resultados do experimento de adesão celular (Figura 22) sugeriram que o MI-D poderia promover danos na morfologia celular e organização do citoesqueleto. Com a finalidade de avaliar os efeitos do MI-D sobre a morfologia celular, as células MEL-85 foram incubadas com 25 e 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de MI-D por 2 h e, posteriormente, coradas por Giemsa. Os resultados destes experimentos (micrografias) estão apresentados na Figura 24. Nas células tratadas pode-se observar a retração do citoplasma, com a morfologia celular se tornando arredondada (Figura 24B e 24C) quando comparadas com as células controle (Figura 24A). Tal efeito do MI-D já havia sido observado nos ensaios de adesão celular (Figura 22D). O tratamento com MI-D na concentração de 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  resultou em diminuição do tamanho das de algumas células e grande vacuolização do seu citoplasma. A concentração de 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  afetou a morfologia da maioria das células que adquiriram a forma arredondada. Compactação da cromatina e protusões (“blebs”) da superfície da membrana celular foram também observadas nas células tratadas.

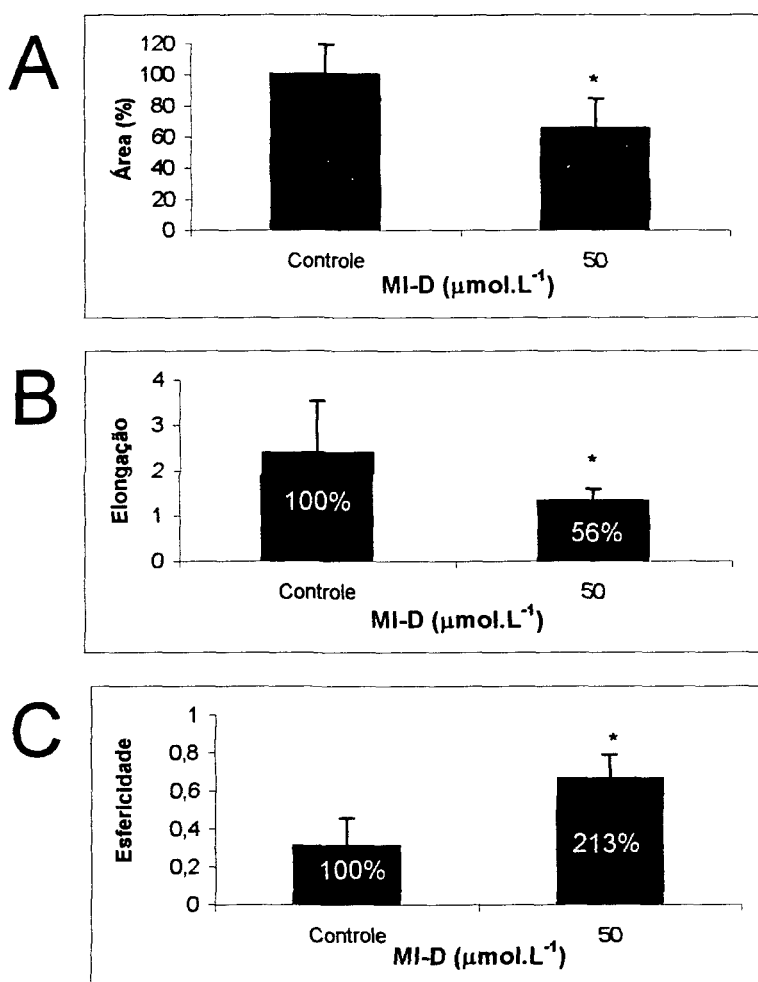
A análise morfométrica, mostrada na Figura 25, permitiu a quantificação das alterações morfológicas e mostrou uma redução de 35% da área celular das células tratadas com 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de MI-D. (Figura 25A). Esta concentração reduziu a alongação celular a 56% (Figura 25B) e aumentou a esfericidade em 112% (Figura 25C). Os resultados obtidos indicam uma possível ação do MI-D na organização do citoesqueleto destas células.

## 6.12. Efeitos do MI-D na Organização do Citoesqueleto de Actina das Células MEL-85

Com a finalidade de avaliar se as modificações da forma celular eram devidas a alterações na organização do citoesqueleto foi realizado um estudo da organização das fibras de actina utilizando uma marcação fluorescente. A toxina proveniente do fungo *Amanita phalloides*, faloidina, que se liga especificamente às fibras de F-actina (LÖW e WIELAND, 1974), foi utilizada conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Os resultados mostrados na Figura 26 indicam que a organização do citoesqueleto de actina foi completamente alterada pelo tratamento com  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de MI-D. A marcação fluorescente (verde) das células MEL-85 tratadas com MI-D (Figuras 26 E-H) não apresenta o padrão de rede que pode ser observado nas células controle (Figuras 26 A-D). De fato, o tratamento com MI-D induziu uma reorganização da arquitetura do citoesqueleto de actina, os quais adquiriram a forma de grânulos, localizados principalmente abaixo das membranas das células. Estas informações confirmaram as observações dos experimentos de adesão e morfologia, que mostravam uma acentuada mudança na forma das células tratadas com MI-D. Características como a perda da forma celular acompanhada pela diminuição do tamanho das células, protusões (“blebs”) nas membranas e condensação da cromatina, além dos distúrbios na organização do citoesqueleto, são geralmente observados nas células apoptóticas (HENGARTNER, 2000). A possibilidade de o MI-D atuar como um agente indutor de apoptose foi também descrita por CADENA (1999), em estudos utilizando células HeLa. Segundo a autora, as células HeLa também sofrem alterações de forma sob o efeito do MI-D.

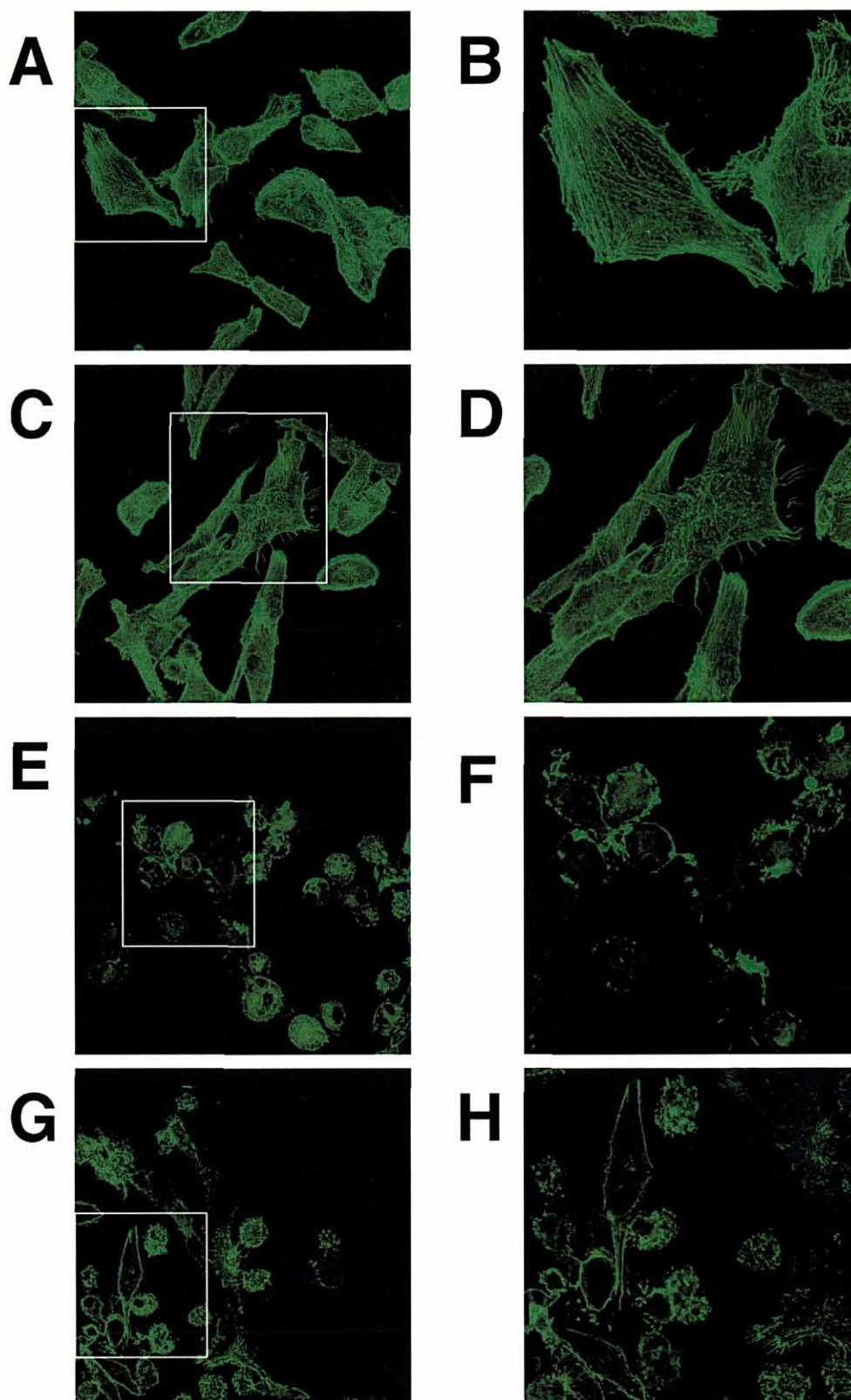


**FIGURA 24. Efeitos do MI-D na Morfologia das Células de Melanoma Humano MEL-85. (A)** Micrografias das células controle. **(B)** Micrografias das células tratadas com MI-D  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . **(C)** Micrografias das células tratadas com MI-D  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . As células MEL-85 foram tratadas por 2 h, fixadas e coradas com Giemsa, como descrito em Materiais e Métodos (item 5.10.). As amostras foram observadas utilizando microscópio óptico (Olympus BX40). Flexa fechada ( $\rightarrow$ ): diminuição do tamanho celular. Cabeça de flexa fechada ( $\blacktriangleright$ ): vacuolização do citoplasma. Flexa aberta ( $\rightarrow$ ): condensação da cromatina. Cabeça de flexa aberta ( $\rightarrow$ ): formação de protusões (“blebs”) nas membranas (400x).



**FIGURA 25. Dados da Análise Morfométrica das Células de Melanoma Humano MEL-85 tratadas com MI-D. (A) Análise da área celular. (B) Análise da elongação celular. (C) Análise da esfericidade celular.** Para estas análises foi utilizado o software ImageTool versão 3.00 e cerca de 400 células foram analisadas, como descrito em Materiais e Métodos (item 5.10.). A área das células foi medida como o número de pixels do polígono e posteriormente, este valor foi convertido para %. A elongação foi calculada como a razão entre o comprimento do eixo maior e o comprimento do eixo menor. O resultado é um valor maior ou igual a 1; se o resultado for igual a 1, o objeto é totalmente circular ou um quadrado e quanto maior que 1, mais alongado é o objeto. A esfericidade foi calculada como:  $(4 \times \pi \times \text{área})/\text{perímetro}^2$ . O resultado é um valor entre 0 e 1. Quanto mais próximo de 1, mais próximo de um círculo perfeito é o objeto e quanto mais distante de 1, mais distante de uma forma circular está o objeto. \*,  $p < 0,001$ .





**FIGURA 26. Efeitos do MI-D na Organização do Citoesqueleto de Actina das Células de Melanoma Humano MEL-85. (A-D) Micrografias das células controles (600x). (B e D) Células controle em maior aumento mostrando detalhes da organização do citoesqueleto de F-actina (1450x). (E-H) Micrografias das células tratadas com MI-D  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (600x). (F-H) Células tratadas com MI-D  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em maior aumento, mostrando alterações na organização das moléculas de actina, que encontram-se concentradas nas margens das células e apresentam aspecto granular (1200x). As células MEL-85 foram tratadas com MI-D, fixadas e marcadas com faloidina-FITC (verde) e observadas em microscópio confocal de fluorescência (Nikon Eclipse 800), como descrito em Materiais e Métodos (item 5.11.).**



## 7. DISCUSSÃO FINAL

Neste trabalho foram utilizadas células B16-F10, um modelo de melanoma murino para o estudo de novas drogas com ação antimelanoma. Embora os modelos murinos não possam ser diretamente extrapolados para seres humanos, a oncologia atual em grande parte baseia-se no conhecimento obtido com tais modelos. De fato, muitos trabalhos têm sido publicados mostrando interessantes resultados pré-clínicos em que os modelos murinos foram utilizados e, estes trabalhos muitas vezes tornam-se base para o estabelecimento de parâmetros que norteiam a quimioterapia atual. Modelos experimentais que mimetizem completamente a realidade clínica para o estudo de novas terapias são raros. Dados obtidos com linhagens de melanoma humano complementam as informações obtidas com o modelo murino e, algumas destas linhagens foram também utilizadas no presente trabalho, ampliando o potencial de alcance dos estudos desenvolvidos.

Entre os compostos da série 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos estudados – MI-D, MI-J, MI-4F e MI-2,4diF- o primeiro, cujo substituinte é o grupo  $-\text{NO}_2$ , foi o que apresentou melhor efetividade para as células de melanoma B16-F10. Isto muito provavelmente deve-se ao fato de o grupamento nitro ser, dentre os estudados o mais polar, e portanto possuir uma maior capacidade de deslocar a carga do composto heterocíclico, aumentando a possibilidade de interações eletrostáticas com biomoléculas como o DNA e proteínas (GRYNBERG et al., 1997). Pode-se sugerir que o favorecimento da conjugação do radical cinamoil com a porção exocíclica, desencadeado pela forte natureza atratora de elétrons do substituinte (DOS SANTOS e ECHEVARRIA, 2001) está envolvido com a atividade antimelanoma desta série de compostos 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos estudada.

Os resultados que permitem afirmar que o substituinte NO<sub>2</sub> proporcionou melhor efetividade são a diminuição da viabilidade e da proliferação celular em baixas doses de MI-D e a inibição do desenvolvimento dos tumores murinos tanto na sua forma intraperitoneal quanto na forma subcutânea, os quais foram resultantes do impedimento do estabelecimento do tumor ou da regressão de massas tumorais já instaladas.

Em relação à diminuição da proliferação celular, parâmetro que neste trabalho foi avaliado utilizando-se o MTT como uma ferramenta de análise, uma questão a ser discutida refere-se à possibilidade do MI-D interferir na atividade da enzima succinato desidrogenase e então impedir a redução do MTT, mascarando os resultados. Esta enzima foi considerada importante, pois segundo MOSMANN (1983) e MAGAUD et al. (1998), a redução do MTT ocorreria por uma reação enzimática envolvendo a oxidação de equivalentes redutores catalisada pela succinato-tetrazólio redutase – complexo II da cadeia respiratória mitocondrial-, que inclui a succinato desidrogenase e que só estaria ativa nas células viáveis. Porém, estudos mais recentes (BERRIDGE et al., 1996) sugerem que grande parte da redução celular do MTT ocorre no citoplasma, com o envolvimento do NADH e NADPH e, portanto, o ensaio de MTT não pode mais ser considerado um ensaio estritamente mitocondrial. Além disso, experimentos realizados em nosso laboratório (CADENA et al., 1998; CADENA, 1999) com mitocôndrias hepáticas isoladas mostraram que o MI-D pouco afeta a succinato desidrogenase, sendo seus maiores efeitos relacionados ao desacoplamento da organela e alterações na fluidez de membranas (CADENA et al., 2002). Portanto, o decréscimo observado corresponde de fato à diminuição do número de células e não em consequência de eventual inibição da succinato desidrogenase.

Em adição aos efeitos citotóxico e inibidor da proliferação, o MI-D também interfere em outros aspectos envolvidos no desenvolvimento tumoral, como a adesão às moléculas da matriz extracelular e a organização do citoesqueleto. Foi demonstrado neste trabalho que o MI-D inibe a interação das células à matriz de laminina e de fibronectina, além do matrigel. Porém, se esta inibição da adesão celular ocorre de forma específica em determinados receptores ou ainda sobre sítios específicos dos receptores, são aspectos a serem esclarecidos, ficando em aberto como possibilidade de investigação futura. Vale lembrar que a adesão celular aos componentes da matriz extracelular (MEC) está intimamente envolvida com os processos de desenvolvimento tumoral (MISHIMA et al., 1998). Nas condições experimentais deste trabalho, baixas doses de MI-D ( $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) não interferiram nos ensaios de migração celular. Considerando que o uso de doses superiores seriam incompatíveis com a adequada avaliação deste parâmetro posto que a droga leva à morte celular, esta é uma questão que ainda não está convenientemente avaliada. De fato, a realização de experimentos *in vivo*, visando observar a inibição do aparecimento de metástases é necessária, a fim de esclarecer se o MI-D poderia inibir a migração celular.

Embora a hipótese de que o MI-D possa causar efeitos sobre sítios específicos de receptores das proteínas da matriz extracelular seja atrativa, existem várias outras possibilidades que não podem ser descartadas quando se considera os efeitos já conhecidos para esta droga.

Como já comentado anteriormente, o MI-D é um desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial (CADENA et al., 1998), cujos efeitos nas membranas é reconhecido (CADENA et al., 2002). Sua ação em membranas poderia por exemplo desorganizar os sítios de reconhecimento posto que a conformação das proteínas

de membrana é altamente dependente de sua organização e fluidez (LOPEZ e KOSK-KOSIKA, 1997). Em relação ao efeito desacoplador, de acordo com SKULACHEV et al. (1998) e outros (COLOMBO et al., 2001), em alguns casos uma atividade desacopladora poderia explicar o efeito terapêutico de uma droga. Isto parece ser correto para a atividade antitumoral do carbonilcianida *m*-clorofenilhidrazona (CCCP) (NEWELL e TANNOCK, 1989) e outras drogas anticancer (KELLER et al., 1992). A exemplo do que ocorre com muitas drogas conhecidas, as quais afetam as mitocôndrias (SUSIN et al., 1998; COLOMBO et al., 2001), a indução da apoptose poderia ser uma consequência da ação citotóxica do MI-D. Os efeitos do MI-D nas células MEL-85, promovendo alterações na morfologia celular e na organização do citoesqueleto, sugerem uma indução da apoptose, pois características como perda da forma celular acompanhada pela diminuição do tamanho das células, protusões (“blebs”) nas membranas e condensação da cromatina, além de distúrbios na organização do citoesqueleto, são geralmente observados em células em processo de apoptose (HENGARTNER, 2000). Este efeito é altamente desejável para uma droga pois facilitando a indução da morte celular, superam a resistência à apoptose exibida pelas células tumorais (SUSIN et al., 1998). A liberação do citocromo c da mitocôndria é uma etapa envolvida no processo de apoptose. Infelizmente, os experimentos conduzidos em citometria de fluxo e “imuno-bloting” (dados não mostrados) embora sugerissem que isto estava ocorrendo, não foram conclusivos. Problemas na sensibilidade do método de detecção da molécula de citocromo c e a interferência da auto-fluorescência do composto MI-D na faixa de análise da citometria de fluxo impediram análises conclusivas deste efeito do MI-D em células de melanoma murino. Por outro lado,

CADENA (1999) mostrou que o composto MI-D é um agente indutor de apoptose em células HeLa.

Aparentemente os efeitos do MI-D diferem fundamentalmente daqueles descritos para os dois quimioterápicos, dacarbazina e fotemustina, utilizados como controle de efeito positivo e para comparação. A cloronitrosouréia fotemustina e a dacarbazina têm como mecanismo de ação a alquilação do DNA das células, inibindo a síntese de DNA pela formação de ligações covalentes com os ácidos nucléicos, causando uma subsequente quebra da cadeia de DNA e posterior morte celular (HAYES et al., 1997; SLAPAK e KUFÉ, 1994; COLOMBO et al., 2001). Alguns agentes antineoplásicos exercem seus efeitos através da modulação dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial e, portanto afetam as vias de transporte e dependentes de energia nas células neoplásicas, resultando em citotoxicidade (COLOMBO et al., 2001; MARTIN et al., 2000; WADHWA et al., 2000). Embora experimentos específicos de transição de permeabilidade mitocondrial para avaliar o efeito do MI-D neste importante parâmetro ainda não tenham sido realizados, esta é também uma possibilidade que não pode ser descartada.

Resultados descritos por CARDOSO (2000) em nosso laboratório mostram que o MI-D compartilha certas propriedades com drogas antiinflamatórias. De fato, o composto MI-D também é um inibidor da ciclooxigenase-2 (COX-2) (dados ainda não publicados). Recentemente, foi demonstrado que a COX-2 é expressa constitutivamente em melanomas humanos e que esta expressão poderia estar envolvida na regulação da invasividade do melanoma (DENKERT et al., 2001; KAKIUCHI et al., 2002). A COX-2 tem sido descrita como um marcador tumoral para o melanoma, apresentando potencial de aplicação na terapêutica dirigida (NETTELBECK et al., 2003; DUFF et al., 2003). Além disso, inibidores da COX-2

parecem diminuir a expressão de algumas moléculas de adesão, como aquelas envolvidas na adesão dos leucócitos durante as respostas imunológica e inflamatória (SAKAI, 1996; GOMES-GAVIRO et al., 2002), portanto um efeito desta natureza nas células de melanoma não poderia ser descartado, o que também explicaria a interferência na adesão celular causada pelo MI-D. Contudo, esta interessante e atrativa possibilidade ainda precisa ser esclarecida e melhor estudada. Os efeitos do MI-D na adesão das células MEL-85 poderia ainda estar relacionado com a sua atividade citotóxica nestas células.

Considerando os resultados obtidos para o MI-D, pode-se afirmar que uma quimioterapia estabelecida empiricamente foi ativa no modelo de melanoma murino utilizado neste trabalho. Os resultados indicam fortemente que o composto mesoiônico MI-D é uma droga bastante ativa e potente no modelo de melanoma murino B16-F10 *in vitro* e *in vivo* e em linhagens de melanoma humano *in vitro*. Portanto, o MI-D mostra-se como uma droga atraente para futuros testes clínicos envolvendo o tratamento do melanoma. Além de sua excelente atividade contra o modelo de melanoma utilizado, o MI-D possui um processo de síntese rápido em estado puro, sem contaminantes, e apresentando também alta estabilidade (GRYNBERG et al., 1997). Os dados pré-clínicos obtidos neste estudo são bastante encorajadores e mostram o MI-D como uma droga promissora no tratamento do melanoma.

## 8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem as seguintes conclusões:

a) O composto mesoiônico MI-D é, dentre aqueles estudados no presente trabalho, o que possui o melhor substituinte (-NO<sub>2</sub>) para a atividade antitumoral frente aos modelos de melanoma estudados.

b) O composto mesoiônico MI-D é altamente citotóxico para as células tumorais B16-F10 *in vitro*. A sua atividade citotóxica e antiproliferativa está envolvida com sua atividade antitumoral.

c) O composto mesoiônico MI-D é mais efetivo que os agentes antineoplásicos de escolha, fotemustina e dacarbazina, nas condições e concentrações experimentais utilizadas.

d) As células de melanoma humano MEL-85, SK-MEL, A2058 e MEWO também são bastante susceptíveis as atividades antitumorais citotóxicas e antiproliferativas do composto mesoiônico MI-D.

e) As células de melanoma humano MEL-85 têm seu perfil adesivo e morfológico alterados quando expostas ao composto MI-D. Este composto provoca uma reorganização das fibras de actina do citoesqueleto destas células.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBELDA, S.M.; BUCK, C.A. Integrins and other cell adhesion molecules. **FASEB J.**, New York, v. 4, p.2868-2880, 1990.

AKIYAMA, S.K.; YAMADA, K.M. The interaction of plasma fibronectin with fibroblastic cells in suspension. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 260, n. 7, p. 4492-4500, 1985.

BADACHIKAR, S.V.; TIKARE, R.K.; PURANIK, G.S. Synthesis, reactions and biological activity of 3-[*p*-(*N*-methyl/ethyl-*N*-phenylcarbamoyl)] phenylsydnones. **Indian J. Chem.**, New Delhi, v. 25B, p. 1079-1080, 1986.

BACKER, W.; OLLIS, W.D. Meso-ionic compounds. **Chem. Ind.**, Belgrade, v. 16, p. 910-911, 1955.

BALCH, C.M.; SOONG, S.J.; GERSHENWALD, J.E.; THOMPSON, J.F.; REINTGEN, D.S.; CASCINELLI, N.; URIST, M.; McMASTERS, K.M.; ROSS, M.I.; KIRKWOOD, J.M.; ATKINS, M.B.; THOMPSON, J.A.; COIT, D.G.; BYRD, D.; DESMOND, R.; ZHANG, Y.; LIU, P.Y.; LYMAN, G.H.; MORABITO, A. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. **J. Clin. Oncol.**, Baltimore, v. 19, p. 3622-3634, 2001.

BERKING, C.; HERLYN, M. Human skin reconstruct models: A new application for studies of melanocyte and melanoma biology. **Histol. Histopathol.**, Murcia, v. 16, p. 669-674, 2001.

BERRIDGE M.V.; TAN A.S.; MCCOY K.D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, Switzerland, v. 4, p. 14-19, 1996.



BLASCHEK, W.; KÄSBAUER, J.; KRAUS, J.; FRANZ, G. *Phythium aphanidermatum*: culture, cell-wall composition, and isolation and structure of antitumor storage and solubilised cell-wall (1→3), (1→6)-β-D-glucans. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 231, p. 293-307, 1992.

BOAZIZ, C. Activity of a new nitrosurea – fotemustin. **Pathologie Biologie**, Paris, v. 40, (9Pt2), p. 964-968, 1992.

CADENA, S.M.S.C. **Contribuição ao conhecimento do mecanismo de ação dos compostos 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos**. Curitiba, 1999. 169f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CADENA, S.M.S.C.; CARNIERI, E.G.S.; ECHEVARRIA, A.; OLIVEIRA, M.B.M. Effect of MI-D, a new mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 440, p. 46-50, 1998.

CADENA, S.M.S.C.; CARNIERI, E.G.S.; ECHEVARRIA, A.; OLIVEIRA, M.B.M. Interference of MI-D, a new mesoionic compound, on artificial and native membranes. **Cell Biochem. Funct.**, Chichester, v. 20, p. 31-37, 2002.

CARDOSO, J.C. **Análise da Bioquímica Farmacológica do Composto Mesoiônico MI-D: estudos *in vivo* e *in vitro***. Curitiba, 2000. 123f. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CHEUNG, K.K.; ECHEVARRIA, A.; GALEMBECK, S.; MACIEL, M.A.M.; MILLER, J.; RUMJANEK, V.M.; SIMAS, A.M. Mesoionic compounds 3. Structure of the hydrochloride of 5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine. **Acta Crystallogr.**, Copenhagen, v. 48, p. 1471-1474, 1992.

COBURN, R.A.; CARAPPELLOTTI, R.A. Synthesis and properties of mesoionic pyrimido [1, 2-b-a1 pyridazine-2, 4-diones and mesoionic pyridazino [2, 3-a-a1-s-trizine-2, 4-diones: mesoionic analogs structurally related to fervenulin. **J. Pharm. Sci.**, Washington, DC, v. 65, n. 10, p. 1505-1510, 1976.

COLOMBO, P.; GUNNARSSON, K.; IATROUPOULOS, M.; BRUGHERA, M. Toxicological testing of cytotoxic drugs (Review). **Int. J. Oncol.**, Athens, v.19, p.1021-1028, 2001.

COLVIN, O.M. Pharmacology of cancer chemotherapy: Antitumor alkylating agents. DEVITA, V.T.Jr; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. In: **Cancer: Principles and Practice of Oncology**, 6ed. Lippincott and Williams & Wilkins, 2001.

CORELL, T.; PEDERSEN, S.B.; LISSAU, B.; MOILANEN, E.; METSÄ-KETELÄ, T.; KANKAANRANTA, H.; VUORINEN, P.; VAPAATALO, H.; RYDELL, E.; ANDERSSON, R.; MARCINKIEWICZ, E.; KORBUT, R.; GRYGLEWSKI, R.J. Pharmacology of mesoionic oxatriazole derivatives in blood, cardiovascular and respiratory systems. **Pol. J. Pharm.**, Cracow, v. 46, p. 553-566, 1994.

DA SILVA, E.F.; CANTO-CAVALHEIRO, M.M.; BRAZ, V.R.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON, L.L.; ECHEVARRIA, A. Synthesis, and biological evaluation of new 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine derivatives against *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. **Eur. J. Med. Chem.**, Paris, v. 37, p. 979-984, 2002.

DENKERT, C.; KOBEL, M.; BERGER, S.; SIEGERT, A.; LECLERE, A.; TREFZER, U.; HAUPTMANN, S. Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 61, n. 1, p. 303-308, 2001.

DOS SANTOS, A.C.S.; ECHEVARRIA, A. Electronic effects on  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of substituted 1,3,4-thiadiazolium salts. **Magn. Reson. Chem.**, Chichester, v. 39, p. 182-186, 2001.

DUFF, M.; STAPLETON, P.P.; MESTRE, J.R.; MADDALI, S.; SMYTH, G.P.; FREEMAN, T.A.; DALY, J.M. Cyclooxygenase-2 inhibition improves macrophage function in melanoma and increases the antineoplastic activity of interferon gamma. **Ann. Surg. Oncol.**, Hagerstown, v. 10, n. 3, p. 305-313, 2003.

DUNKLEY, C.S.; THOMAN, C.J. Synthesis and biological evaluation of a novel phenyl substituted sydnone series as potential antitumor agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, Kindlington v. 13, p. 2899-2901, 2003.

EADE, R.; EARL, C. The sydnones. A new class of compound containing two adjacent nitrogen atoms. **J. Chem. Soc.**, London, p. 591-593, 1946

EARL, J.C.; MACKNEY, A.W. The action of acetic anhydride on N-nitrosophenylglycine and some of its derivatives. **J. Chem. Soc.**, London, p. 899-900, 1935.

ENGVALL, E.; RUOSLAHTI, E. Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. **Int. J. Cancer**, New York, v. 20, p. 1-5, 1977.

GLENNON 1981 GLENNON, R.A.; ROGERS, M.E.; SMITH, J.D.; EL-SAID, M.K. Mesoionic xanthine analogues: phosphodiesterase inhibitory and hypotensive activity. **J. Med. Chem.**, Washington DC, v. 24, n. 6, p 658-661, 1981 .

GOMEZ-GAVIRO, M.V.; GONZALEZ-ALVARO, I.; DOMINGUEZ-JIMENEZ, C.; PESCHON, J.; BLACK, R.A.; SANCHEZ-MADRID, F.; DIAZ-GONZALEZ, F. Structure-function relationship and role of tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme in the down-regulation of L-selectin by non-steroidal anti-inflammatory drugs. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 277(41): p. 38212-38221, 2002.

GRECO, C.V.; NYBERG, W.H.; CHENG, C.C. Synthesis of sydnones and sydnones imines. **J. Med. Pharm. Chem.**, Washington, DC, v. 5, p. 861-865, 1962.

GRYNBERG, N.; GOMES, R.; SHINZATO, T.; ECHEVARRIA, A.; MILLER, J. Some new aryl-sydnones: effects on murine tumours. **Anticancer Res.**, Attiki, v. 12, p. 1025-1028, 1992.

GRYNBERG, N.; SANTOS, A.C.; ECHEVARRIA, A. Synthesis and *in vivo* antitumor activity of new heterocyclic derivatives of the 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide class. **Anti-Cancer Drugs**, Oxford, v. 8, p. 88-91, 1997.

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

HANSH, C.; LEO, A.; HOEKMAN, D. **Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic and Steric Constants**. Washington (DC): ACS Professional Reference Book, American Chemical Society, 1995.

HAYES, M.T.; BARTLEY, J.; PARSONS, P.G.; EAGLESHAM, G.K.; PRAKASH, A.S. Mechanism of action of fotemustine, a new chloroethylnitrosourea anticancer agent: evidence for the formation of two DNA-reactive intermediates contributing to cytotoxicity. **Biochemistry**, Washington DC, v. 36, p. 10646-10654, 1997.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, London, v. 407, p. 770-776, 2000.

HERLYN, M. e SATYAMOORTHY, K. Melanoma: Molecular biology of cutaneous melanoma. DEVITA, V.T.Jr; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. In: **Cancer: Principles and Practice of Oncology**, 6ed. Lippincott and Williams & Wilkins, 2001.

HODD, J.D.; BEDNARSKI, M.; FRAUSTO, R.; GUCCIONE, S.; REISFELD, R.A.; XIANG, R.; CHERESH, D.A. Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. **Science**, Washington DC, v. 296, p. 2404-2407, 2002.

HUMPHRIES, M.J.; The molecular basis and specificity of integrin-ligand interactions. **J. Cell Science**, Cambridge, v. 97, p. 585-592, 1990.

HUNCHAREK, M.; CAUBET, J.F.; MCGARRY, R. Single agent DTIC versus combination chemotherapy with or without immunotherapy in metastatic melanoma: a

meta-analysis of 3273 patients from 20 randomized trials. **Melanoma Res.**, London, v. 11, p. 75-81, 2001.

HYNES, R.O. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. **Cell**, Cambridge, v. 69, p. 11-25, 1992.

INCA (Instituto Nacional do Cancer) – Ministério da Saúde. **Estimativas da Incidência e Mortalidade por Cancer**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso nov. 2003.

KANKAANRANTA, H.; RYDELL, E.; PETERSSON, A.S.; HOLM, P.; MOILANEN, E.; CORELL, T.; KARUP, G.; VUORINEN, P.; PEDERSEN, S.B.; WENNMALM, A.; METSA-KETELA, T. Nitric oxide-donating properties of mesoionic 3-aryl substituted oxatriazole-5-imine derivatives. **Br. J. Pharmacol.**, Basingstoke, v. 117, n. 3, p. 401-406, 1996.

KAKIUCHI, Y.; TSUJI, S.; TSUJI, M.; MURATA, H.; KAWAI, N.; YASUMARU, M.; KIMURA, A.; KOMORI, M.; IRIE, T.; MIYOSHI, E.; SASAKI, Y.; HAYASHI, N.; KAWANO, S.; HORI, M. Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 62, n. 5, p. 1567-1572, 2002.

KAURUP, G.; PREIKSCHAT, H.; WILHELMSSEN, E.S.; PEDERSEN, S.B.; MARCINKIEWICZ, E.; CIESLIK, K.; GRYGLEWSKI, R.J. Mesoionic oxatriazole derivatives a new group of NO-donors. **Pol. J. Pharmacol.**, Cracow, v. 46, n. 6, p. 541-552, 1994.

KELLER, B.J.; MARSMAN, D.S.; POPP, J.A.; THURMAN, R.G. Several nongenotoxic carcinogens uncouple mitochondrial oxidative phosphorylation. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1102, p. 237-244, 1992.

KIER, L.B.; FOX, L.E.; DHAWAN, D.; WATERS, I.W. A new class of central nervous system stimulants. **Nature**, London, v. 195, n. 4843, p. 817-818, 1962.

KIER, L.B.; ROCHE, E.B. Medicinal chemistry of the mesoionic compounds. **J. Pharm. Sci.**, Washington DC, v. 56, p. 148-169, 1967.

KLEINMAN, H.K.; MCGARVEY, M.L.; HASSEL, J.R.; STAR, V.L.; CANNON, F.B.; LAURIE, G.W.; MARTIN, G.R. Basement Membrane complexes with biological activity. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 25(2), p. 312-318, 1986.

KISHIDA, T.; ASADA, H.; ITOKAWA, Y.; YASUTOMI, K.; SHIN-YA, M.; GOJO, S.; CUI, F.D.; UEDA, Y.; YAMAGISHI, H.; IMANISHI, J.; MAZDA, O. Electrochemo-gene therapy of cancer: intratumoral delivery of interleukin-12 gene and bleomycin synergistically induced therapeutic immunity and suppressed subcutaneous and metastatic melanomas in mice. **Mol. Ther.**, San Diego, v. 8, n. 5, p. 738-745, 2003.

KÜHN, K.; EBLE, J. Structural basis of integrin-ligant interaction. **Trends Cell Biol.**, Limerick, v. 4, p. 256-261, 1994.

KUSANO, Y.; OGURI, K.; NAGAYASU, Y.; MUNESUE, S.; ISHIHARA, M.; SAIKI, I.; YONEKURA, H.; YAMAMOTO, H.; OKAYAMA, M. Participation of syndecan 2 in the induction of stress fiber formation in cooperation with integrin  $\alpha 5\beta 1$ : Structural characteristics of heparan sulfate chains with avidity to COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. **Exp. Cell Res.**, Orlando, v. 256, p. 434-444, 2000.

LIMA, E.O.; MAIA, R.F.; FILHO, J.M.B.; FILHO, L.X. Atividades antibacteriana e antifúngica de derivados mesoiônicos. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 132-136, 1986.

LOPEZ, M.M.; KOSK-KOSIKA, P. Entropy-driven interactions of anesthetics with membrane proteins. **Biochemistry**, Washington, DC, v.36, p. 8864-8872, 1997.

LOTZE, M.T.; DALLAL, R.M.; KIRKWOOD, J.M.; FLICKINGER, J.C. Melanoma: Cutaneous melanoma. DEVITA, V.T.Jr; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. In: **Cancer: Principles and Practice of Oncology**, 6ed. Lippincott and Williams & Wilkins, 2001.

LÖW, I. e WIELAND, T. The interaction of phalloidin, some of its derivatives, and other cyclic peptides with muscle actin as studied by viscometry. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 44, p. 340-343, 1974.

MAJID, P.A.; DeFEYETER, J.F.; VAN DER WALL, E.E.; WARDEH, R.; ROOS, J.P. Molsidomine in the treatment of patients with angina pectoris. **J. Med.**, Boston, v. 302, n. 1, p. 1-6, 1980.

MAGAUD, J.P.; SARGENT, I.; MASON, D.Y. Detection of human white cell proliferative responses by immunoenzymatic measurement of bromo deoxyuridine uptake. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v. 106, p. 95-100, 1998.

MARTIN, D.S.; BERTINO, J.R.; KOUTCHER, J.A. ATP depletion + pyrimidine depletion can markedly enhance cancer therapy: fresh insight for a new approach. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 60, p. 6776-6783, 2000.

McGARY, E.C.; LEV, D.C.; BAR-ELI, M. Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma. **Cancer Biol. Ther.**, New York, v. 5, p. 459-65, 2002.

MISHIMA, T.; MURATA, J.; TOYOSHIMA, M.; FUJII, H.; NAKAJIMA, M.; HAYASHI, T.; KATO, T.; SAIKI, I. Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from blue-green alga, *Spirulina platensis*. **Clin. Exp. Metastasis**, London, v. 16, p. 541-550, 1998.

MONTANARI, C.A.; BEEZER, A.E.; SANDALL, J.P.B.; MONTANARI, M.L.C.; MILLER, J.; GIESBRECHT, A.M. On the interaction of some mesoionic compounds with *Saccharomyces cerevisiae* by biological microcalorimetry. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 23, p. 274-278, 1992.

MONTANARI, C.A.; AMARAL, A.T.; GIESBRECHT, A.M. Synthesis and antibacterial activity of some new 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide derivatives. **J. Pharm. Sci.**, Wallingford, v. 3, p. 565-568, 1997.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.65, p.55-63, 1983.

MOUSTAFA, M.A.A.; EISA, H.M. Synthesis and antimicrobial activity of 3-(substituted-phenyl)-sydnones. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 325, p. 397-401, 1991.

NETTELBECK, D.M.; RIVERA, A.A.; DAVYDOVA, J.; DIECKMANN, D.; YAMAMOTO, M.; CURIEL, D.T. Cyclooxygenase-2 promoter for tumour-specific targeting of adenoviral vectors to melanoma. **Melanoma Res.**, London, v. 13, p. 287-292, 2003.

NETTELBECK, D.M.; RIVERA, A.A.; KUPSCH, J.; DIECKMANN, D.; DOUGLAS, J.T., KONTERMANN, R.E.; ALEMANY, R.; CURIEL, D.T. Retargeting of adenoviral infection to melanoma: combining genetic ablation of native tropism with a recombinant bispecific single-chain diabody (scDb) adapter that binds to fiber knob and HMWMAA. **Int. J. Cancer**, New York, v.108, n.1, p. 136-45, 2004.

NEWELL, K.J.; TANNOCK, I.F. Reduction of intracellular pH as a possible mechanism for killing cells in acidic regions of solid tumors: effects of carbonylcyanide-3-chlorophenylhydrazone. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 49, p. 4477-4482, 1989.

NEWTON, C.G.; RAMSDEN, C.A. Meso-ionic heterocycles. **Tetrahedron**, Kindlington, v. 38, p. 2965-3011, 1982.

NYBERG, W.H.; CHEN, C.C. 3-Piperonylsydnone. A new type of antimalarial agent. **J. Med. Chem.**, Washington, DC, v. 8, p. 531-533, 1965.

OLLIS, W.D.; RAMSDEN, C.A. Meso-ionic compounds. **Adv. Heterocycl. Chem.**, San Diego, v. 19, p. 1-121, 1976.



PETER, I.; MEZZACASA, A.; LEDONNE, P.; DUMMER, R.; HEMMI, S. Comparative analysis of immunocritical melanoma markers in the mouse melanoma cell lines B16, K1735 and S91-M3. **Melanoma Res.**, London, v. 11, p. 21-30, 2001.

PAULSSON, M.; AUMAILLEY, M.; DEUTZMANN, R.; TIMPL, R.; BECK, R. Laminin-nidogen complex: extraction with chelating agents and structural characterization. **Eur. J. Biochem.**, Heidelberg, v. 166, p. 11-19, 1987.

PHILLIPS, H.J. Dye exclusions tests for cell viability. In: **Tissue culture, methods and applications**, Kruse, J.R.; Patterson, J.R.M.K. (eds). A.P.:New York, 1973, p. 406-408.

POZHARSKÜ, A.F.; SOLDATENKOV, A.T.; KATRITSKY, A.R. In: **Heterocycles in life and society**. Chichester: John Wiley & Sons, 1997. 301 p.

RAGUPATHI, G.; LIVINGSTON, P.O.; HOOD, C.; GATHURU, J.; KROWN S.E.; CHAPMAN P.B.; WOLCHOK J.D.; WILLIAMS L.J.; OLDFIELD, R.C.; HWU, W.J. Consistent antibody response against ganglioside GD2 induced in patients with melanoma by a GD2 lactone-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine plus immunological adjuvant QS-21. **Clin. Cancer Res.**, Denville, v. 9, n. 14, p. 5214-20, 2003.

REHSE, K.; MARTENS, A. Platelet aggregation inhibiting and anticoagulant effects of oligoamines, XXXII: Bisoxazol-, bisimidazol-, bisthiazol- and oligo-1, 2, 4-thiadiazolamines. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 326, n. 7, p. 399-404, 1993.

REHSE, K.; KAMPFE, M.; SCHLEIFER, K.J. New NO-donors with antithrombotic and vasodilating activities, I: 3-arylalkyl-N-nitroso-5-sydnone imines. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 326, p. 791-797, 1993a.

REHSE, K.; SCHLEIFER, K.J.; CIBORSKI, T.; BOHN, H. New NO-donors with antithrombotic and vasodilating activities, II: 3-arylalkyl-N-nitroso-5-sydnone imines. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 328, p. 137-142, 1993b.

REHSE, K.; KONIG, P. New NO-donors with antithrombotic and vasodilating activities, XII: Mesoionic oxatriazoles and related noncyclic nitrosohydrazine derivatives. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 328, n. 2, p. 137-142, 1995.

REN, D.L.; WANG, J.Z.; NODA, H.; AMANO, H.; OGAWA, S. The effects of an algal polysaccharide from *Gloiopeltis tenax* on transplantable tumors and immune activities in mice. **Planta Med.**, Ayr, v. 61, p. 120-125, 1995.

RIES, L.A.G.; EISNER, M.P.; KOSARY, C.L.; HANKEY, B.F.; MILLER, B.A.; CLEGG, L.; EDWARDS, B.K. (eds). **SEER Cancer Statistics Review, 1975 - 2000**, National Cancer Institute. Bethesda, MD. Disponível em [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2000](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2000) Acesso dez. 2003.

RODRIGUEZ-VICENTE, J.; VICENTE-ORTEGA, V.; CANTERAS-JORDANA, M. The effects of different antineoplastic agents and of pretreatment by modulators on three melanoma lines. **Cancer**, New York, v. 82, n. 3, p. 495-502, 1998.

RUOSLAHTI, E. Control of cell motility and tumor invasion by extracellular matrix interactions. **Br. J. Cancer**, Edinburgh, v. 66, p. 239-242, 1992.

RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBATER, M.D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. **Science**, Washington DC, v. 283, p. 491-497, 1987.

SAIKI, I.; IIDA, J.; MURATA, J.; OGAWA, R.; NISHI, N.; SUGIMURA, K.; TOKURA, S.; AZUMA, I. Inhibition of the metastasis of murine malignant melanoma by synthetic polymeric peptides containing core sequences of cell-adhesive molecules. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 49, p. 3815-3822, 1989.

SAKAI, A. Diclofenac inhibits endothelial cell adhesion molecule expression induced with lipopolysaccharide. **Life Sci.**, Tarrytown, v. 58, n. 26, p. 2377-2387, 1996.

SATYANARAYANA, K.; RAO, M.N.A. Synthesis and antiinflammatory, analgesics and antipyretic testing of 4-[1-oxo-(3-substituted aryl)-2-propenyl]-3-phenylsydnones and of 3-[4-[3-(substituted aryl)-1-oxo-2-propenyl] phenyl] sydnones **J. Pharm. Sci.**, Washington, DC, v. 84, p. 263-266, 1995.

SLAPAK C.A.; KUFEL D.W. Principles of cancer therapy. In: ISSELBACHER K.J.; BRAUNWALD, E.; WILSON, J.D.; MARTIN, J.B.; FAUCI, A.S.; KASPER, D.L. (Ed). **Harrison's: Principles of Internal Medicine**. New York: McGraw-Hill, 1994. p. 1826-1839.

SIMPSON, J.C.E. 6-Aminoacetoveratrone and 5:6 – Dimethoxy-3-methylantranil. **J. Chem. Soc. (LOND)**, London, pt.1, p. 94-95, 1946.

SLINGUFF, C.L.Jr.; PETRONI, G.R.; YAMSHCHIKOV, G.V.; BARND, D.L.; EASTHAM S.; GALAVOTTI, H.; PATTERSON, J.W.; DEACON, D.H.; HIBBITTS, S.; TEATES, D.; NEESE, P.Y.; GROSH, W.W.; CHIANESE-BULLOCK, K.A.; WOODSON, E.M.; WIERNASZ, C.J.; MERRILL, P.; GIBSON, J.; ROSS, M.; ENGELHARD, V.H. Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. **J. Clin. Oncol.**, Baltimore, v. 21, n. 21, p. 4016-26, 2003.

SKULACHEV, V.P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1363, p. 100-124, 1998.

SOBER, A.J.; KHO, H.K. Melanoma e outras lesões cutâneas pigmentadas. In: ISSELBACHER K.J.; BRAUNWALD, E.; WILSON, J.D.; MARTIN, J.B.; FAUCI, A.S.; KASPER, D.L. (Ed). **Harrison: Medicina Interna**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1995. p. 1958-1962.

SOTILLO, R.; GARCIA, J. F.; ORTEGA, S.; MARTIN, J.; DUBUS, P.; BARBACID, M.; MALUMBRES, M. Invasive melanoma in Cdk4-targeted mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, DC, v. 98, p. 13312-13317, 2001.

SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1366, p. 151-165, 1998.

STEWART E KIER 1965 STEWART, T.; KIER, L.B. Synthesis of mesoionic 1,3,4-thiadiazoles. **J. Pharm. Sci.**, Washington, DC, v. 54, n. 5, p. 731-734, 1965.

STRAUGHAN, D.W.; FENTEM, J.H.; BALLS, M. Replacement alternative and complementary *in vitro* methods in pharmaceutical research. In: CASTELL, J.V. e GÓMEZ-LECHÓN, M.J. (Eds) ***In vitro* methods in pharmaceutical research**. San Diego: Academic Press, 1997. p 1-14.

TIETZE, M. K.; CHIN, L. Murine models of malignant melanoma. **Mol. Med. Today**, Limerick, v. 6, p. 408-10, 2000.

VAN DYKE, T.; JACKS, T. Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. **Cell**, Cambridge, v. 108, p. 135-44, 2002.

VEIGA, S.S.; CHAMMAS, R.; CELLA, N.; BRENTANI, R.R. Glycosilation of beta-integrins in B16-F10 mouse melanoma cells as determinant of differential binding and acquisition of biological activity. **Int. J. Cancer**, New York, v. 61, p. 420-424, 1995.

VILPO, J.A.; VILPO, L.M.; VULRINEN, P.; MOILANEN, E.; METSA-KELETA, T. Mode of cytostatic action of mesoionic oxatriazole nitric oxide donors in proliferating human hematopoietic cells. **Anticancer Drug Res.**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 75-89, 1997.

WACK, C.; BECKER, J.C.; BRÖCKER, E.B.; LUTZ, W.K.; FISCHER, W.H. Chemoimmunotherapy for melanoma with dacarbazine and 2,4-dinitrochlorobenzene:

results from a murine tumor model. **Melanoma Res.**, London, v. 11, p. 247-253, 2001.

WADHWA, R.; SUGIHARA, T.; YOSHIDA, A.; NOMURA, H.; REDDEL, R.R.; SIMPSON, R.; MARUTA, H.; KAUL, S.C. Selective toxicity of MKT-077 to cancer cells is mediated by its binding to the hsp70 family protein mot-2 and reactivation of p53 function. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 60, p. 6818-6821, 2000.

YOSHIDA, B. A.; SOKOLOFF, M. M.; WELCH, D. R.; RINKER-SCHAEFFER, C. W. Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 92, p. 1717-30, 2000.

## 10. ANEXO

Trabalhos científicos resultantes desta Tese:

SENFF-RIBEIRO, A.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E.F.; VEIGA, S.S.; OLIVEIRA, M.B.M. Effect of a New 1,3,4-thiadiazolium Mesoionic Compound (MI-D) on B16-F10 Murine Melanoma. **Melanoma Research**, v. 13, n. 5, p. 465-472, october, 2003.

SENFF-RIBEIRO, A.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E.F.; VEIGA, S.S.; OLIVEIRA, M.B.M. Antimelanoma Activity of 1,3,4-thiadiazolium Mesoionics: a Structure-Activity Relationship Study. **Anti-Cancer Drugs**, v.15, n.3, march 2004, *in press*.

SENFF-RIBEIRO, A.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E.F.; FRANCO, C.R.C.; VEIGA, S.S.; OLIVEIRA, M.B.M. Cytotoxic Effect of a new 1,3,4-Thiadiazolium Mesoionic Compound (MI-D) on Cell Lines of Human Melanoma. **British Journal of Cancer**, submetido.

## Effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on B16-F10 murine melanoma

Andrea Senff-Ribeiro<sup>a</sup>, Aurea Echevarria<sup>c</sup>, Edson Fernandes Silva<sup>c</sup>,  
Silvio Sanches Veiga<sup>b</sup> and Maria Benigna Martinelli Oliveira<sup>a</sup>

The structural characteristics of mesoionic compounds, which contain distinct regions of positive and negative charges associated with a poly-heteroatomic system, enable them to cross cellular membranes and interact strongly with biomolecules. Potential biological applications have been described for mesoionic compounds. In this study we evaluated the antitumour activity of 4-phenyl-5-(4-nitrocinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride (MI-D), a new mesoionic compound, against the mouse melanoma B16-F10 cell line. *In vitro* assays showed that MI-D interferes with both cell viability and proliferation. MI-D was cytotoxic to B16-F10 cells; cell viability, which was determined at various time intervals (1–72 h) and in the presence of different concentrations of the drug (2.5–75  $\mu\text{M}$ ), was reduced by ~80% following 24 h exposure at 25  $\mu\text{M}$ . The proliferation rate evaluated over 72 h using varying subcytotoxic and cytotoxic concentrations (2.5–25  $\mu\text{M}$ ) decreased in a dose-dependent manner. The *in vivo* antitumour activity of the drug was evaluated using a subcutaneous B16-F10 melanoma tumour in C57BL/6 mice. Animals were given MI-D intraperitoneally at a single

dose of 57  $\mu\text{mol/kg}$ , 24 h after cell inoculation. Positive controls were treated with fotemustine and dacarbazine, which have known effects on melanoma cells. On day 17, tumours were excised and their weights were determined. MI-D inhibited tumour growth by 85%. This is a very encouraging result with regard to the possibility of MI-D becoming a new tool for melanoma research and treatment. *Melanoma Res* 13:465–471 © 2003 Lippincott Williams & Wilkins.

*Melanoma Research* 2003, 13:465–471

**Keywords:** MI-D, antitumour effect, B16-F10 melanoma

<sup>a</sup>Departments of Biochemistry and <sup>b</sup>Cellular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil, and <sup>c</sup>Department of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Sponsorship: This work was supported by PRONEX, CAPES, CNPq and Fundação Araucária.

Correspondence and requests for reprints to M. B. M. Oliveira, Department of Biochemistry, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.  
Tel: +55 41 361 1684; fax: +55 41 266 2042; e-mail: mbmo@bio.ufpr.br

Received 7 May 2003  
Accepted 26 May 2003

### Introduction

Mesoionic compounds such as sydnone, sydnominines, isosydnone and 1,3,4-thiadiazoles consist of a five-membered heterocyclic ring that cannot be represented satisfactorily either by covalent or polar structures, plus a sextet of electrons associated with the five ring atoms. These interesting compounds have a planar structure, with a partial positive charge in the heterocyclic ring that is balanced by a negative charge due to an atom or exocyclic group [1–3]. Such characteristics allow interaction with biomolecules such as DNA and proteins. Although the molecules are internally charged, they are neutral overall, and can therefore cross biological membranes *in vivo* [4]. All the different classes of mesoionic compounds have received considerable attention and have been extensively studied because of their unique structures, reaction behaviour, biological activities and possible pharmaceutical use [5–8].

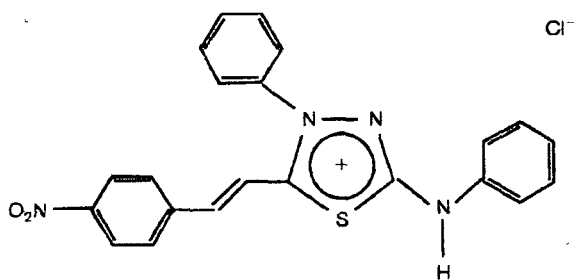
Biological activities such as anti-inflammatory, analgesic, antibacterial and antifungal effects have been described for mesoionic compounds [5,7,9,10]. Potent antiplatelet, fibrinolytic, thrombolytic, broncholytic

[6,11] and anticancer [12–14] effects, and even those on the cardiovascular system [8,15–17], are intimately related to the presence of specific substituent groups on the ring [6,7,14] or to the ability to release nitric oxide [18] from the structure.

Grynberg *et al.* [14] synthesized a new mesoionic compound, 4-phenyl-5-(4-nitrocinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride (MI-D) (Fig. 1), which was shown to enhance the survival of Ehrlich carcinoma and Sarcoma-180 tumour-bearing mice at a dose of 25 mg/kg (57  $\mu\text{mol/kg}$ ), preventing tumour growth with no significant concomitant alterations in haematological parameters in the test animals.

Studies in our laboratory have shown that MI-D was able to inhibit electron transport through the respiratory chain between complexes II and III, collapse the transmembrane potential, and stimulate ATPase activity in intact mitochondria [19]. These effects on the energy-linked functions of mitochondria seem to be related to alterations in membrane permeability and fluidity [20].

Fig. 1



Chemical structure of 4-phenyl-5-(4-nitrocinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride (MI-D).

Although an antitumour effect against Ehrlich and Sarcoma-180 tumour models has already been demonstrated for MI-D [14], this and other mesoionic compounds have not been tested using a more aggressive tumour model or compared with established antineoplastic agents.

Compared with other neoplasias, melanoma has one of the worst responses to chemotherapy [21]. The incidence of this disease is increasing in several countries, and in USA the number of cases has doubled over the last three decades [22]. Since very few agents have demonstrated substantial antitumour activity against metastatic melanoma [23,24], new drugs or new combined treatment protocols with better response rates are required.

In this study we evaluated the effects of MI-D on *in vitro* viability and proliferation in B16-F10 mouse melanoma cells and on *in vivo* cell growth in the C57BL/6 mouse model.

## Materials and methods

### Materials

MI-D (4-phenyl-5-(4-nitrocinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride) was synthesized in the Department of Chemistry of the Federal Rural University of Rio de Janeiro, Brazil, as described elsewhere [14]. Its structure was confirmed by  $^1\text{H}$ -nuclear magnetic resonance (NMR),  $^{13}\text{C}$ -NMR and mass spectrometry. Fotemustine (Muphoran) was kindly provided by the A.C. Camargo Cancer Hospital (São Paulo, Brazil) and dacarbazine (Fauldacar) was donated by the Erasto Gaertner Cancer Hospital (Curitiba, Brazil). Modified Eagle's medium (MEM) and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Cultilab (Campinas, Brazil); penicillin and gentamicin were both purchased from Gibco (Bethesda, USA). All other reagents were commercial products of the highest available purity grade.

### Drug solutions

For the *in vitro* experiments, MI-D was prepared in dimethylsulphoxide (DMSO). In order to minimize solvent interference in the experiments, several stock solutions of MI-D were prepared so that at all the desired final concentrations of MI-D in the assays, the amount of DMSO was the same (0.12%). For the *in vivo* experiments, MI-D was dissolved in commercial sunflower oil in order to avoid the toxic effects of DMSO. Fotemustine was dissolved in 95% aqueous ethanol (v/v) as recommended by the manufacturer. Stock solutions of fotemustine were prepared; at the final dilution the concentration of ethanol was 0.045%. Dacarbazine was dissolved in an aqueous solution containing citric acid (1:1 w/w) and mannitol (1:3.5 w/w), as indicated by the manufacturer.

### Animals

C57BL/6 mice (male and female, 8–12 weeks old) from the Central Animal House of the Federal University of Paraná, Brazil, were used. They received a standard laboratory diet (Purina). All the recommendations of the national law (no. 6638, 05/11/1979) for the scientific management of animals were respected.

### Cell line and culture conditions

The B16-F10 mouse melanoma cell line was kindly provided by the Ludwig Institute for Cancer Research (São Paulo, Brazil). It was maintained in liquid nitrogen at a low number of passages. After thawing, the cells were grown in monolayer cultures in MEM containing 7.5% FBS, penicillin (100 units/ml) and gentamicin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). The cultures were kept at 37°C in a humidified atmosphere plus 5%  $\text{CO}_2$ . Release of cells was performed by treatment for a few minutes with a 2 mM solution of ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) in phosphate buffered saline (PBS). After being counted, cells were then resuspended in an adequate volume of MEM supplemented with 7.5% FBS and again plated in the presence or absence of the compound under study.

### Cell viability assays

Viability assays were carried out on 24-well plates (TPP, Trasadingen, Switzerland). B16-F10 cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) were plated and allowed to adhere, and then grown for 20 h before incubation with the drug. MI-D or fotemustine were then added in varying concentrations up to 75  $\mu\text{M}$ . At each time interval (1–72 h), supernatants and cells were harvested, centrifuged and washed with PBS, and the viability was measured using the trypan blue exclusion assay [25]. Briefly, trypan blue (0.4% in PBS, pH 7.4) (Sigma Aldrich, St Louis, USA) was added to the cell suspension and the numbers of viable (unstained) and non-viable (stained) cells were counted using a Neubauer chamber. In the control experiments, the MEM con-



tained adequate amounts of vehicle, MI-D being given in 0.12% DMSO (v/v) and fotemustine in 0.045% ethanol (v/v) at the final concentrations. The cell viability of the controls was normalized to 100%.

#### Cell proliferation assay

B16-F10 cells ( $5 \times 10^3$  cells/well) were grown on 96-well plates in MEM containing 7.5% FBS for 16 h. The medium was then replaced by serum-free MEM. After 24 h, this was replaced with MEM and 7.5% FBS containing MI-D at different concentrations (2.5–25  $\mu\text{M}$ ) in quadruplicate. Controls consisted of MEM alone or with 0.12% DMSO or 0.045% ethanol. After 24, 48 and 72 h, the number of cells in each well was determined using the MTT method [26]. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma) was dissolved in Hank's balanced saline solution (HBSS) at 5 mg/ml. At the above time intervals, 20  $\mu\text{l}$  of MTT solution was added to each well and the plates were incubated at 37°C for 3 h. The MTT solution was removed and DMSO was added and mixed thoroughly to dissolve the dark blue crystals. The plates were then read using a MicroELISA Reader (Bio-Rad, Madison, USA) at 550 nm for the sample and 655 nm for reference. Results were expressed as the cell number, which was determined using a standard curve of number of cells against absorbance.

#### In vivo tumour growth

B16-F10 cells ( $5 \times 10^5$  cells/animal) were subcutaneously implanted in C57BL/6 mice, and a tumour developed at the injection site. Animals were intraperitoneally treated with a single dose of MI-D at 57  $\mu\text{mol/kg}$  (in 100  $\mu\text{l}$ ) 24 h after injection of the cells. Positive control groups received 100  $\mu\text{l}$  of fotemustine or dacarbazine solution (57  $\mu\text{mol/kg}$ ). Control groups received the respective drug vehicle under the experimental conditions described for the treated group: commercial sunflower oil for MI-D, 95% aqueous ethanol for fotemustine, and an aqueous solution containing 57  $\mu\text{mol/kg}$  citric acid and 0.016  $\mu\text{mol/kg}$  mannitol for dacarbazine. All mice were kept under observation for 17 days and then sacrificed using ether anaesthesia. Tumours were excised and their weights were determined. Inhibition of tumour growth was determined as previously described [27,28], and the inhibition ratio calculated as:

$$\text{Inhibition ratio(\%)} = 100(A - B)/A$$

where  $A$  is the average weight of the tumours from the control animals and  $B$  is the average weight of the tumours from the treated animals.

Alternative experiments were also carried out using a treatment schedule consisting of three doses of

57  $\mu\text{mol/kg}$  MI-D on days 8, 9 and 10 after cell inoculation. Animals were then sacrificed after 17 days and final evaluation was performed as described.

#### Statistical analysis

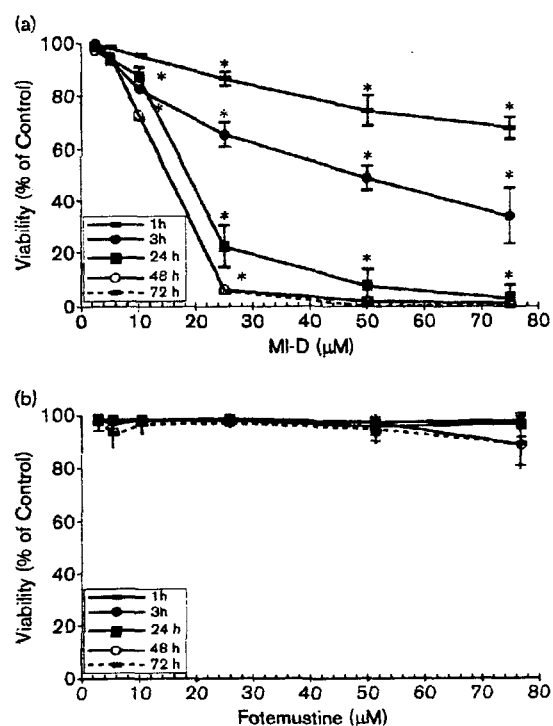
Statistical analysis of the *in vitro* data was carried out using analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test for average comparison. Mean  $\pm$  SD values were used. Significance was defined as  $P < 0.05$ . *In vivo* data were analysed using the Student's *t*-test. Mean  $\pm$  SEM values were used, and significance was again defined as  $P < 0.05$ .

## Results

#### Effects on B16-F10 viability *in vitro*

Figure 2 shows the effects of MI-D on the viability of B16-F10 melanoma cells when compared with fotemustine. Dacarbazine was not included in the *in vitro* experiments because its antineoplastic effect is due to a metabolite available after its activation through hepatic microsomal enzymes and not to the drug itself [29]. MI-D was cytotoxic against B16-F10 melanoma cells, the effect being time and dose dependent (Fig. 2A). Decreases in cell viability was observed starting from

Fig. 2



Effects of MI-D (a) and fotemustine (b) on the viability of B16-F10 cells. Viability was measured at the intervals and concentrations of each compound indicated using the trypan blue exclusion assay ( $n = 4$ ). Values given are the mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$ .

1 h' exposure to 25  $\mu$ M MI-D, with 3 h' exposure to 50  $\mu$ M MI-D reducing to 50% the viability of the cell preparation. After 24 h' exposure to MI-D, a 100% cytotoxic effect was observed at 50  $\mu$ M, with inhibition to 50% (ID<sub>50</sub>) occurring at 18  $\mu$ M. The antineoplastic agent fotemustine, at the concentrations tested, showed a discrete effect on cell viability, since at 75  $\mu$ M and after 48 and 72 h, the cell preparation was still 90% viable (Fig. 2B). This is in accord with the results of Vicente *et al.* [21], who observed a high ID<sub>50</sub> value (257  $\mu$ M) for fotemustine following 24 h' incubation with B16-F10 cells. Our results therefore indicate that MI-D is a cytotoxic drug against B16-F10 mouse melanoma cells, whose effect occurs at a lower concentration range than that of fotemustine.

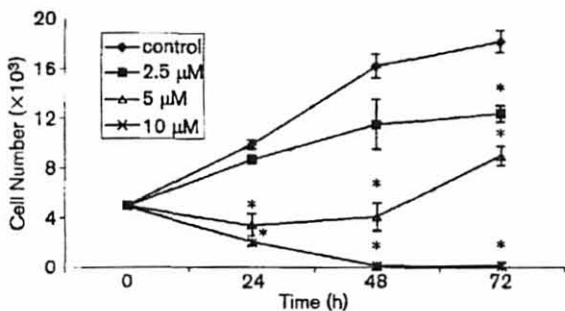
**Effects on B16-F10 proliferation *in vitro***

In order to evaluate the effect of MI-D on the proliferation of B16-F10 cells, a growth-time kinetic study for up to 72 h was performed (Fig. 3). The subcytotoxic concentrations of MI-D (2.5–5  $\mu$ M) used in these experiments showed an effect on cell proliferation. After 72 h, 2.5  $\mu$ M MI-D reduced the cell number by 30%. Higher antiproliferative activity was observed with 5  $\mu$ M MI-D, since after 24 h and 48 h no increase in cell number occurred. However, after 72 h there was a cell growth recovery and the number of cells almost doubled, in spite of being 50% lower than that of the control (Fig. 3). Concentrations lower than 2.5  $\mu$ M MI-D had no effect on B16-F10 proliferation (data not shown), and at a concentration of 10  $\mu$ M proliferation of the melanoma cells was completely inhibited (Fig. 3).

**Effects on an *in vivo* melanoma model**

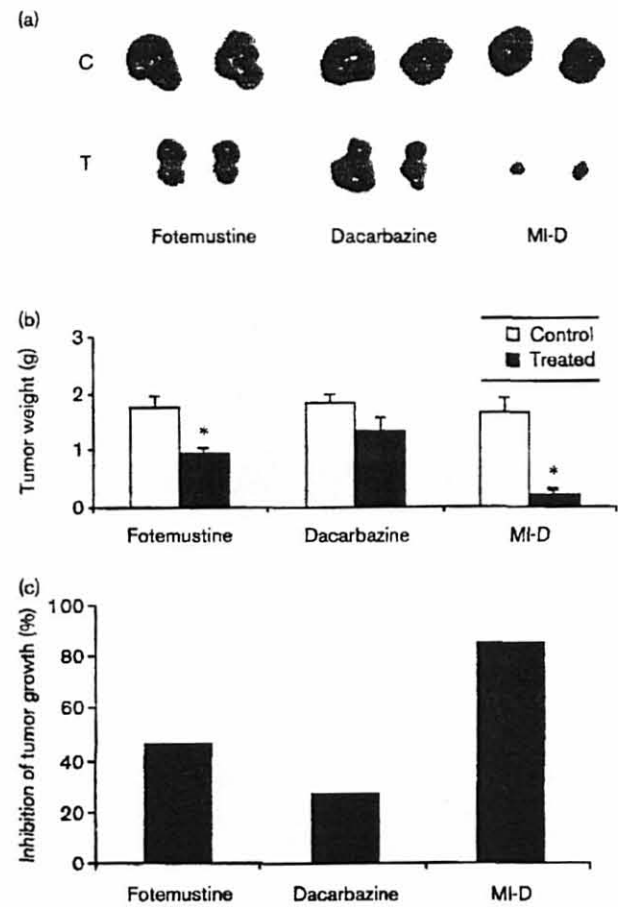
Figure 4 shows the *in vivo* effects of MI-D against B16-F10 melanoma cells growing on C57BL/6 mice, evaluated as a single intraperitoneal dose of 57  $\mu$ mol/kg administrated 24 h after cell inoculation. The MI-D

Fig. 3



Effects of MI-D on the proliferation of B16-F10 cells. The proliferation rate was measured using the MTT method at the times indicated and at subcytotoxic (2.5 and 5  $\mu$ M) and cytotoxic (10  $\mu$ M) levels (n = 3). Values given are the mean  $\pm$  SD. \*P < 0.05.

Fig. 4



Effects of MI-D, fotemustine and dacarbazine on inhibition of tumour growth. (a) Representative excised tumours from control animals (C) and treated animals (T). (b) Weight of tumours from fotemustine-, dacarbazine- and MI-D-treated mice. (c) Inhibition of tumour growth. B16-F10 melanoma cells were injected subcutaneously into C57BL/6 mice, each receiving a single dose of 57  $\mu$ mol/kg of the drug intraperitoneally 24 h following the cell injection. Control groups received the respective vehicle of the drug at the same volume as for the treated animals. Animals were sacrificed after 17 days and the tumour weight determined. Inhibition of tumour growth was determined as previously described [27,28]. MI-D, n = 5; fotemustine, n = 7; dacarbazine, n = 5. Values given are the mean  $\pm$  SEM. \*P < 0.05.

dose used in the present study was based on previous data that reported antitumoral activity using mouse models bearing Sarcoma-180 or Ehrlich tumours [14]. Fotemustine and dacarbazine were used as antitumour positive controls. Animals from the negative control groups received the same volume of vehicle as used for the injection of each drug. Figure 4A shows representative tumours excised at 17 days after drug treatment. The mean weight of the tumours and the inhibition of tumour growth are shown in Figures 4B and C, respectively. All vehicles, in spite of being different for

each drug, did not have an influence on tumour growth, the mean tumour weights being very similar ( $\sim 1.75$  g) (Fig. 4B). These *in vivo* experiments demonstrated that MI-D has a potent antitumour activity at a single dose of  $57 \mu\text{mol/kg}$ , inhibiting tumour growth by 85%. The *in vivo* growth of B16-F10 melanoma responded to fotemustine (positive control), and tumour growth inhibition of  $\sim 50\%$  was observed when animals were treated using the same dose as for MI-D. For dacarbazine,  $57 \mu\text{mol/kg}$  caused a reproducible tendency towards inhibition of tumour growth of 27% (Fig. 4C). The results are thus consistent with those of the *in vitro* experiments, which pointed to the antitumour effect of the mesoionic compound MI-D.

In view of the fact that the effect of MI-D could arise from the impairment of establishment of the melanoma tumour, since it was administered 24 h after cell inoculation, the drug was also evaluated on an already developed tumour. Figure 5 shows results from experiments in which MI-D treatment consisting of three doses of  $57 \mu\text{mol/kg}$  was administered on days 8, 9 and 10 after inoculation of the B16-F10 melanoma cells. MI-D was well tolerated by the animals since none died under this protocol. Eight days post-cell inoculation, tumour masses were detectable ( $0.23 \pm 0.46$  g;

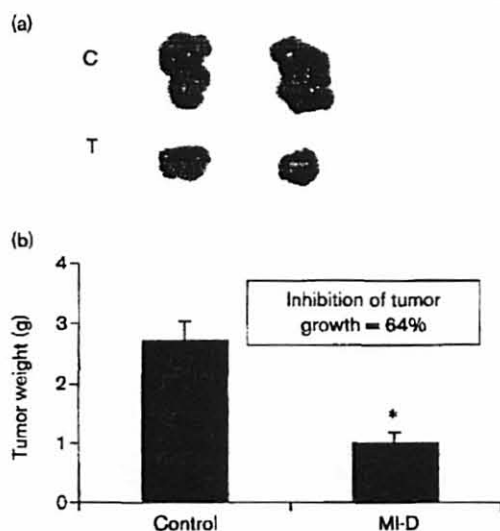
data not shown). Under these conditions, MI-D significantly inhibited tumour growth by 64% compared with the vehicle control.

## Discussion

We have shown that MI-D inhibited B16-F10 murine melanoma growth *in vitro* and *in vivo*. MI-D was effective in inhibiting cell implantation as well as in inhibiting growth of an 8-day developed tumour. Dacarbazine and fotemustine are considered to be the most active drugs for treatment of melanoma, the former having a response rate of the order of 20% [23] and the latter being mostly used in cases of disseminated melanoma with cerebral metastasis, having a global response rate of 24% [24]. Both drugs were used as positive controls in the present study, whose object was to evaluate the effect of MI-D, a new mesoionic compound. In spite of the control drugs being used at a lower concentration than that used in clinical protocols [29], good sensitivity of the B16-F10 melanoma cells toward fotemustine was observed in the *in vivo* experiments, which did not correspond to the *in vitro* ones. In regard to this, Hayes *et al.* [30] working *in vitro* with similar concentrations of fotemustine, showed dependence of the final effect on the cell type, with methyl excision repair (Mer) deficient human tumour cells being more susceptible. Thus, the presence of this enzyme in B16-F10 melanoma cells cannot be ruled out. Fotemustine, at  $57 \mu\text{mol/kg}$ , produced  $\sim 50\%$  inhibition of murine tumour growth. Since MI-D at  $57 \mu\text{mol/kg}$  caused 85% inhibition of tumour growth, it follows that the necessary dose to obtain 50% of the effect is lower, suggesting that MI-D is a very active and potent drug against the present mouse melanoma model. Growth inhibition of an already developed tumour using MI-D is also an important result. As a single agent, it had a significant effect (64%) on tumour growth. It is relevant that Wack *et al.* [31], using dacarbazine in a similar model consisting of the B16-FB17 cell line (a slowly growing B16 subline), did not observe a reduction in tumour growth using 200 mg/kg administered as 1.1 mmol/kg in a single dose applied 7 days after cell inoculation, although a multiple dose protocol had a pronounced inhibitory effect. However, this is a drug concentration 20-fold greater than that used for MI-D in a single administration.

The chloronitrosourea fotemustine is implicated in the alkylation of  $O^6$ -guanine as the major contributor to toxicity [30], and dacarbazine is also a DNA adduct-forming agent [32], which inhibits DNA synthesis by forming covalent bonds with nucleic acids, causing subsequent strand breakage and ultimately cell death [29,32]. Moreover, some agents exert their effects by modulating mitochondrial permeability transition pores and thus affecting energy transfer pathways in neoplastic cells, which have a higher mitochondrial mem-

Fig. 5



Effect of MI-D on 8-day implanted tumours. (a) Representative excised tumours from control (C) and treated animals (T). (b) Weight of tumours from MI-D-treated and control mice. B16-F10 melanoma cells were inoculated subcutaneously into C57BL/6 mice, each receiving three doses of  $57 \mu\text{mol/kg}$  on days 8, 9 and 10 after cell injection. Control groups received the vehicle of MI-D (sunflower oil) at the same volume as the treated animals. Animals were sacrificed on day 17 and the tumour weight determined. Inhibition of tumour growth was determined as previously described [27,28] ( $n = 5$ ). Values given are the mean  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$ .

brane potential than normal cells, resulting in cytotoxicity [32–34]. Since MI-D affects the energy-linked functions of mitochondria [19] as well as membranes [20], its antitumour activity is probably related to its mitochondrial effects. In relation to this, MI-D is an inhibitory uncoupler [19] and, according to Skulachev [35] and others [32], in some instances an uncoupling action could explain the therapeutic effect of a drug. This seems true for the antitumour action of carbonyl-cyanide-*m*-chlorophenylhydrazon (CCCP) [36] and other anticancer drugs [37]. The induction of apoptosis could be a consequence of the cytotoxic activity of MI-D, as it is already known that drugs that affect mitochondrial megachannels might facilitate the induction of cell death and overcome apoptosis resistance in cancer cells [38]. Therefore, the effect of MI-D on mitochondria could also be involved in its antitumour activity on melanoma cells.

Our results show that an empirically established chemotherapy based on MI-D is active in a murine tumour model. Although mouse models cannot be directly extrapolated to humans, it would be reasonable to postulate that it might be a promising and attractive drug for future clinical trials on melanoma tumours, which are extremely resistant to chemotherapy. Besides its excellent antitumour activity against melanoma, it can be readily synthesized in a pure state and also has a high stability [14]. Our preclinical data are thus very encouraging, and further studies on different murine treatment protocols as well as combined treatments are in progress in our laboratory.

### Acknowledgements

We thank Prof. Dr R. R. Brentani from the Ludwig Institute for Cancer Research (São Paulo, Brazil) for providing the B16-F10 cells, and A.C. Camargo Cancer Hospital São Paulo, Brazil and Erasto Gaertner Cancer Hospital (Curitiba, Brazil) for donating the antineoplastic drugs fotemustine and dacarbazine.

### References

- Ollis WD, Ramsden CA. Meso-ionic compounds. *Adv Heterocycl Chem* 1976; 19:1–121.
- Newton CG, Ramadan CA. Meso-ionic heterocycles. *Tetrahedron* 1982; 38:2965–3011.
- Cheng KK, Echevarria A, Gallembek S, Maciel MAM, Miller J, Rumjanek VM, et al. Mesoionic compounds 3. Structure of the hydrochloride of 5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylemine. *Acta Crystallogr* 1992; 48:1471.
- Kier LB, Roche EB. Medicinal chemistry of the mesoionic compounds. *J Pharm Sci* 1967; 56:148–169.
- Moustafa MAA, Eisa HM. Synthesis and antimicrobial activity of 3-(substituted phenyl)-sydnones. *Arch Pharm* 1991; 325:397–401.
- Corelli T, Pedersen SB, Lissau B, Moilanen E, Möttsä-Ketelä T, Kankaanranta H, et al. Pharmacology of mesoionic oxatriazole derivatives in blood, cardiovascular and respiratory systems. *Pol J Pharmacol* 1994; 46: 553–566.
- Satyanarayana K, Rao MNA. Synthesis and antiinflammatory, analgesic and antipyretic testing of 4-[1-oxo-(3-substituted aryl)-2-propenyl]-3-phenyl-sydnones and of 3-[4-(3-(substituted aryl)-1-oxo-2-propenyl) phenyl] sydnones. *J Pharm Sci* 1995; 84:263–266.
- Rehse K, Ciborski T, Müller B. Platelet aggregation inhibiting and anticoagulant effects of oligoamines. XXVII: Inhibition of leucocyte adherence to endothelium by oligoamine RE 1492C and the NO-donor RE 2047. *Arch Pharm* 1995; 328:125–126.
- Badachikar SV, Tikare RK, Puranik GS. Synthesis, reactions and biological activity of 3-[p-(N-methyl-ethyl-N-phenylcarbamoyl)]phenylsydnones. *Indian J Chem* 1986; 25B:1079–1080.
- Montanari CA, Beezer AE, Sandall JPB, Montanari, MLC, Miller J, Giesbrecht AM. On the interaction of some mesoionic compounds with *Saccharomyces cerevisiae* by biological microcalorimetry. *Rev Microbiol* 1992; 23:274–278.
- Kankaanranta H, Rydell E, Peterson AS, Holm P, Moilanen E, Corelli T, et al. Nitric oxide-donating properties of mesoionic 3-aryl substituted oxatriazole-5-imine derivatives. *Br J Pharmacol* 1996; 117:401–406.
- Shinzato TO, Grynberg N, Gomes RM, Echevarria A, Miller J. Antitumor activity of new mesoionic compounds against three murine tumors. *Med Sci Res* 1989; 17:865–866.
- Grynberg N, Gomes R, Shinzato T, Echevarria A, Miller J. Some new aryl sydnones: effects on murine tumors. *Anticancer Res* 1992; 12: 1025–1028.
- Grynberg N, Santos AC, Echevarria A. Synthesis and *in vivo* antitumor activity of new heterocyclic derivatives of 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide class. *Anticancer Drugs* 1997; 8:88–91.
- Majid PA, Defeyter PJF, Van der Wall EE, Wardeh R, Ross JP. Molesidomine in the treatment of patients with angina pectoris. *N Engl J Med* 1980; 302:1–8.
- Rudolph W, Derschinger J. Clinical comparison of nitrates and sydnonimines. *Eur Heart J* 1991; 12:33–41.
- Rehse K, König P. New NO donors with antithrombotic and vasodilating activities. XII. Mesoionic oxatriazoles and related monocyclic nitroso-hydrazine derivatives. *Arch Pharm* 1995; 328:137–142.
- Hogg N, Darley-Usmar VM, Wilson MT, Moncada S. Production of hydroxyl radicals from simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J* 1992; 281:419–424.
- Cadena SMSC, Carnieri, EGS, Echevarria A, Oliveira MBM. Effect of MI-D, a new mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria. *FEBS Lett* 1998; 440:46–50.
- Cadena SMSC, Carnieri EGS, Echevarria A, Oliveira MBM. Interference of MI-D, a new mesoionic compound, on artificial and native membranes. *Cell Biochem Funct* 2002; 20:31–37.
- Vicente JR, Ortega VV, Jordana MC. The effects of different antineoplastic agents and of pretreatment by modulators on three melanoma lines. *Cancer* 1998; 82:495–502.
- Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, et al. (editors). *SEER Cancer Statistics Review, 1975–2000*. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2000/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2000/). Bethesda: National Cancer Institute; 2002.
- Huncharek M, Caubet JF, McGarry R. Single agent DTIC versus combination chemotherapy with or without immunotherapy in metastatic melanoma: a meta-analysis of 3273 patients from 20 randomized trials. *Melanoma Res* 2001; 11:75–81.
- Boaziz C. Activity of a new nitrosourea – fotemustin. *Pathol Biol (Paris)* 1992; 40:(9 pt 2):964–968.
- Phillips HJ. Dye exclusion tests for cell viability. In: Kruse JR, Patterson JRMK (editors): *Tissue Culture, Methods and Applications*. New York: Academic Press; 1973, pp. 406–408.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55–63.
- Biaschek W, Käsbauser J, Kraus J, Franz G. *Phytilium aphanidermatum*: culture, cell-wall composition, and isolation and structure of antitumor storage and solubilised cell-wall (1–3), (1–6)- $\beta$ -D-glucans. *Carbohydr Res* 1992; 231:293–307.
- Ren DL, Wang JZ, Noda H, Amano H, Ogawa S. The effects of an algal polysaccharide from *Gloiopeltis tenax* on transplantable tumors and immune activities in mice. *Planta Med* 1995; 61:120–125.
- Slapak CA, Kufe DW. Principles of cancer therapy. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL (editors): *Harrison's Principles of Internal Medicine*. New York: McGraw-Hill; 1994, pp. 1826–1839.
- Hayes MT, Bartley J, Parsons PG, Eaglesham GK, Prakash AS. Mechanism of action of fotemustine, a new chloroethylnitrosourea anticancer agent: evidence for the formation of two DNA-reactive intermediates contributing to cytotoxicity. *Biochemistry* 1997; 36: 10646–10654.
- Wack C, Becker JC, Bröcker EB, Lutz WK, Fischer WH. Chemoimmunotherapy for melanoma with dacarbazine and 2,4-dinitrochlorobenzene: results from a murine tumor model. *Melanoma Res* 2001; 11:247–253.

- 32 Colombo P, Gunnarsson K, Iatrouopoulos M, Brughera M. Toxicological testing of cytotoxic drugs. *Int J Oncol* 2001; 19:1021–1028.
- 33 Martin DS, Bertino JR, Koutcher JA. ATP depletion + pyrimidine depletion can markedly enhance cancer therapy: fresh insight for a new approach. *Cancer Res* 2000; 60:6776–6783.
- 34 Wadhwa R, Sugihara T, Yoshida A, Nomura H, Reddel RR, Simpson R, et al. Selective toxicity of MKT-077 to cancer cells is mediated by its binding to the hsp70 family protein mot-2 and reactivation of p53 function. *Cancer Res* 2000; 60:6818–6821.
- 35 Skulachev VP. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1363:100–124.
- 36 Newell KJ, Tannock IF. Reduction of intracellular pH as a possible mechanism for killing cells in acidic regions of solid tumors: effects of carbonylcyanide-3-chlorophenylhydrazone. *Cancer Res* 1989; 49: 4477–4482.
- 37 Keller BJ, Maramba DS, Popp JA, Thurman RG. Several nongenotoxic carcinogens uncouple mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1102:237–244.
- 38 Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366:151–165.



# Antimelanoma activity of 1,3,4-thiadiazolium mesoionics: a structure-activity relationship study

Andrea Senff-Ribeiro<sup>a</sup>, Aurea Echevarria<sup>c</sup>, Edson F. Silva<sup>c</sup>, Silvio S. Veiga<sup>b</sup> and Maria B. M. Oliveira<sup>a</sup>

The effect of a series of 4-phenyl-5-(2'-Y, 4'-X or 4'-X-cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides was evaluated against B16-F10 murine melanoma cells *in vitro* and against tumors resulting from implanted B16-F10 cells in C57BL/6 mice. These compounds differ from each other only at the cinnamoyl ring substituent (MI-J, X=OH; MI-2,4diF, X=Y=F; MI-4F, X=F and MI-D, X=NO<sub>2</sub>). The results were compared with those obtained for MI-D, which has already been shown to be a potent and promising drug against melanoma. On exposure of B16-F10 cells to MI-D, MI-2,4diF and MI-4F, all of them at the same micromolar concentration (50 μM) decreased the cell viability to 8, 50 and 22%, respectively, while MI-J did not show any significant effect under the same conditions. However, low doses such as 10 μM MI-D, were sufficient to impair cell growth over 72 h, but for MI-2,4diF and MI-4F the effect on B16-F10 proliferation was only observed at a concentration of 25 μM. Furthermore, MI-4F had a slightly better effect than MI-2,4diF *in vitro*; its effect on tumor growth *in vivo* was not significant, MI-D inhibited tumor growth by 77%. The greater effectiveness of MI-D compared with MI-2,4diF, MI-4F and MI-J against B16-F10 melanoma cells is probably due to its stronger electron-withdrawing group

## Introduction

Mesoionic compounds such as sydrones, sydnominines, isosydrones and 1,3,4-thiadiazoles are members of a distinctive group of heterocycles, which have received considerable attention and have been extensively studied because of their unique structures, biological activity and pharmaceutical use [1-4]. Mesoionic compounds have an interesting structural feature and can be considered as belonging to a class of mesoionic heterocyclic betaines [5,6]. These are planar five-membered heterocycles with at least one side-chain whose α atom is also in the plane having a dipole moment in the order of 5D [7]. In addition, they possess a five-membered heterocyclic ring associated with a sextet of p and π electrons, giving a positive charge counter-balanced by a formal negative charge on the α atom of the chain, which cannot be represented satisfactorily either by covalent or polar structures (Fig. 1) [5,6,8,9]. The association of these characteristics with the small polyhetero-atomic system suggests a high probability of a strong interaction with biomolecules such as DNA and proteins [10]. Although the molecules are internally charged, they are overall

(NO<sub>2</sub>), which increases the positive charge on the mesoionic ring and allows extensive conjugation of the side-chain with the exocyclic moiety. This seems to be important for degree of anti-tumor activity of these compounds. *Anti-Cancer Drugs* 15:000-000 © 2004 Lippincott Williams & Wilkins.

*Anti-Cancer Drugs* 2004, 15:000-000

**Keywords:** 1, 3, 4-thiadiazolium mesoionics, anti-melanoma activity, structure-activity study

Departments of <sup>a</sup>Biochemistry, <sup>b</sup>Cellular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil and <sup>c</sup>Department of Chemistry, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Sponsorship: Supported by PRONEX, CAPES, CNPq and FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA.

Correspondence to M. B. M. Oliveira, Department of Biochemistry, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil. Tel: +55 41 361 1664; fax: +55 41 266 2042; e-mail: mbmo@ufpr.br

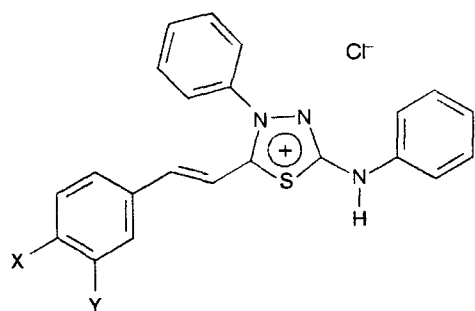
Received 12 August 2003 Revised form accepted 24 November 2003

neutral and, therefore, can cross *in vivo* biological membranes [10].

Several biological activities have been described for mesoionic compounds showing their potential pharmaceutical use. Anti-inflammatory, analgesic, anti-bacterial and anti-fungal activities have been demonstrated [1,3,11,12]. Effects such as potent anti-platelet, fibrinolytic, trombolitic, broncholytic [13,14], anti-cancer [15-17] or even on the cardiovascular system [4,18-20] are intimately related with the presence of specific substituent groups in the ring [3,13,17] or to the ability of releasing nitric oxide [21] from their structures.

We have synthesized various salts of mesoionic compounds belonging to the 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide class [17,22,23]. Four derivatives, 4-phenyl-5-(4'-X-cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides, where X is OH (MI-J), -NO<sub>2</sub> (MI-D), -F (MI-4F) and 4-phenyl-5-(2-Y-4-X-cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride, where Y = X = F (MI-2,4diF) (Fig. 1), have been detailed. MI-D and MI-J were able to

Fig. 1



Chemical structure of various 4-phenyl-5-(2'-Y-4'-X-cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride derivatives: MI-D (X = NO<sub>2</sub>; Y = H), MI-J (X = OH; Y = H), MI-4F (X = F; Y = H) and MI-2,4diF (X = Y = F).

enhance the survival of Ehrlich carcinoma and Sarcoma-180 tumor-bearing mice, preventing the growth of the tumor, with no significant concomitant alterations of hematological parameters in the test animals, at a dose of 25 mg/kg [17].

Recently, some derivatives of this class were reported as new anti-leishmanial agents, including MI-4F [23]. It is relevant that a number of anti-trypanosome compounds have been found to be effective against experimental tumors, reinforcing that chemotherapeutic agents may modify some common metabolic pathways in different cell models, which replicate rapidly [24,25].

Among these 1,3,4-thiadiazolium mesoionics, MI-D has been the most studied; it was shown to be able to inhibit the respiratory chain between complexes II and III, collapse the transmembrane potential, and stimulate ATPase activity in intact mitochondria [26]. Alterations were also reported in membrane permeability and fluidity, which are related to the MI-D effect on the energy-linked functions of mitochondria [27].

Recent studies in our laboratory showed MI-D to be a potent drug against melanoma [28]. Compared with two other anti-neoplastic agents (fotemustin and dacarbazine), it was effective against the B16-F10 murine melanoma model both *in vitro* and *in vivo*, under the same experimental conditions and concentrations [28]. However, no studies concerning anti-tumor activities have been performed with MI-4F and MI-2,4diF.

We now evaluate the effects of MI-J, MI-2,4diF and MI-4F on B16-F10 mouse melanoma cell in terms of *in vitro* viability and proliferation, and compare the results with those obtained for MI-D. The *in vivo* effect of the mesoionic compounds on B16-F10 tumor-bearing mice (C57BL/6) was also investigated using a single-dose

protocol. These data give rise to a structure-activity relationship (SAR) study that can be used as a background for design and synthesis of new molecules.

## Materials and methods

### Materials

All 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compounds were synthesized in the Department of Chemistry of the Rural Federal University of Rio de Janeiro, Brazil, as described elsewhere [17,22,23]. Their structures were confirmed by <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR and mass spectrometry. Modified Eagle's medium (MEM) and fetal bovine serum (FBS) were from Cultilab (Campinas, Brazil); penicillin and gentamycin were both purchased from Gibco (Bethesda, MD). All other reagents were commercial products of the highest available purity grade.

### Drug solutions

For *in vitro* experiments, mesoionic derivatives were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO; purchased from Merck, LOCATION?). In order to minimize solvent interference in the experiments, several stock solutions of the mesoionic compounds were prepared so that at the desired final concentrations of the drugs in the assays the amount of DMSO was the same and equal to 0.12%. For *in vivo* experiments, mesoionic compounds were dissolved in commercial sunflower oil in order to avoid the toxic effect of DMSO.

### Animals

These were C57BL/6 mice (male and female, 8–12 weeks old) from the Central Animal House of Federal University of Paraná, which received a standard laboratory diet (Purina). All recommendations of the national law (no. 6638, 05/11/1979) for Scientific Management of Animals were respected.

### Cell line and culture conditions

B16-F10 was kindly provided by the Ludwig Institute for Cancer Research (São Paulo, Brazil). The mouse melanoma cell line was maintained in liquid N<sub>2</sub> at low number of passages. After thawing, they were grown in monolayer cultures in MEM containing 7.5% FBS, penicillin (100 U/ml) and gentamycin (50 µg/ml). The cultures were kept at 37°C under a humidified atmosphere plus 5% CO<sub>2</sub>. Release of cells was performed by a treatment for a few minutes with a 2 mM solution of EDTA in phosphate-buffered saline (PBS). After being counted, cells were then resuspended in an adequate volume of MEM supplemented with 7.5% FBS and again plated in the presence or absence of the compound under study.

### Cell viability assay

Viability assays were carried out in 24-well plates (TPP, Trasadingen, Switzerland), as previously described [28]. Briefly, B16-F10 cells (5 × 10<sup>5</sup> cell/well) were plated and allowed to adhere, and then grown for 20 h before



incubation with the drug. Mesoionic compounds were then added in varying concentrations (2.5, 5, 10, 25, 50 and 75  $\mu\text{M}$ ). At each time interval (1–72 h), supernatants and cells were harvested, centrifuged, washed with PBS and their viability was measured by the Trypan blue exclusion assay [29]. Briefly, Trypan blue (0.4% in PBS, pH 7.4) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was added to the cell suspension, and the number of viable (unstained) and non-viable (stained) cells was counted using a Neubauer Chamber. In control experiments, the MEM contained adequate amounts of vehicle: 0.12% DMSO (v/v) at final concentrations. Cell viability of controls was normalized to 100%.

#### Cell proliferation assay

Cell proliferation assays were performed as previously described [28]. Briefly, B16-F10 cells ( $5 \times 10^3$  cells/well) were grown on 96-well plates (TPP) in MEM containing 7.5% FBS for 16 h. The medium was then replaced by serum-free MEM. After 24 h, this was replaced with MEM and 7.5% FBS containing the mesoionic compound at different concentrations (2.5–25  $\mu\text{M}$ ) in quadruplicate. Controls consisted of MEM alone or in the presence of 0.12% DMSO. After 24, 48 and 72 h, the number of cells in each well was determined using the MTT method [30]. MTT (Sigma) was dissolved in HBSS at 5 mg/ml. At the above intervals, 20  $\mu\text{l}$  of MTT solution was added to each well and the plates were incubated at 37°C for 3 h. The MTT solution was removed and DMSO was added and mixed thoroughly to dissolve the dark blue crystals. The plates were then read using a Microelisa Reader (Bio-Rad, Madison, WI) at 550 nm for the sample and 655 nm for the reference. Results were expressed as the cell number, which was determined using a standard curve of cells against absorbance.

#### In vivo tumor growth

B16-F10 cells ( $5 \times 10^5$  cells/animal) were s.c. implanted in C57BL/6 mice so that a tumor developed at the injection site. Animals were i.p. treated with a single dose of mesoionic compound at 57  $\mu\text{mol/kg}$  (in 100  $\mu\text{l}$ ), 24 h after cell injection. Control groups received the vehicle (commercial sunflower oil) under the experimental conditions described for the treated group. All mice were kept under observation for the following 17 days and then killed with ether anesthesia for final evaluation. Tumors were excised and their weights were determined. Inhibition of tumor growth was determined as previously described [31,32] and calculated as: Inhibition Ratio (%) =  $100(A-B)/A$ ; where  $A$  is the average weight of tumors from control animals and  $B$  is that of tumors from treated animals.

#### Statistical analysis

Statistical analysis of the *in vitro* data was carried out using ANOVA and the Tukey test for average comparison. Mean  $\pm$  SD values were used. Significance was defined as

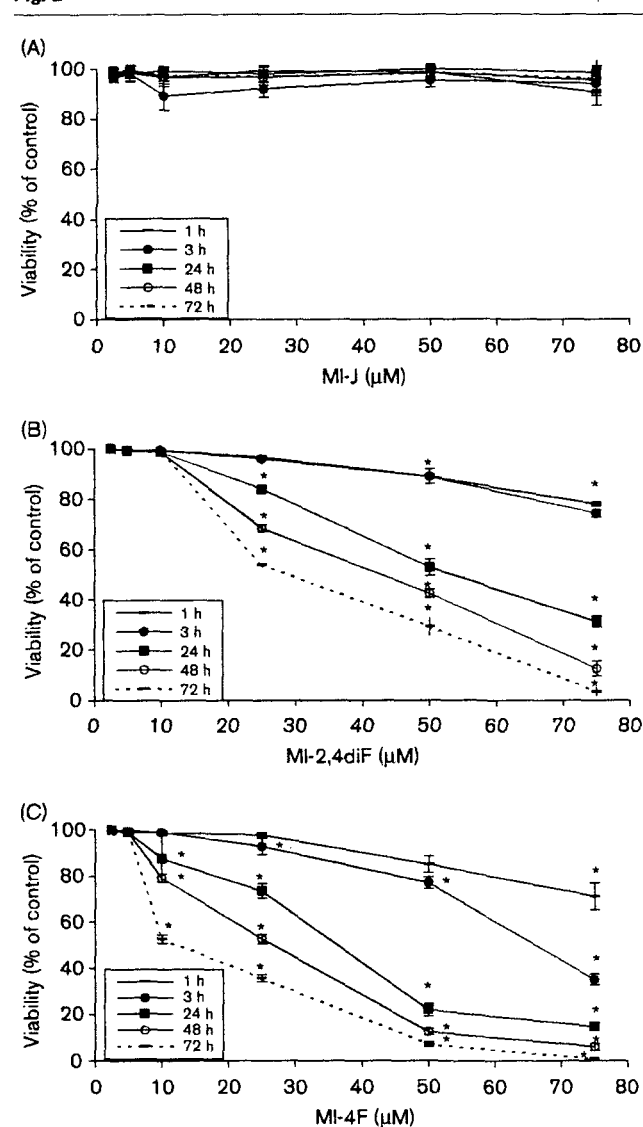
$p < 0.05$ . *In vivo* data were analyzed using Student's *t*-test. Mean  $\pm$  SEM values were used and significance was again defined as  $p < 0.05$ .

## Results

### Effects on B16-F10 viability *in vitro*

Figure 2 shows the effect of the mesoionic compounds on B16-F10 viability. MI-J did not alter cell viability at the concentrations tested even after 72 h of treatment (Fig. 2A). The mesoionic compound substituted with two fluor atoms, MI-2,4diF, presented a cytotoxic effect at 25  $\mu\text{M}$

Fig. 2



Effect of 1,3,4-thiadiazolium derivatives on the viability of B16-F10 cells. (A) Effect of MI-J. (B) Effect of MI-2,4diF. (C) Effect of MI-4F. The viability of B16-F10 melanoma cells was measured by the Trypan blue exclusion assay at indicated intervals and concentrations of each compound ( $n=4$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  SD values. \* $p < 0.05$ .



**Table 1 B16-F10 viability (% of control) after 24 h of treatment with 1,3,4-thiadiazolium derivatives**

| Concentration ( $\mu\text{M}$ ) | Derivative                |               |                           |                           |
|---------------------------------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------------------|
|                                 | MI-D                      | MI-J          | MI-2,4diF                 | MI-4F                     |
| 2.5                             | 97 $\pm$ 3.0              | 98 $\pm$ 2.1  | 100 $\pm$ 0.2             | 100 $\pm$ 0.5             |
| 5                               | 93 $\pm$ 6.0              | 98 $\pm$ 3.2  | 99 $\pm$ 1.0              | 99 $\pm$ 1.0              |
| 10                              | 85 $\pm$ 5.5 <sup>a</sup> | 99 $\pm$ 1.4  | 99 $\pm$ 1.5              | 88 $\pm$ 10.2             |
| 25                              | 20 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup> | 99 $\pm$ 3.3  | 84 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup> | 74 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup> |
| 50                              | 8 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>  | 100 $\pm$ 0.5 | 53 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup> | 22 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup> |
| 75                              | 2 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>  | 99 $\pm$ 2.5  | 31 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup> | 15 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup> |

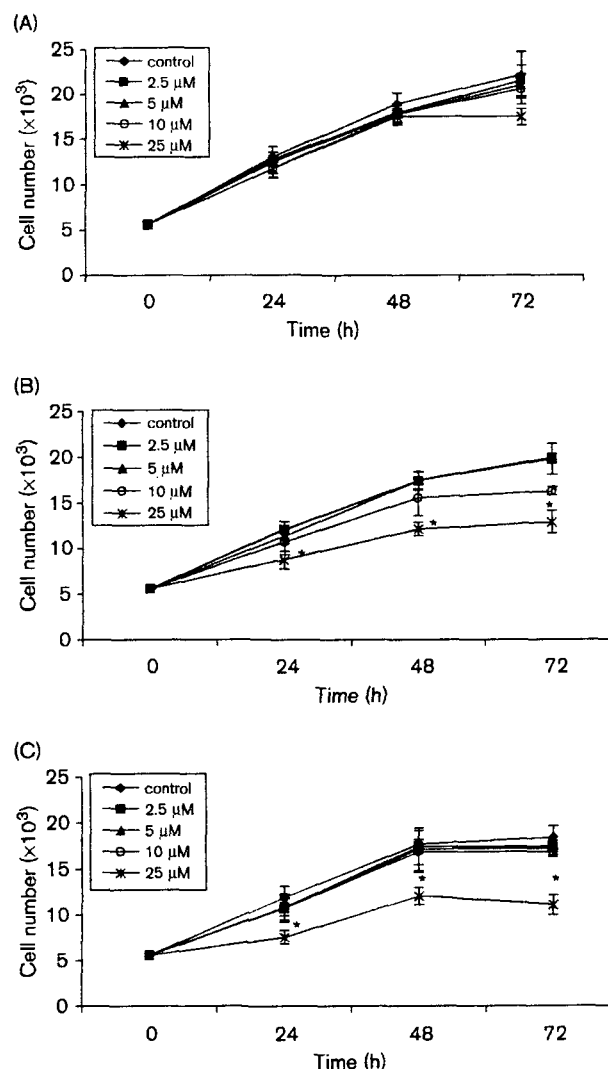
Assays were carried out as described in Materials and methods. Results are expressed as mean  $\pm$  SD values.

<sup>a</sup> $p < 0.05$ .

after 24 h incubation. This concentration was able to reduce the cell viability to 50% after 72 h (Fig. 2B). A maximum cytotoxic effect was obtained at 75  $\mu\text{M}$  after 72 h of treatment. At concentrations lower than 25  $\mu\text{M}$ , MI-2,4diF did not give rise to any effect on B16-F10 viability. The MI-4F derivative showed a higher effect on B16-F10 viability when compared to MI-2,4diF (Fig. 2C). The viability was reduced to 80% using 10  $\mu\text{M}$  at a 48h-incubation. This concentration resulted in 50% viability after 72 h. A 3-h incubation with 75  $\mu\text{M}$  caused a decrease of viability of 65% and using a 24-h incubation only 15% of cells remained viable. In order to compare the effect of these mesoionic compounds to that exerted by MI-D, different concentrations and a 24-h treatment were used. MI-D at 50  $\mu\text{M}$  lowered the cell viability to only 8% after treatment (Table 1), while MI-J at the same molar concentration had no effect, and MI-2,4diF and MI-4F reduced cell viability to 53 and 22%, respectively. For MI-D, the results were in accordance with those previously obtained for this compound [28] and confirm its accentuated cytotoxicity on the murine melanoma cells. Although the fluorine-substituted mesoionic derivatives showed cytotoxic effects on B16-F10 melanoma cells, none of them gave better results than those obtained for the NO<sub>2</sub>-substituted compound (MI-D) (Table 1) and those described before [28].

#### Effects on B16-F10 proliferation *in vitro*

The effects of the mesoionic compounds on B16-F10 growth are shown in Fig. 3. MI-J did not significantly affect cell growth over 72 h, since treated and non-treated cells grew at the same rate (Fig. 3A). MI-2,4diF affected cell growth only at the higher concentration (25  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 3B). Incubation with 25  $\mu\text{M}$  with this difluoro derivative was able to reduce the number of cells to around 70% after 24 and 48 h, this value being diminished to 65% after 72 h. MI-4F as MI-2,4diF reduced cell growth only at the higher concentration (25  $\mu\text{M}$ ). As was observed in the cell viability assay, MI-4F had a slightly greater effect than MI-2,4diF on melanoma cells on assessment of B16-F10 growth (Fig. 3C). At 24 and 48 h there were around 35% less cells than in the control. At 72 h this increased to 40%. The effect of MI-D on B16-F10 proliferation was evaluated using a concentration of 10  $\mu\text{M}$  (Table 2). Cell

**Fig. 3**

Effect of 1,3,4-thiadiazolium derivatives on the proliferation of B16-F10 cells. (A) Effect of MI-J. (B) Effect of MI-2,4diF. (C) Effect of MI-4F. The proliferation rate was measured by the MTT method at indicated times and concentrations (2.5–25  $\mu\text{M}$ ).  $n = 3$ . Results are expressed as mean  $\pm$  SD values. \* $p < 0.05$ .

growth was completely inhibited during the 72 h of the experiment at this concentration, confirming results previously obtained for this compound [28]. As was observed with the viability results, none of the tested mesoionic compounds was shown to be more effective than MI-D in inhibiting cell growth at 10  $\mu\text{M}$  (Table 2) or other concentrations [28].

#### Effects on an *in vivo* melanoma model

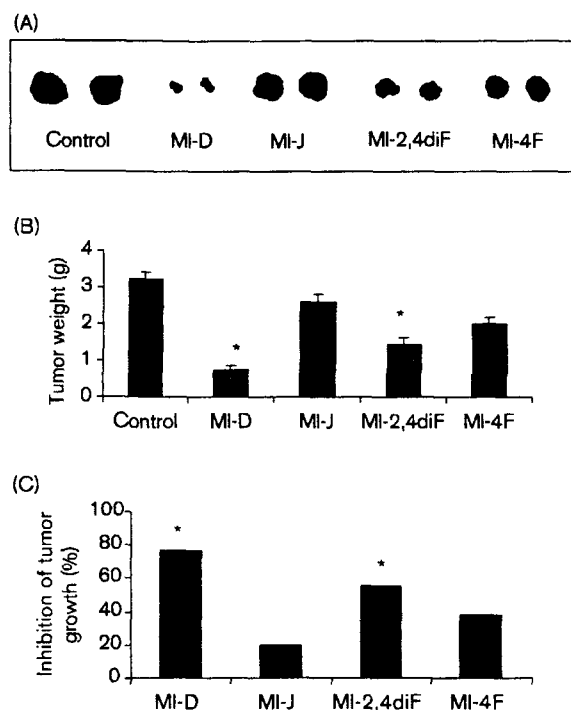
Figure 4 permits comparison of the *in vivo* effects of MI-D, MI-J, MI-2,4diF and MI-4F against B16-F10 melanoma cells growing on C57BL/6 mice, as evaluated as a single i.p. dose of 57  $\mu\text{mol/kg}$  administered 24 h after cell

**Table 2** B16-F10 growth (% of control) during 1,3,4-thiadiazolium derivatives treatment at 10  $\mu$ M

| Derivative | Time (h)                 |                          |                          |
|------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|            | 24                       | 48                       | 72                       |
| MI-D       | 0 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup> | 0 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup> | 1 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup> |
| MI-J       | 90 $\pm$ 4.6             | 94 $\pm$ 3.5             | 93 $\pm$ 12.9            |
| MI-2,4diF  | 89 $\pm$ 10.5            | 89 $\pm$ 15              | 82 $\pm$ 3.8             |
| MI-4F      | 91 $\pm$ 12.8            | 95 $\pm$ 19              | 92 $\pm$ 5.1             |

Assays were carried out as described in Materials and methods. Results are expressed as mean  $\pm$  SD values.

<sup>a</sup> $P < 0.05$ .

**Fig. 4**

Effect of 1,3,4-thiadiazolium derivatives on inhibition of tumor growth. (A) Representative excised tumors from control animals and treated animals. (B) Tumor weight of mesoionic derivative-treated mice. (C) Inhibition (%) of tumor growth. B16-F10 melanoma cells were injected s.c. into C57BL/6 mice, each receiving a single dose of 57  $\mu$ mol/kg of the drug i.p., 24 h following cell injection. Control groups received the drug vehicle with the same volume as for treated animals. Animals were sacrificed after 17 days and the tumor weight was determined. The inhibition of tumor growth was determined as previously described [31,32]. (MI-D,  $n=5$ ; MI-J,  $n=7$ ; MI-2,4diF,  $n=5$ ; MI-4F,  $n=6$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM values. \* $p < 0.05$ .

inoculation. Animals from the control group received the same volume of solvent (sunflower oil) as that used for the drug treatment injection. Figure 4(A) represents tumors excised on the 17th day after treatment with mesoionic compounds. The mean weight of tumors and inhibition of tumor growth are shown in Figure 4(B and C, respectively). The *in vivo* development and growth of B16-F10 melanoma were not modified by the treatment using MI-J. For MI-4F, a reproducible tendency to inhibit *in vivo* tumor growth was observed in spite of not being

statistically significant (Fig. 4C). The *in vivo* tumor growth responded to MI-2,4diF and MI-D. The results of *in vivo* assays involving MI-2,4diF showed an inhibition of tumor growth of 55 and 77% for MI-D. This experiment demonstrated that as has been already shown for MI-D [28], MI-2,4diF has a significant anti-tumor activity against melanoma. The results are in accord with those under *in vitro* conditions that pointed to MI-D as being the most active and MI-J as being ineffective.

## Discussion

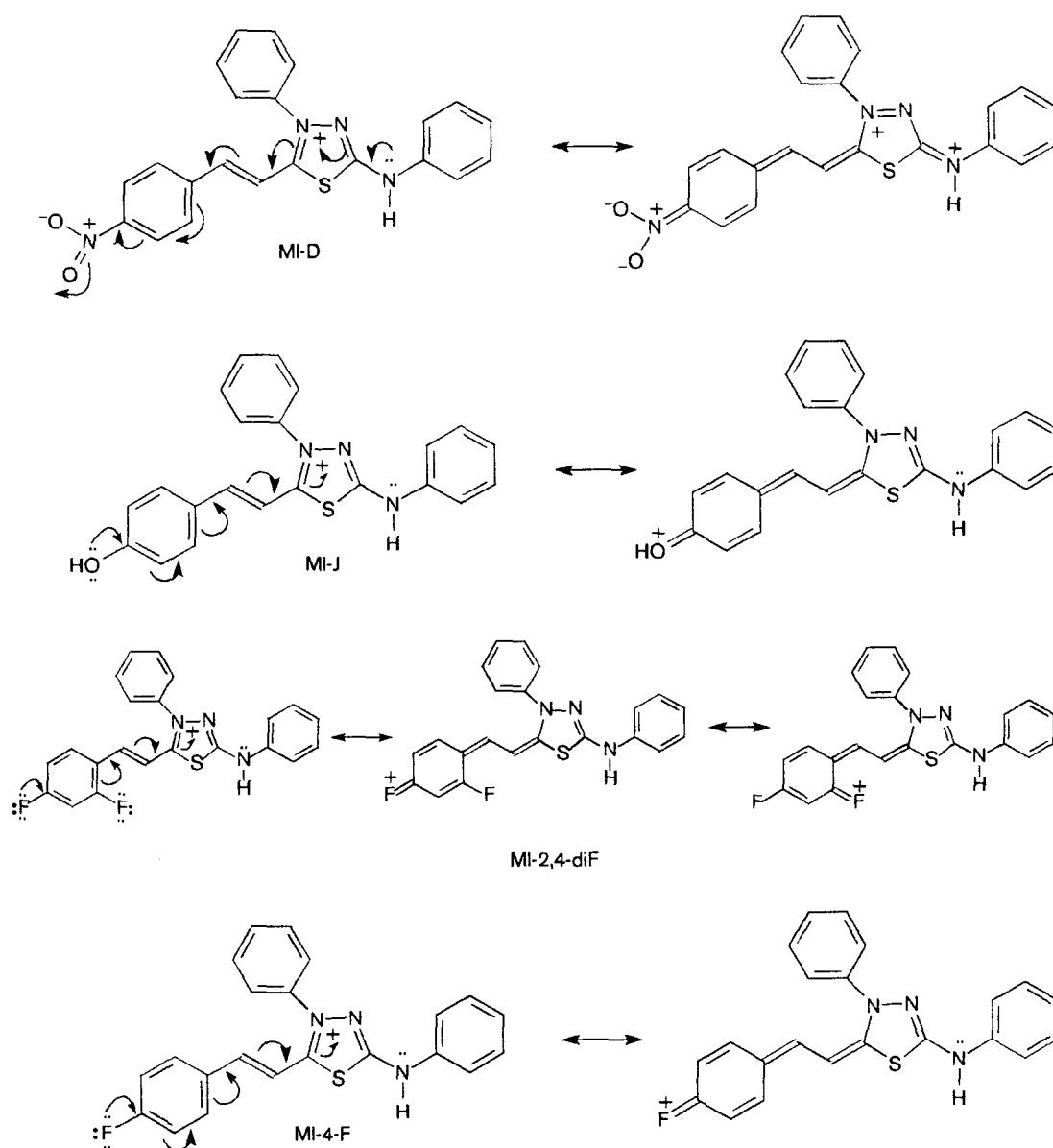
We have studied a series of 1,3,4-thiadiazolium compounds in search of anti-melanoma activity and performed a SAR analysis. The requirement is that for a set of congeneric molecules, which incorporated a small substructural modification with the same pharmacophoric group, it must be capable of disclosing any structure activity relationship [33]. This approach often involves the synthesis of analogs containing a range of substituents on aromatic or heteroaromatic ring or accessible functional groups. Thus, the drug effects obtained using SAR for MI-D, MI-J, MI-2,4diF and MI-4F (Fig. 1) were determined against B16-F10 melanoma cells. It has been recently demonstrated that MI-D is a potent drug against the murine melanoma model B16-F10, showing a better activity than fotemustin and dacarbazine, which are anti-neoplastics used for treatment of melanoma patients [28]. Compounds that differ from MI-D at the cinnamoyl substituent, such as MI-2,4diF and MI-4F, are shown to have activity against B16-F10 melanoma cells, although none of them are as effective as MI-D.

Comparing the cell viability results, MI-D at a concentration of 50  $\mu$ M showed a maximum cytotoxic effect (around 100%) after 24 h of treatment (Table 1); MI-2,4diF, under these conditions resulted in 50% of viable cells (Fig. 2B). MI-D showed 100% of the cytotoxic effect with 25  $\mu$ M after 48 h [28]. At this concentration and time of incubation, MI-2,4diF and MI-4F gave rise to a viability of 70 and 53%, respectively (Fig. 2B and C).

Observing the growth of B16-F10 cells in the presence of MI-2,4diF and MI-4F (Fig. 3), the values obtained for MI-D could not be surpassed (Table 2). Only a concentration of 25  $\mu$ M was able to inhibit the growth of melanoma cells when the fluorine-substituted compounds were tested (Fig. 3B and C). MI-D at 10  $\mu$ M did not allow cell growth over the 72 h of the experiment (Table 2); and when it was used at 2.5 and 5  $\mu$ M, a large inhibition of cell growth was also observed [28].

When the mesoionic compounds were tested *in vivo*, the *in vitro* effectiveness of MI-D was confirmed. MI-4F had a slightly better effect than MI-2,4diF *in vitro*, but *in vivo* MI-2,4diF was able to inhibit tumor growth and MI-4F did not show a significant effect (Fig. 4). This result

Fig. 5



Resonance structures of 1,3,4-thiadiazoles derivatives: MI-D, MI-J, MI-2,4diF and MI-4F.

may be due to the effects of the presence of two fluorines that can make a more hydrophobic molecule allowing it to cross membranes easily.

Although the mesoionic compound MI-J has a structure related to that of MI-D, differing only at the cinnamoyl substituent, it did not show any effect on melanoma cells both *in vitro* and *in vivo* under the experimental conditions. The electronic effects influence the charge distribution of the heterocyclic ring, so that when the electronic nature of substituents is considered, MI-J is

the only one that has an electron-release group (OH), which reduces the positive charge on the heterocyclic ring (Fig. 5). On the other hand, MI-D, MI-4F and MI-2,4diF, contain electron-withdrawing groups (NO<sub>2</sub> and F) which increase the positive charge on the mesoionic ring (Fig. 5). However, the F substituent gives rise to an electron-donor effect by resonance and, since it is an electron-withdrawing group by an inductive effect, these characteristics result in F being a less effective electron-acceptor group when compared to NO<sub>2</sub>. Moreover, the combination of the electronic and lipophilic parameters,

expressed by Hammett substituent ( $\sigma$ ) and Hansch hydrophobicity constants ( $\pi$ ) [34], may be required for biological activity versus structure. The most active derivative MI-D has  $\sigma_{\text{NO}_2} = 0.78$  and  $\pi_{\text{NO}_2} = -0.28$ , whereas MI-J  $\sigma_{\text{OH}} = -0.37$  and  $\pi_{\text{OH}} = -0.67$ . MI-2,4diF shows  $\sigma_{\text{diF}} = 0.40$  and  $\pi_{\text{diF}} = 0.28$ , indicating a different combination of these effects.

It was shown for this class of mesoionic compounds that electron-withdrawing groups allow an extensive conjugation of the side-chain with the exocyclic moiety [22]. As the compound substituted with the stronger electron-withdrawing group (MI-D) gave more desirable biological effects, we now suggest that this conjugation is important for anti-tumor activity of these compounds.

### Acknowledgments

We thank Professor Dr R. R. Brentani from the Ludwig Institute for Cancer Research (São Paulo, SP, Brazil) for providing B16-F10 cells.

### References

- Moustafa MAA, Eisa HM. Synthesis and antimicrobial activity of 3-(substituted-phenyl)-sydnones. *Arch Pharm* 1991; **325**:397–401.
- Corell T, Pedersen SB, Lissau B, Moilanen E, Mätsä-Ketelä T, Kankaanranta H, et al. Pharmacology of mesoionic oxatriazole derivatives in blood, cardiovascular and respiratory systems. *Pol J Pharmacol* 1994; **46**:553–566.
- Satyanarayana K, Rao MNA. Synthesis and antiinflammatory, analgesics and antipyretic testing of 4-[1-oxo-(3-substituted aryl)-2-propenyl]-3-phenylsydnones and 3-[4-[3-(substituted aryl)-1-oxo-2-propenyl] phenyl] sydnones. *J Pharm Sci* 1995; **84**:263–266.
- Rehse K, Ciborski T, Müller B. Platelet aggregation inhibiting and anticoagulant effects of oligoamines. XXVII. Inhibition of leucocyte adherence to endothelium by oligoamine RE 1492C and the NO-donor RE 2047. *Arch Pharm (Weinheim)* 1995; **328**:125–126.
- Ollis WD, Ramsden CA. Meso-ionic compounds. *Adv Heterocycl Chem* 1976; **19**:1–121.
- Newton CG, Ramsden CA. Meso-ionic heterocycles. *Tetrahedron* 1982; **38**:2965–3011.
- Moura GLC, Simas AM, Miller J. Mesoionic rings as efficient asymmetric bridges for the design of compounds with large optical nonlinearities. *Chem Phys Lett* 1996; **257**:639–646.
- Cheung KK, Echevarria A, Galembeck S, Maciel MAM, Miller J, Rumjanek VM, et al. Mesoionic compounds 3. Structure of the hydrochloride of 5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine. *Acta Crystallogr* 1992; **48**:1471–1474.
- Echevarria A, Galembeck SE, Maciel MAM, Miller J, Montanari CA, Rumjanek VM, et al. Reaction of aryl chlorides with 1,4-diphenylthiosemicarbazide: formation of both 1,3,4-thiadiazolium-2-aminides and 1,3,4-thiadiazolium-2-thiolate. *Heterocycl Commun* 1996; **1**:129–136.
- Kier LB, Roche EB. Medicinal chemistry of the mesoionic compounds. *J Pharm Sci* 1967; **56**:148–169.
- Badachikar SV, Tikare RK, Puranik GS. Synthesis, reactions and biological activity of 3-[p-(N-methyl/ethyl-N-phenylcarbamoyl)] phenylsydnones. *Indian J Chem* 1986; **25B**:1079–1080.
- Montanari CA, Beezer AE, Sandall JPB, Montanari MLC, Miller J, Giesbrecht AM. On the interaction of some mesoionic compounds with *Saccharomyces cerevisiae* by biological microcalorimetry. *Rev Microbiol* 1992; **23**:274–278.
- Corell T, Pedersen SB, Lissau B, Moilanen E, Mätsä-Ketelä T, Kankaanranta H, et al. Pharmacology of mesoionic oxatriazole derivatives in blood, cardiovascular and respiratory systems. *Pol J Pharmacol* 1994; **46**:553–566.
- Kankaanranta H, Rydell E, Peterson AS, Holm P, Moilanen E, Corell T, et al. Nitric oxide-donating properties of mesoionic 3-aryl substituted oxatriazole-5-imine derivatives. *Br J Pharm* 1996; **117**:401–406.
- Shinzato TO, Grynberg N, Gomes RM, Echevarria A, Miller J. Antitumor activity of new mesoionic compounds against three murine tumors. *Med Sci Res* 1989; **17**:865–866.
- Grynberg N, Gomes R, Shinzato T, Echevarria A, Miller J. Some new aryl sydnones: effects on murine tumors. *Anticancer Res* 1992; **12**:1025–1028.
- Grynberg N, Santos AC, Echevarria A. Synthesis and *in vivo* antitumor activity of new heterocycles derivatives of 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide class. *Anticancer Drugs* 1997; **8**:88–91.
- Majid PA, DeFeyer PJF, VanderWall EE, Wardeh R, Ross JP. Molsidomine in the treatment of patients with angina pectoris. *N Engl J Med* 1980; **302**:1–6.
- Rudolph W, Derschinger J. Clinical comparison of nitrates and sydnominines. *Eur Heart J* 1991; **12**:33–41.
- Rehse K, König P. New NO-donors with antithrombotic and vasodilating activities. XII. Mesoionic oxatriazoles and related monocyclic nitrosohydrazine derivatives. *Arch Pharm* 1995; **328**:137–142.
- Hogg N, Darley-Usmar VM, Wilson MT, Moncada S. Production of hydroxyl radicals from simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J* 1992; **281**:419–424.
- Santos ACS, Echevarria A. Electronic effects on  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of substituted 1,3,4-thiadiazolium salts. *Magn Reson Chem* 2001; **39**:182–186.
- Silva EF, Canto-Cavaleiro MM, Braz VR, Cysne-Finkelstein L, Leon L, Echevarria A. Synthesis and biological evaluation of new 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine derivatives against *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. *Eur J Med Chem* 2002; **37**:979–984.
- Sanchez-Delgado RA, Lazard K, Rincón L, Urbina JA, Hubert ALJ, Noels NA. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 1. Enhancement of the efficacy of clotrimazole against *Trypanosoma cruzi* by complexation to ruthenium  $\text{RuCl}_2(\text{clotrimazole})_2$ . *J Med Chem* 1993; **36**:2041–2043.
- Schavartzapel AJ, Zhong L, Docampo R, Rodrigues JB, Gros EG. Design, synthesis, and biological evaluation of new growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi* (epimastigotes). *J Med Chem* 1997; **40**:2314–2322.
- Cadena SMSC, Carnieri EGS, Echevarria A, Oliveira MBM. Effect of MI-D, a new mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria. *FEBS Lett* 1998; **440**:46–50.
- Cadena SMSC, Carnieri EGS, Echevarria A, Oliveira MBM. Interference of MI-D, a new mesoionic compound, on artificial and native membranes. *Cell Biochem Funct* 2002; **20**:31–37.
- Senff-Ribeiro A, Echevarria A, Silva EF, Veiga SS, Oliveira MBM. Effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on B16-F10 murine melanoma. *Melanoma Res* 2003; **13**: in press.
- Phillips HJ. Dye exclusion tests for cell viability. In: Kruse JR, Patterson JRMK (editors). *Tissue Culture, Methods and Applications*. New York: Academic Press; 1973, pp. 406–408.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; **65**:55–63.
- Blaschek W, Käsbauser J, Kraus J, Franz G. *Phytilium aphanidermatum*: culture, cell-wall composition, and isolation and structure of antitumor storage and solubilised cell-wall (1  $\rightarrow$ 3),(1  $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucans. *Carbohydr Res* 1992; **231**:293–307.
- Ren DL, Wang JZ, Noda H, Amano H, Ogawa S. The effects of an algal polysaccharide from *Gloiopeltis tenax* on transplantable tumors and immune activities in mice. *Planta Med* 1995; **61**:120–125.
- Kubinyi H, Abraham U. Practical problems in PLS analyses. In: Kubinyi H (editor). *3D QSAR in Drug Design. Theory, Methods and Applications*. Leiden: ESCOM; 1993, pp. 717–728.
- Hansch C, Leo A, Hoekman D. *Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic and Steric Constants*. Washington, DC: American Chemical Society; 1995.

**Title Page****Cytotoxic Effect of a new 1,3,4-Thiadiazolium Mesoionic  
Compound (MI-D) on Cell Lines of Human Melanoma**

A. Senff-Ribeiro<sup>a</sup>, A. Echevarria<sup>c</sup>, E.F. Silva<sup>c</sup>, C.R.C. Franco<sup>b</sup>,  
S.S. Veiga<sup>b</sup> and M.B.M. Oliveira<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology and <sup>b</sup>Department of Cellular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil, and <sup>c</sup>Department of Chemistry, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Corresponding Author: M.B.M.Oliveira, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná, Brazil, CEP 81.531-990, CP 19046.

Tel (+55) 41 361 1664; Fax: (+55) 41 266 2042; e-mail: mbmo@ufpr.br

Running Title: Antimelanoma Effect of MI-D

Supported by PRONEX, CAPES, FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA and CNPq.

**Abstract**

The structural characteristics of mesoionic compounds, which contain distinct regions of positive and negative charges associated with a poly-heteroatomic system, enable them to cross cellular membranes and interact strongly with biomolecules. Potential biological applications have been described for mesoionic compounds. MI-D, a new mesoionic compound, has been demonstrated to be extremely cytotoxic to B16-F10 murine melanoma cells when compared to fotemustine and dacarbazine, drugs of reference in melanoma treatment protocols, describing inhibition of tumours grown *in vitro* and *in vivo*. In this study the effects of mesoionic compound MI-D upon different human melanoma cell lines were evaluated. The drug decreased the viability and proliferation of MEL-85, SK-MEL, A2058 and MEWO cell lines *in vitro*, showing a considerable cytotoxic activity on these human cells. Adhesion of MEL-85 cells was evaluated in the presence of the drug using different extracellular matrix (ECM) constituents. MI-D decreased MEL-85 adhesion to laminin, fibronectin and matrigel. The morphology and actin cytoskeleton organization of MEL-85 cells were also modified on MI-D treatment. These results on human melanoma cell lines indicate that MI-D is a very encouraging drug against melanoma, a tumour extremely resistant to chemotherapy.

**Key words:** mesoionic compounds, MI-D, antimelanoma activity, human melanoma cell lines.

## Introduction

Compounds of the mesoionic class have interesting structural features provided by their betaine-like character. They consist of a five-membered heterocyclic ring associated with a sextet of p and  $\pi$  electrons, supporting a partial positive charge in the heterocyclic ring, which is counterbalanced by a formal negative charge on the atom of the  $\alpha$ -side chain (Ollis and Ramsden, 1976; Newton and Ramsden, 1982; Cheung *et al.*, 1992). The association of these characteristics suggests a high probability of strong interactions with biomolecules such as DNA and/or proteins. Although mesoionic compounds are internally charged, they are neutral overall, and can therefore cross biological membranes *in vivo* (Kier and Roche, 1967).

All the different classes of mesoionic compounds (sydnones, sydnonimines, isosydnones and 1,3,4-thiadiazoles) have received considerable attention and have been extensively studied because of their unique structures, reaction behaviour, biological activities and possible pharmaceutical use (Moustafa and Eisa, 1991; Corell *et al.*, 1994; Satyanarayana and Rao, 1995; Rehse *et al.*, 1995). These include antiinflammatory, analgesic, antibacterial, antifungal and antitumour activities (Moustafa and Eisa, 1991; Satyanarayana and Rao, 1995; Badachikar *et al.*, 1986; Montanari *et al.*, 1992; Shinzato *et al.*, 1989; Grynberg *et al.*, 1992; Grynberg *et al.*, 1997; Senff-Rbeiro *et al.*, 2003; Senff-Rbeiro *et al.*, 2004). Potent antiplatelet, fibrinolytic, thrombolytic and broncholytic effects (Corell *et al.*, 1994; Kankaanranta *et al.*, 1996) and also effects on the cardiovascular system (Rehse *et al.*, 1995; Majid *et al.*, 1980; Rudolph and Derschinger, 1991; Rehse and Konig, 1995) have been described

for mesoionic compounds. Some effects described for these compounds are intimately related to the presence of specific substituent groups on the ring (Corell *et al.*, 1994; Satyanarayana and Rao, 1995; Kankaanranta *et al.*, 1996; Grynberg *et al.*, 1997) or to the ability to release nitric oxide from their molecules structures (Hogg *et al.*, 1992).

A new mesoionic compound, 4-phenyl-5-(4-nitrocinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride (MI-D) was synthesized by Grynberg *et al.* (1997) (Figure 1), for which it was shown the enhancement of the survival of Ehrlich carcinoma and Sarcoma-180 tumour-bearing mice, preventing tumour growth, with no significant concomitant alterations in the hematological parameters of tested animals, at a dose of 25 mg/kg (57  $\mu$ mols/kg).

MI-D was shown to be able to inhibit the respiratory chain between complexes II and III, collapse the transmembrane potential and stimulate ATPase activity in intact mitochondria (Cadena *et al.*, 1998). Alterations were also reported in membrane permeability and fluidity, which are related to its effect on the energy-linked functions of mitochondria (Cadena *et al.*, 2002).

Recent studies from our laboratory evaluating a series of 1,3,4-thiadiazolium mesoionics showed that MI-D, which is NO<sub>2</sub> substituted in the cinnamoyl ring, was the most effective against the melanoma murine model B16-F10 (Senff-Ribeiro *et al.*, 2004). Compared with two other antineoplastic agents (fotemustine and dacarbazine), it was effective against the murine model both *in vitro* and *in vivo*, under the same experimental conditions and with the same molar concentrations (Senff-Ribeiro *et al.*, 2003).



Although antitumour effects against Ehrlich and Sarcoma-180 tumour models, and even against the aggressive melanoma murine model B16-F10, have already been demonstrated for MI-D (Grynberg *et al.*, 1997; Senff-Ribeiro *et al.*, 2003; Senff-Ribeiro *et al.*, 2004), it has not been tested against human melanoma cell lines.

We now study the effects of MI-D on four established human melanoma cell lines: MEL-85, SK-MEL, A2058 and MEWO. The *in vitro* viabilities and proliferations of these cell lines in the presence of MI-D were evaluated. In order to obtain further insights concerning MI-D's anti-melanoma activity, cell features of adhesion, morphology and actin cytoskeleton organization, which are deeply related to the development and establishment of tumours, were also subjects studied using the MEL-85 cell line.

## **Materials and Methods**

### **Materials**

MI-D (4-phenyl-5-(4-nitro-cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride) was synthesized in the Department of Chemistry of the Rural Federal University of Rio de Janeiro, Brazil, as described elsewhere (Grynberg *et al.*, 1997). Its structure was confirmed by <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy and mass spectrometry. Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), RPMI1640 medium and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Cultilab (Campinas, Brazil); penicillin and gentamycin were both purchased from GIBCO (Bethesda, USA). Paraformaldehyde (20%, aqueous solution) was from E.M.S. (Electron Microscopy Sciences, Washington, USA). Phalloidin labeled with FITC was from Molecular Probes (Eugene, USA) and the aqueous mounting medium, Fluormount-G® from E.M.S. (Washington, USA). Trypan blue, MTT, crystal violet and glycine were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). DMSO was from Merck. All other reagents were commercial products of the highest available purity grade.

### **Drug Solutions**

MI-D was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) for its experimental use. In order to minimize solvent interference, several stock solutions of MI-D were prepared so that at the desired final concentrations of MI-D in the assays, the amounts of DMSO were the same and equal to 0.12%.

## **Cell Lines and Culture Conditions**

Human melanoma cell lines used in this study were kindly provided by the Ludwig Institute for Cancer Research (São Paulo, Brazil). Cells were maintained in liquid nitrogen with a low number of passages. After thawing, the cells were grown in monolayer cultures in the appropriate media containing penicillin (100 units/ml) and gentamicin (50 µg/ml). MEL-85 and MEWO cells were cultured in RPMI containing 10% FBS, SK-MEL cells in RPMI containing 15% FBS and A2058 cells in DMEM containing 10% FBS. The cultures were kept at 37°C under a humidified atmosphere plus 5% CO<sub>2</sub>. Release of cells was performed by a treatment for a few minutes with a 2 mM solution of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in phosphate buffered saline (PBS). After being counted, cells were then resuspended in an adequate volume of the respective medium supplemented with FBS and again plated in the presence or absence of MI-D.

## **Cell Viability Assay**

Viability assays were carried out on 24-well plates (TPP, Trasadingen, Switzerland). Human melanoma cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) were plated and allowed to adhere and grown for 20 h before incubation with the drug. MI-D was added in varying concentrations up to 75 µM. At each determined interval (24 and 48 h), supernatants and cells were harvested, centrifuged, washed with PBS and the viability was measured by the Trypan blue exclusion assay (Phillips, 1973). Briefly, Trypan blue (0.4% in PBS, pH 7.4) was added to the cell suspension and the number of viable (unstained) and non-viable (stained)

cells was counted using a Neubauer Chamber. For control experiments, the appropriate medium contained adequate amounts of vehicle (0.12% of DMSO). Cell viability of controls was normalized to 100%.

### **Cell Proliferation Assay**

Human melanoma cells ( $6 \times 10^3$  cells/well) were grown for 16 h on 96-well plates (TPP) containing appropriate medium supplemented with an adequate amount of FBS. The medium was then replaced by serum-free one. After 24 h, this was replaced with the respective medium containing the usual concentrations of FBS plus MI-D at different concentrations (2.5 – 25  $\mu$ M) in quadruplicate. Controls consisted of the respective medium alone or in the presence of 0.12% DMSO, which was the MI-D solvent. After 24, 48 and 72 h the number of cells in each well was determined using the MTT method (Mosmann, 1983). MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] was dissolved in HBSS (Hanks's balanced saline solution) at 5 mg/ml. At the above intervals, 20  $\mu$ l of the MTT solution were added to each well and the plates were incubated at 37°C for 3 h. The MTT solution was removed and DMSO was added and mixed thoroughly to dissolve the dark blue crystals. The plates were then read using a Microelisa Reader (Bio-Rad, Madison, USA) at 550 nm for sample and 655 nm for reference. Results are expressed as the cell number, which was determined using a standard curve of cells against absorbance.

### **Cell Adhesion Assay**

Native fibronectin was purified from fresh human plasma according to the procedure of Engvall and Ruoslahti (1977). Laminin and matrigel, a reconstituted basement membrane, were purified from a Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) tumour as described by Paulsson et al. (1987) and Kleinman et al. (1986), respectively. The presence and purity of proteins were assessed by both electrophoretic analysis on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western-blot. Adhesion assays were performed as described by Saiki et al. (1989) with some modifications. Briefly, MEL-85 cells ( $4 \times 10^4$ ) with or without MI-D (0.5, 1.0, 2.5 and 5.0  $\mu\text{M}$ ) were added to microculture wells (96-well plates, TPP) precoated with fibronectin, laminin or matrigel (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and blocked with bovine serum albumine (BSA) 1%. The cultures were incubated at 37°C for 2 h. The wells were washed twice with warm PBS to remove unattached cells, and then the attached cells were fixed with methanol and stained with 0.8% crystal violet dissolved in 20% ethanol. After extensive washing with PBS, the dye was eluted with 50% ethanol in 0.05 M sodium citrate and the absorbance was measured at 550 nm using a MicroElisa Reader (BioRad). At the end of the experiment, the plates were photographed (Leica-MPS30) using an inverted microscope (Leica-DMIL). Cellular adhesion of the control was normalized to 100%.

### **Cell Morphology Analysis**

MEL-85 cells were cultured on glass cover slides for 16 h at 37°C under a humidified atmosphere plus 5%  $\text{CO}_2$ . Cells were treated with 25  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$

MI-D for 2 h. After treatment, they were washed twice with PBS and fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 30 min at 4°C. For the control, the appropriate medium contained adequate amounts of vehicle (0.12% of DMSO). Cover slides were stained by Giemsa and studied by bright field microscopy (Olympus BX40). Images were acquired (x400) in grayscale using the software Image-Plus 4.0 version (Media Cybernetics, Silver Spring, USA). A morphometric analysis was performed using ImageTool software 3.00 version (University of Texas Health Science Center in San Antonio, USA). Cell features, such as area, elongation and roundness of about 400 cells were analysed. The area of the object, measured as the number of pixels in the polygon was converted to % to analyse. Elongation was measured as the ratio of the length of the major axis to the length of the minor axis. The result was a value of between 0 and 1 that was converted to % to analyse. Roundness was computed as:  $(4\pi \times \text{area}) / \text{perimeter}^2$ . The result gave a value of between 0 and 1 that was converted to % to analyse.

### **Immunofluorescence Microscopy**

MEL-85 cells ( $5 \times 10^4$ ) were plated on glass cover slides (13 mm diameter), which were prepared for confocal immunofluorescence microscopy. After 16 h, MEL-85 cells were incubated with 50  $\mu\text{M}$  MI-D for 2 h at 37°C under a humidified atmosphere plus 5%  $\text{CO}_2$ . In control, the appropriate medium contained adequate amounts of vehicle (0.12% of DMSO). Cells were washed twice with PBS and fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 30 min at 4°C. Cells on cover slides were incubated with glycine 0.1 M for 3 min, washed with

PBS and then blocked with PBS containing 1% BSA for 30 min at room temperature (25°C). After washing thrice with PBS, cover slides were incubated with phalloidine conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Molecular Probes) diluted in PBS (1:200) for 20 min. After washing with PBS (x10) and once in water, slides were mounted with Fluormont-G®. Cells were observed using a confocal fluorescence microscope (Confocal Radiance 2100, Bio-Rad) coupled to a Nikon Eclipse 800 with plan apochromatic objectives (Science and Technologies Group Instruments Division, Melville, USA). Images were acquired (x600) using Radiance 2100 (Bio-Rad).

### **Statistical Analysis**

Statistical analysis of data were carried out using analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test for average comparison. Mean  $\pm$  S.D. values were used. Significance was defined as  $P < 0.05$ .

## Results

### Effect of MI-D on Cell Viability

Figure 2 shows the effect of the mesoionic compound on the viability of human melanoma cell lines evaluated 24 and 48 h after treatment with different concentrations of MI-D (2.5 – 75  $\mu$ M). Time- and dose-dependent effects were shown by MI-D on the four cell lines studied.

The viability of MEL-85 cells was reduced to 56% after a 24 h treatment with 10  $\mu$ M MI-D (Figure 2A). At this time of incubation, 75  $\mu$ M MI-D diminished the viability by ~82%. When a treatment of 48 h was used, the maximum cytotoxic effect (100 %) was reached starting from 50  $\mu$ M. 5  $\mu$ M MI-D reduced the number of viable cells to 27% after 48 h incubation.

SK-MEL cells also had their viability diminished by MI-D treatment (Figure 2B). After 24 h, 25  $\mu$ M MI-D reduced the viability to ~30% and at 50  $\mu$ M to 17%. When the concentration was raised to 75  $\mu$ M, there were no viable cells after 24 h incubation. 10  $\mu$ M MI-D reduced the viability to 30% after 48 h. At this time, there was more than 90% of cell death using 50  $\mu$ M MI-D.

The viability of A2058 cells was decreased to ~30% when the concentration of MI-D was 10  $\mu$ M and the incubation time was 24 h (Figure 2C). At this time the concentrations of 25 and 50  $\mu$ M reduced the number of viable cells to 12% and 7%, respectively. When a 48 h incubation was assayed, 10  $\mu$ M MI-D reduced the viability to 20% and 25  $\mu$ M almost gave a maximum cytotoxic effect (97%). At this time, all A2058 cells were dead when the concentration of MI-D was 50  $\mu$ M.



MEWO cells were also very sensitive to the toxic effects of MI-D (Figure 2D). After 24 h, MI-D at 10  $\mu$ M and 25  $\mu$ M concentrations, diminished the viability to 23% and 8%, respectively. Increasing the drug concentration to 75  $\mu$ M resulted in only ~1% of viable cells after 24 h. When a 48 h treatment was performed 10  $\mu$ M MI-D reduced the number of viable cells to 13% while 50  $\mu$ M gave rise to ~100% cell death.

### **Effect of MI-D on Cell Growth**

Evaluation of the MI-D effects on the growth of human melanoma cell lines was performed using a growth-time kinetic study of up to 72 h (Figure 3). Proliferation of all melanoma cell lines was greatly inhibited by MI-D, even when subcytotoxic concentrations (1 - 2.5  $\mu$ M) were tested.

MEL-85 cells (Figure 3A) treated with 5  $\mu$ M MI-D gave a 50% reduction of cell growth during the 72 h of experiment. At a concentration of 10  $\mu$ M, the proliferation of MEL-85 cells was completely inhibited.

No growth of SK-MEL cells (Figure 3B) was observed when 5  $\mu$ M MI-D was used. After 24 h, 1  $\mu$ M and 2.5  $\mu$ M MI-D reduced the number of cells to ~65% and ~55%, respectively.

A2058 cells (Figure 3C) had their growth reduced to 55-61% when the concentration was 2.5  $\mu$ M. When MI-D was used at 5  $\mu$ M, there was no increase in cell number up to 48 h. However, at 72 h there was a recovery and the number of cells increased, being 46% of the control.

The proliferation of MEWO cells was inhibited by MI-D (Figure 3D). At a low MI-D dose (2.5  $\mu$ M) a decrease of cell number of a quarter after 48 and 72

h was observed. The concentration of 5  $\mu\text{M}$  allowed a cell growth up to 24 h, but then there was no increase in cell number up to 72 h. 10  $\mu\text{M}$  MI-D did not allow MEWO growth. It must be pointed out that all cell lines, when exposed to MI-D at 10  $\mu\text{M}$  or up, did not grow and extensive cell death was observed, confirming the previous data appearing in Figure 2.

#### **Effect of MI-D on MEL-85 Adhesion to Laminin, Fibronectin and Matrigel**

Figure 4 shows the effects of MI-D on MEL-85 adhesion to extracellular matrix (ECM) constituents, such as laminin, fibronectin and matrigel. Although there were apparent decreases on cell adhesion when 0.5 and 1  $\mu\text{M}$  of MI-D were used, the values were not statistically different from those of the controls. Higher concentrations of MI-D significantly inhibited MEL-85 adhesion to ECM molecules in a concentration-dependent manner. Adhesion to laminin and fibronectin was decreased to 70% and 55% by 2.5  $\mu\text{M}$  and 5  $\mu\text{M}$  of MI-D, respectively, after 2 h exposure (Figures 4A and 4B). At 5  $\mu\text{M}$ , MI-D diminished MEL-85 adhesion to laminin to ~65% (Figure 4A) and to fibronectin and matrigel to 34% and 71%, respectively (Figures 4B and 4C). The micrographs of the adhesion on fibronectin (Figure 4D) show that MI-D not only reduced the number of cells adhering to fibronectin, but it also altered the morphology of MEL-85 cells, which shrank and became round. These changes were also observed when cells were assayed for their adhesion on laminin and matrigel (data not shown).

### **Effect of MI-D on MEL-85 Morphology**

Figure 5 shows micrographs of MEL-85 cells stained by Giemsa. It can be observed with treated cells (Figure 5B and 5C) that the presence of MI-D gave rise to a disruption of the interactions between cells and substratum. MI-D treated cells are not so spread out as control cells (Figure 5A). The results clearly demonstrate significant changes in cell shape, with cells becoming round when compared to those of the control, as it was also observed in adhesion assays. The treatment with 25  $\mu\text{M}$  MI-D gave rise to shrinkage of some cells, presenting protusions of the plasma membrane, which were pinched off to form membrane-enclosed similar apoptotic bodies probably containing cytoplasmic and nuclear contents. Intense vacuolization of cytoplasm was observed with treated cells. The concentration of 50  $\mu\text{M}$  affected the morphology of almost all cells. Condensed chromatin masses with intense eosinophilia and pyknotic nuclei were also observed with treated cells. Morphometric analysis permitted quantification of morphological changes and showed a reduction of 35% in the area of cells treated with 50  $\mu\text{M}$  MI-D. This concentration reduced cell elongation to 56% and increased cell roundness by 112%.

### **Effect of MI-D on MEL-85 Cytoskeleton Organization**

In order to evaluate if the changes on cell shape were due to alterations on the actin organization, an experiment using phalloidin-FITC conjugate was performed (Kusano *et al.*, 2000). As can be observed in Figure 6, organization of actin cytoskeleton was completely disturbed by MI-D treatment.

Fluorescence labeling of MEL-85 cells treated with MI-D did not present the overall pattern that was observed in control cells, which showed a considerable organization of F-actin fibers all over the cell body. MI-D treatment induced a reorganization of F-actin cytoskeleton architecture. Cells in the presence of MI-D did not spread and the filamentous structures disassembled or were reorganized to accumulate in the submembraneous area. Actin filaments turned into actin granules mainly localized on the edge of MEL-85 cells. These results point to a disruption of interactions between cells and the extracellular matrix.

## Discussion

We are now able to show that MI-D has considerable cytotoxic and antiproliferative effects on human melanoma cell lines. These effects seem to be even more aggressive on human melanoma cells than those observed on B16-F10 murine melanoma cells (Senff-Ribeiro *et al.*, 2003; Senff-Ribeiro *et al.*, 2004). Interestingly, MI-D at a low concentration (5  $\mu$ M) gave rise to effects of a different magnitude on the viabilities of human melanoma cells. Under this condition, MEL-85 and MEWO cell lines (Figures 2A and 2D) were more sensitive to MI-D than SK-MEL and A2058 (Figures 2B and 2C). Inhibitions of different magnitude on the cell growth of different human melanoma cell lines were also observed. The concentration of 5  $\mu$ M allowed MEL-85 growth at a lower rate than that of the control (Figure 3A), but completely inhibited the growth of SK-MEL cells (Figure 3B). The effects of MI-D on the viability and proliferation of the various human melanoma cell lines show MI-D to be a toxic drug for human melanoma cells.

Since tumour cell adhesion to ECM constituents is a fundamental step in tumour development and invasion (Mishima *et al.*, 1998), we investigated the effect of MI-D on MEL-85 melanoma cells adhesion to laminin, fibronectin and matrigel. Low MI-D doses were used in order to minimize its extensive metabolic effects, so that the drug was used at subcytotoxic concentration to evaluate MEL-85 adhesion to ECM. 5  $\mu$ M MI-D caused a slightly decrease of ~5% on MEL-85 viability after 2 h. Under such an experimental condition, MI-D was able to inhibit cell adhesion when it was incubated with the cells for 2 h. Analyzing the images of experiments (Figure 4D), we can observe that MI-D

treatment promoted loss of cell spreading, which became round, suggesting a possible activity of MI-D on cytoskeleton organization. These observations were confirmed by morphological and F-actin analyses. Loss of overall cell shape accompanied by cell shrinkage, membrane blebbing and chromatin condensation, besides disturbance of the cytoskeleton organization, are often observed on apoptotic cells (Hengartner, 2000). The effects of MI-D on MEL-85 adhesion on ECM and morphology may be related to its cytotoxic activity.

MI-D is an uncoupler of mitochondrial phosphorylation (Cadena *et al.*, 1998), whose effects on membranes have been recognized (Cadena *et al.*, 2002). MI-D is also an inhibitor of cyclooxygenase-2 (COX-2) (unpublished data), so that it shares some properties with anti-inflammatory drugs. It is meaningful that the recent demonstration that COX-2 is constitutively expressed in human malignant melanomas and that it may be involved in regulation of melanoma invasiveness (Denkert *et al.*, 2001; Kakiuchi *et al.*, 2002). COX-2 has been established as a tumour marker for melanoma of potential interest for targeting therapeutics (Nettelbeck *et al.*, 2003; Duff *et al.*, 2003). Moreover, COX-2 inhibitors seem to decrease the expressions of some adhesion molecules, as those involved in leukocyte adhesions during immunological and inflammatory responses (Sakai, 1996; Gomes-Gavero *et al.*, 2002) so that such an effect on melanoma cells cannot be ruled out. This attractive possibility remains to be clarified and must be extensively studied.

In conclusion, MI-D is a potent drug against human melanoma cells. Besides its cytotoxic properties, MI-D also interferes in cell features involved in tumour development, such as adhesion to ECM components. These results

combined with previous data (Senff-Ribeiro *et al.*, 2003; Senff-Ribeiro *et al.*, 2004) that shown MI-D as a potent drug against B16-F10 murine melanoma *in vitro* and *in vivo*, emphasise that MI-D could be a promising drug for treatment and study of melanoma.

**Acknowledgements**

We thank Prof. Dr. R. R. Brentani, Ludwig Institute for Cancer Research (São Paulo, SP, Brazil), for providing the human melanoma cell lines used in our study.



## References

Badachikar SV, Tikare RK, Puranik GS (1986) Synthesis, reactions and biological activity of 3-[*p*-(*N*-methyl/ethyl-*N*-phenylcarbamoyl)] phenylsydnones. *Indian J Chem* **25B**: 1079-1080.

Cadena SMSC, Carnieri, EGS, Echevarria A, Oliveira MBM (1998) Effect of MI-D, a new mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria. *FEBS Lett* **440**: 46-50.

Cadena SMSC, Carnieri EGS, Echevarria A, Oliveira MBM (2002) Interference of MI-D, a new mesoionic compound, on artificial and native membranes. *Cell Biochem Funct* **20**: 31-37.

Cheung KK, Echevarria A, Galembeck S, Maciel MAM, Miller J, Rumjanek VM, Simas AM (1992) Mesoionic compounds 3. Structure of the hydrochloride of 5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine. *Acta Crystallogr* **48**: 1471-1474.

Corell T, Pedersen SB, Lissau B, Moilanen E, Mätsä-Ketelä T, Kankaanranta H, Vuorinen P, Vapaatalo H, Rydell E; Andersson R, Marcinkiewicz E, Korbut R, Gryglewski RJ. (1994) Pharmacology of mesoionic oxatriazole derivatives in blood, cardiovascular and respiratory systems. *Pol J Pharmacol* **46**: 553-566.

Denkert C, Kobel M, Berger S, Siegert A, Leclere A, Trefzer U and Hauptmann S (2001) Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. *Cancer Res* **61(1)**: 303-308.

Duff M, Stapleton PP, Mestre JR, Maddali S, Smyth GP, Freeman TA and Daly JM (2003) Cyclooxygenase-2 inhibition improves macrophage function in melanoma and increases the antineoplastic activity of interferon gamma. *Ann Surg Oncol* **10(3)**: 305-313.

Engvall E and Ruoslahti E (1977) Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int J Cancer* **20**: 1-5.

Gomez-Gavira MV, Gonzalez-Alvaro I, Dominguez-Jimenez C, Peschon J, Black RA, Sanchez-Madrid F and Diaz-Gonzalez F (2002) Structure-function relationship and role of tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme in the down-regulation of L-selectin by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* **277(41)**: 38212-38221.

Grynberg N, Gomes R, Shinzato T, Echevarria A, Miller J (1992) Some new aryl sydnone: effects on murine tumors. *Anticancer Res* **12**: 1025-1028.

Grynberg N, Santos AC, Echevarria A (1997) Synthesis and *in vivo* antitumor activity of new heterocycles derivatives of 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide class. *Anti-Cancer Drugs* **8**: 88-91.

Hengartner, MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**: 770-776.

Hogg N, Darley-Usmar VM, Wilson MT, Moncada S (1992) Production of hydroxyl radicals from simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J* **281**: 419-424.

Kakiuchi Y, Tsuji S, Tsuji M, Murata H, Kawai N, Yasumaru M, Kimura A, Komori M, Irie T, Miyoshi E, Sasaki Y, Hayashi N, Kawano S and Hori M (2002) Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. *Cancer Res* **62(5)**: 1567-1572.

Kankaanranta H, Rydell E, Peterson AS, Holm P, Moilanen E, Corell T, Karup G, Vuorinen P, Pedersen SB, Wennmalm A, MetsäKelela T (1996) Nitric oxide-donating properties of mesoionic 3-aryl substituted oxatriazole-5-imine derivatives. *Brit J Pharm* **117**: 401-406.

Kier LB, Roche EB (1967) Medicinal chemistry of the mesoionic compounds. *J Pharm Sci* **56**: 148-169.

Kleinman HK, McGarvey ML, Hassel JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin GR (1986) Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* **25(2)**: 312-318.

Kusano Y, Oguri K, Nagayasu Y, Munesue S, Ishihara M, Saiki I, Yonekura H, Yamamoto H, Okayama M (2000) Participation of syndecan 2 in the induction of stress fiber formation in cooperation with integrin  $\alpha 5\beta 1$ : Structural characteristics of heparan sulfate chains with avidity to COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Exp. Cell Res* **256**: 434-444.

Majid PA, DeFeyter PJF, Van der Wall EE, Wardeh R, Ross JP (1980) Molsidomine in the treatment of patients with angina pectoris. *N Engl J Med* **302**: 1-6.

Mishima T, Murata J, Toyoshima M, Fujii H, Nakajima M, Hayashi T, Kato T, Saiki I (1998) Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from blue-green alga, *Spirulina platensis*. *Clin Exp Metastasis* **16**: 541-550.

Montanari CA, Beezer AE, Sandall JPB, Montanari, MLC, Miller J, Giesbrecht AM (1992) On the interaction of some mesoionic compounds with *Saccharomyces cerevisiae* by biological microcalorimetry. *Rev Microbiol* **23**: 274-278.

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55-63.

Moustafa MAA, Eisa HM (1991) Synthesis and antimicrobial activity of 3-(substituted-phenyl)-sydnones. *Arch Pharm* **325**: 397-401.

Nettelbeck DM, Rivera AA, Davydova J, Dieckmann D, Yamamoto M and Curiel DT (2003) Cyclooxygenase-2 promoter for tumour-specific targeting of adenoviral vectors to melanoma. *Melanoma Res* **13**: 287-292.

Newton CG, Ramsden CA (1982) Meso-ionic heterocycles. *Tetrahedron* **38**: 2965-3011.

Ollis WD, Ramsden CA (1976) Meso-ionic compounds. *Adv Heterocycl Chem* **19**: 1-121.

Paulsson M, Aumailley M, Deutzmann R, Timpl R and Beck R (1987) Laminin-nidogen complex: extraction with chelating agents and structural characterization. *Eur J Biochem* **166**: 11-19.

Phillips, HJ (1973) Dye exclusions tests for cell viability. In: *Tissue culture, methods and applications*, Kruse J.R. and Patterson J.R.M.K. (eds). pp 406-408  
A.P.: New York.

Rehse K, Ciborski T, Müller B (1995) Platelet aggregation inhibiting and anticoagulant effects of oligoamines. XXVII: Inhibition of leucocyte adherence to

endothelium by oligoamine RE 1492C and the NO-donor RE 2047. *Arch Pharm (Weinheim)* **328**: 125-126.

Rehse K, König P (1995) New NO-donors with antithrombotic and vasodilating activities. XII. Mesoionic oxatriazoles and related monocyclic nitrosohydrazine derivatives. *Arch Pharm* **328**: 137-142.

Rudolph W, Derschinger J (1991) Clinical comparison of nitrates and sydnonimines. *Eur Heart J* **12**: 33-41.

Saiki I, Iida J, Murata J, Ogawa R, Nishi N, Sugimura K, Tokura S and Azuma I (1989) Inhibition of the metastasis of murine malignant melanoma by synthetic polymeric peptides containing core sequences of cell-adhesive molecules. *Cancer Res* **49**: 3815-3822.

Sakai A (1996) Diclofenac inhibits endothelial cell adhesion molecule expression induced with lipopolysaccharide. *Life Sci* **58(26)**: 2377-2387.

Satyanarayana K, Rao MNA (1995) Synthesis and antiinflammatory, analgesics and antipyretic testing of 4-[1-oxo-(3-substituted aryl)-2-propenyl]-3-phenylsydnones and of 3-[4-[3-(substituted aryl)-1-oxo-2-propenyl] phenyl] sydnones *J Pharm Sci* **84**: 263-266.

Senff-Ribeiro A, Echevarria A, Silva EF, Veiga SS, Oliveira MBM (2003) Effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on B16-F10 murine melanoma. *Melanoma Res* **13** (5): 465-472.

Senff-Ribeiro A, Echevarria A, Silva EF, Veiga SS, Oliveira MBM (2004) Antimelanoma activity of 1,3,4-thiadiazolium mesoionics: a structure-activity relationship study. *Anti-Cancer Drugs* **15** (3): (in press).

Shinzato TO, Grynberg N, Gomes RM, Echevarria A, Miller J (1989) Antitumor activity of new mesoionic compounds against three murine tumors. *Med Sci Res* **17**: 865-866.

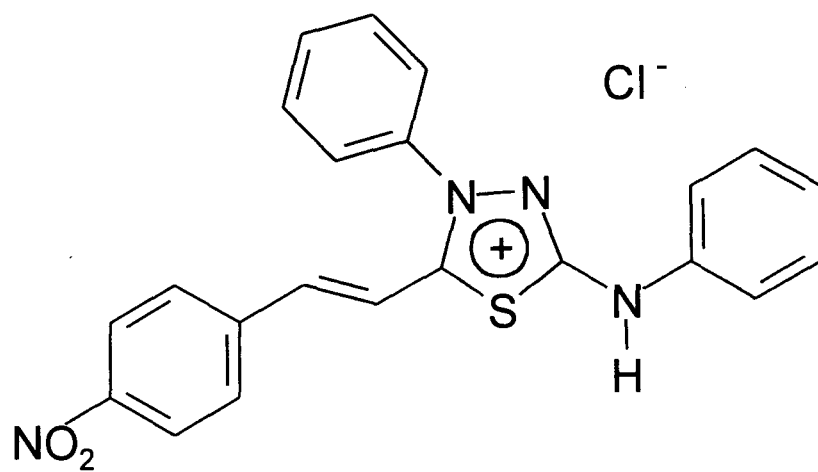


FIGURE 1

SENFF-RIBEIRO et al., 2004



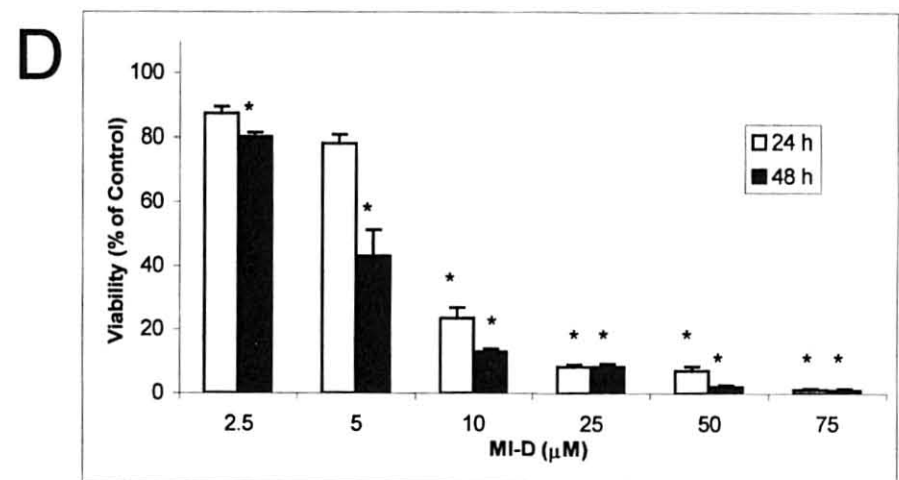
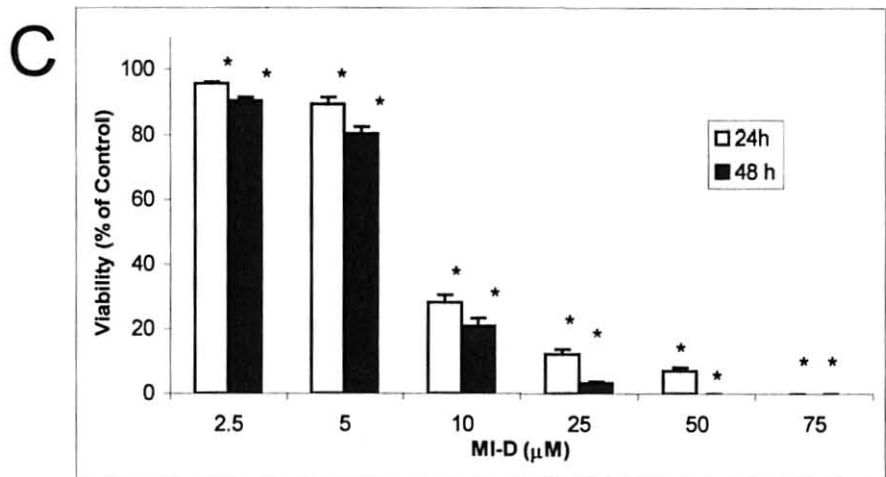
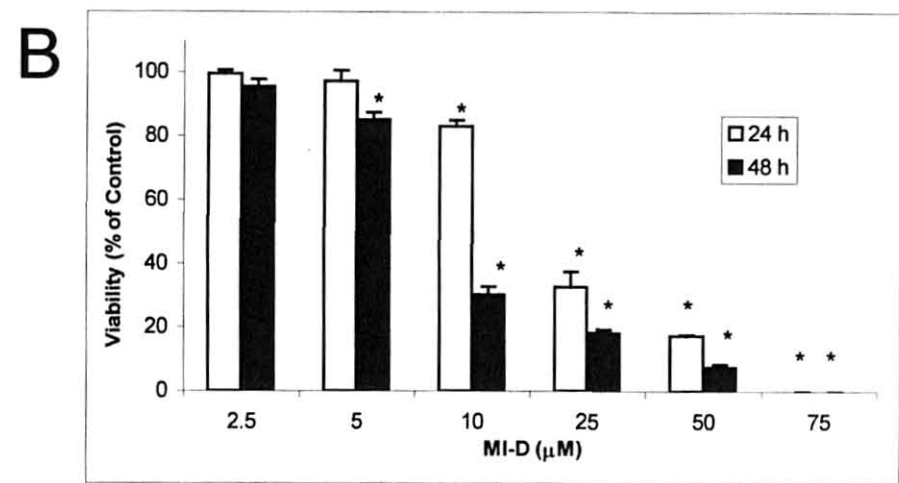
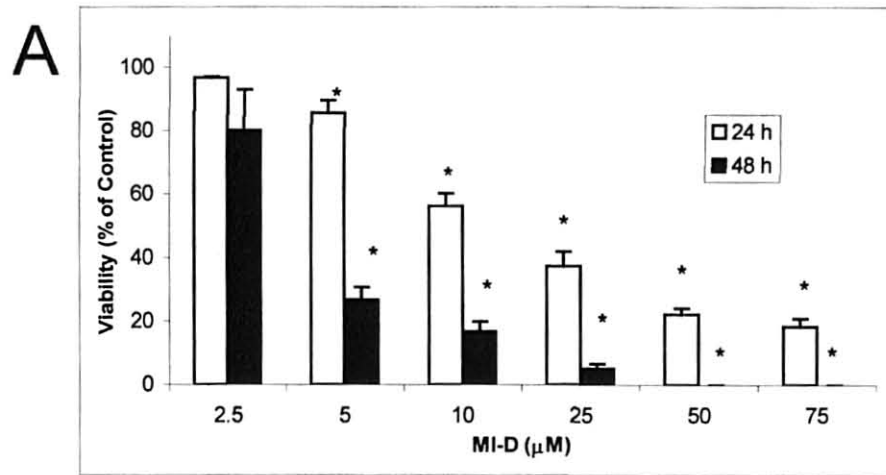


FIGURE 2

SENF-FRIBEIRO et al., 2004

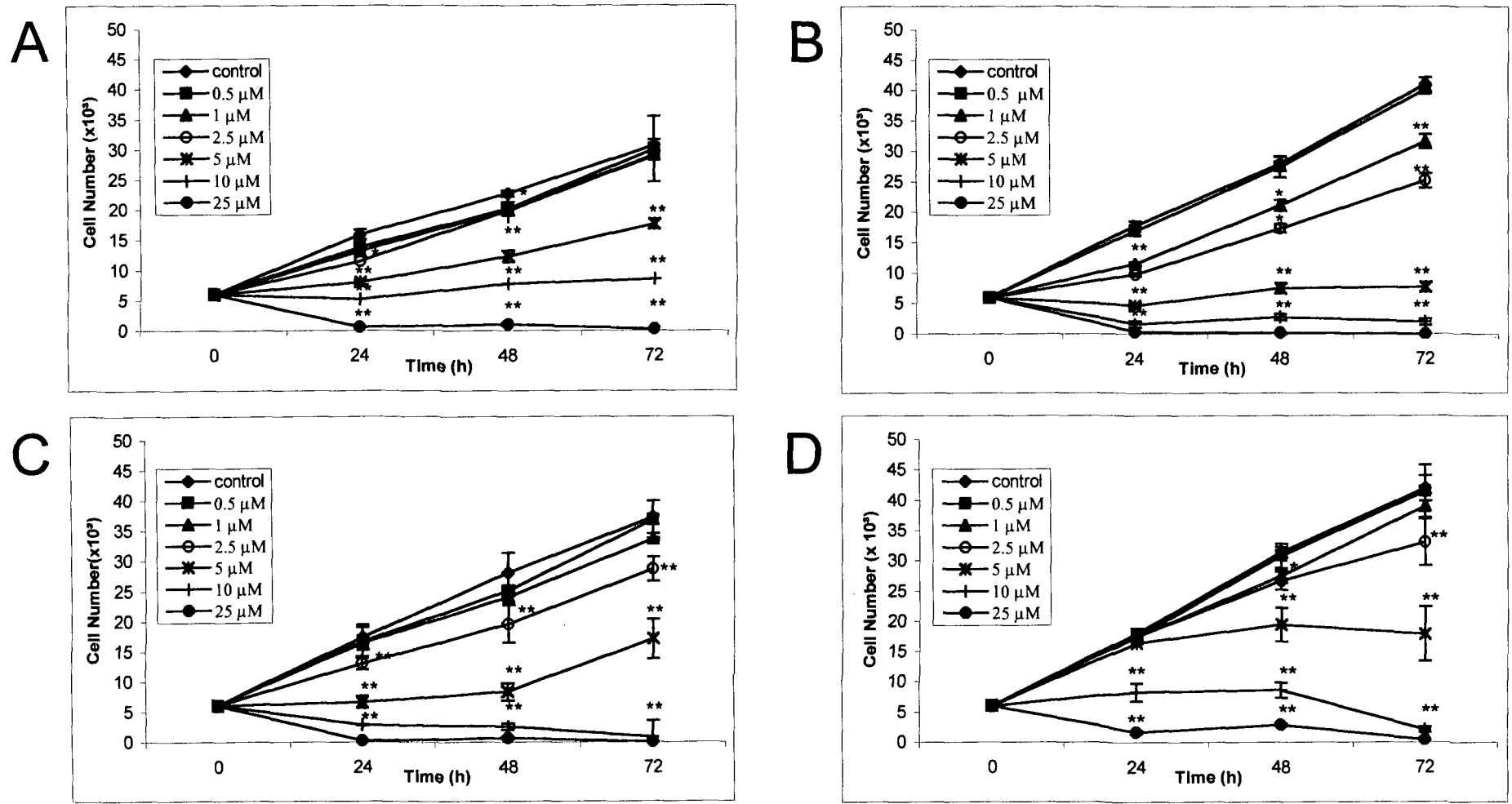


FIGURE 3

SENF-F-RIBEIRO et al., 2004

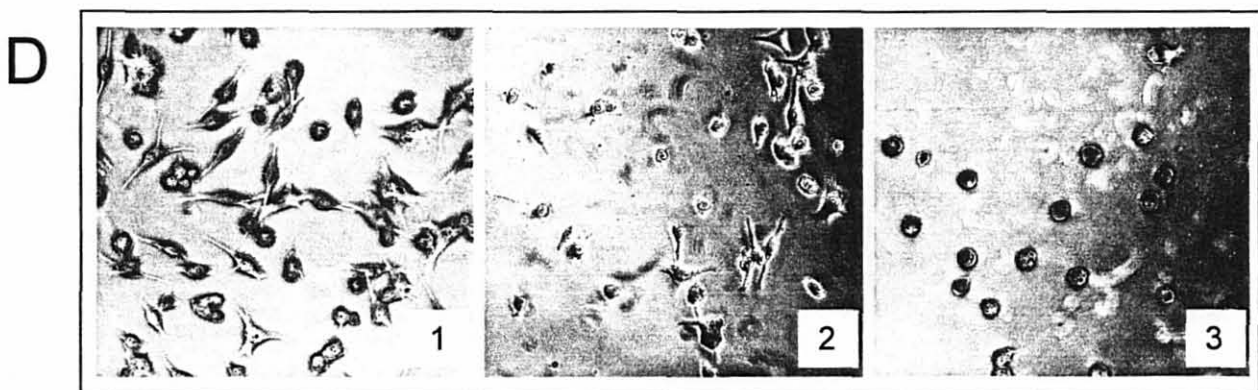
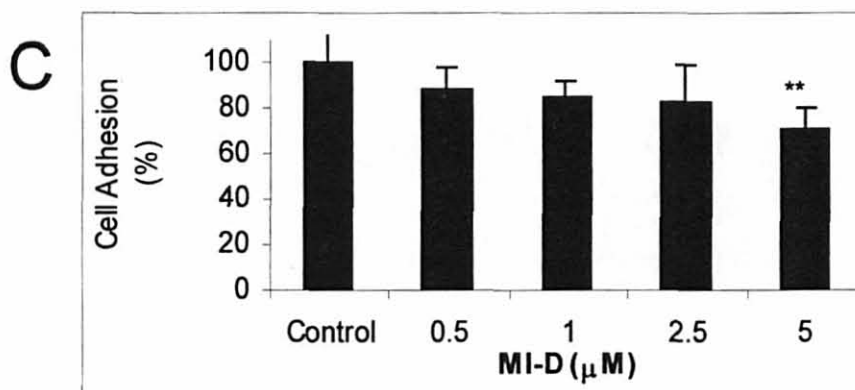
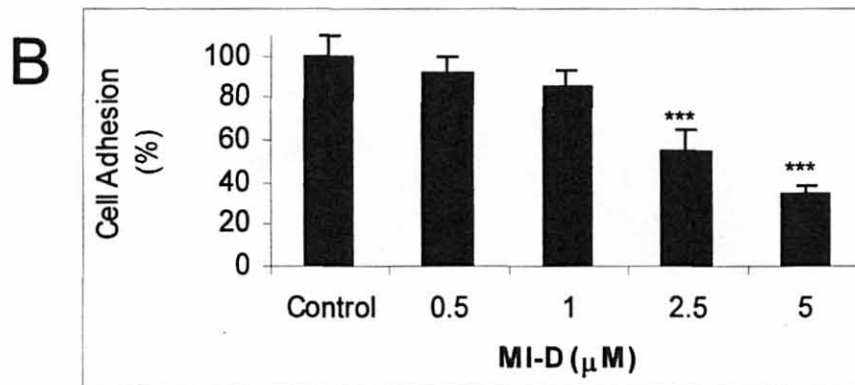
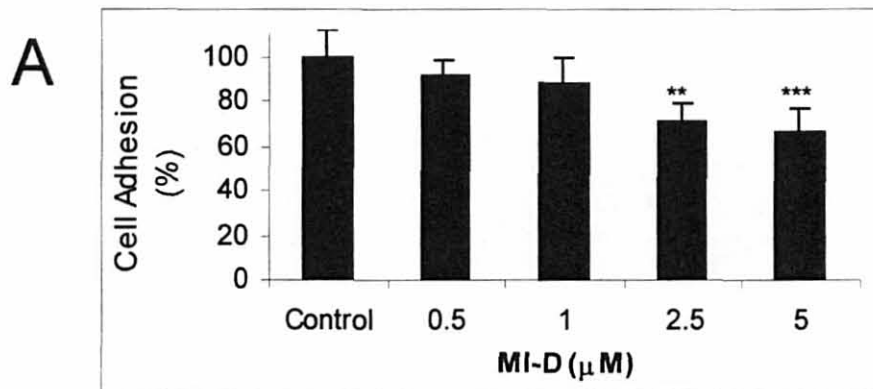


FIGURE 4 SENFF-RIBEIRO et al., 2004

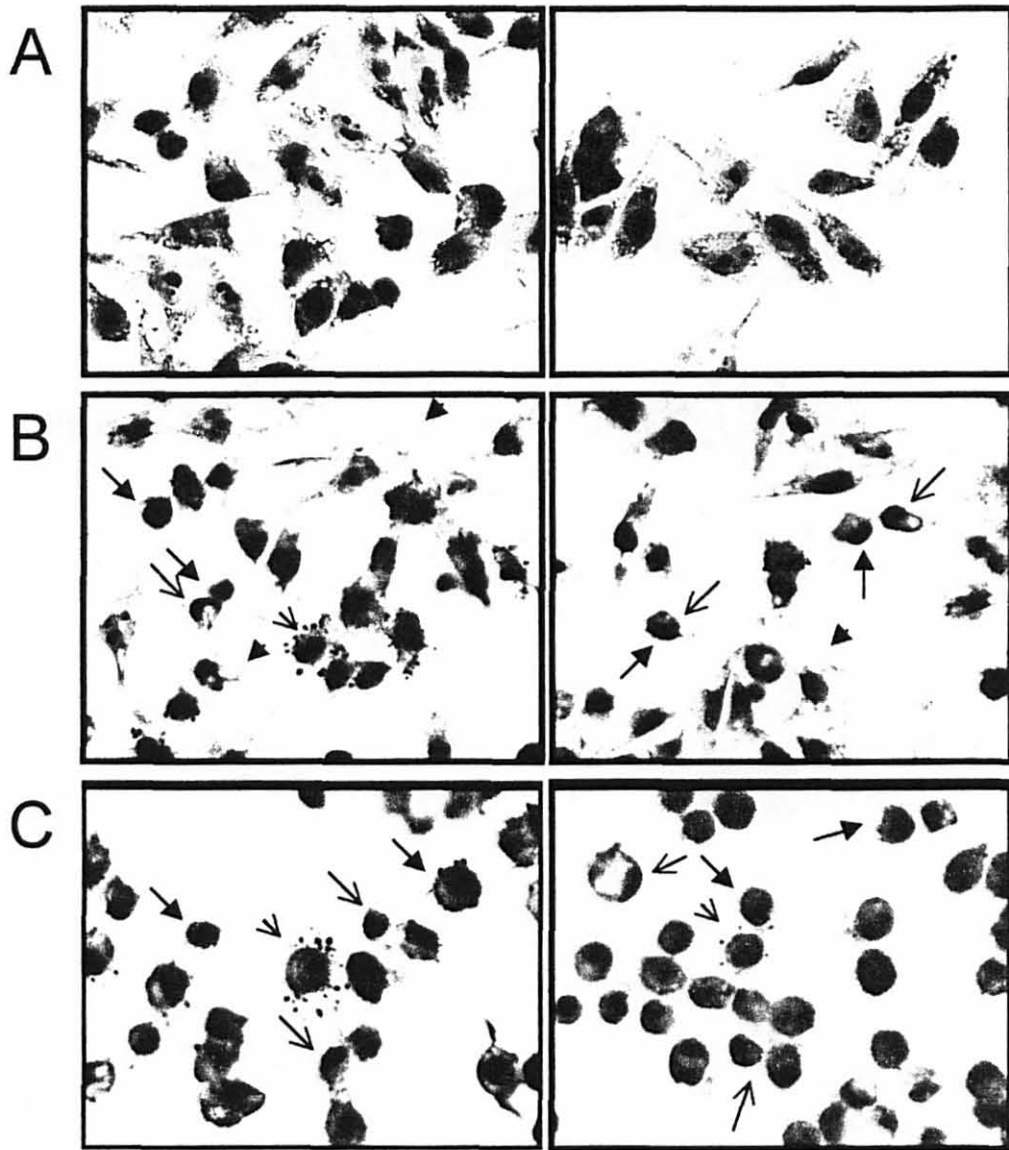


FIGURE 5 SENFF-RIBEIRO et al., 2004

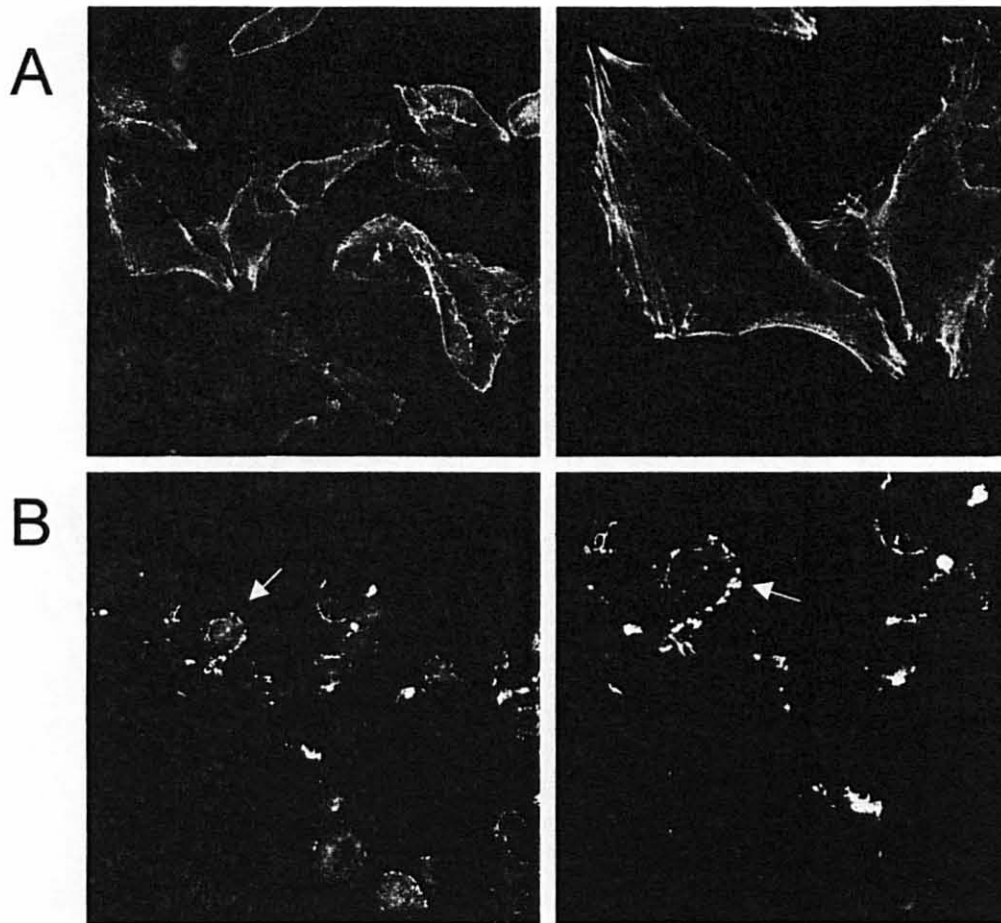
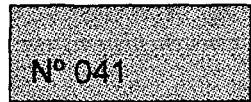


FIGURE 6 SENFF-RIBEIRO et al., 2004



## CERTIFICADO

A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituída pela PORTARIA N° 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO N° 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas no "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care).

Processo: 23075.54788/2003-00 Data de Aprovação: 01/12/2003 (9ª RO)  
Título: "Estudo da atividade antitumoral dos compostos mesoiônicos"  
Autores: Maria Benigna Martinelli de Oliveira (BIO - resp); Andréa Senff-Ribeiro (acade); Silvio Sanches Veiga (colab)

Em Curitiba, 01 de Dezembro de 2003.

Prof. Dr. SILVIO MARQUES ZANATA  
Secretário

Profa. Dra. ANETE CURTE PERRAZ  
Presidente