

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO



TESE DE DOUTORADO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIGLIOMA,
ANTIOXIDANTE E INIBIDORA DA MONOAMINOXIDASE-B DE 2-IMINO-
TIAZOLIDIN-4-ONAS**

JOSÉ COAN CAMPOS JÚNIOR

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

J11s Campos Júnior, José Coan

SÍNTESE E AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE
ANTIGLIOMA, ANTIOXIDANTE E INIBIDORA DA
MONOAMINOXIDASE-B DE 2-IMINO-TIAZOLIDIN-4-ONAS / José
Coan Campos Júnior ; Geonir Machado Siqueira, orientador ;
Wilson João Cunico Filho, coorientador. — Pelotas, 2020.

138 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação
Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas
Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de
Pelotas, 2020.

1. Iminotiazolidinona. 2. Antiglioma. 3. Monoamina
oxidase. 4. Antioxidante. I. Siqueira, Geonir Machado, orient.
II. Cunico Filho, Wilson João, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

José Coan Campos Júnior

Síntese e Avaliação *In Vitro* da Atividade Antiglioma, Antioxidante e Inibidora da Monoaminoxidase-B de 2-imino-tiazolidin-4-onas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas (RS) como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Geonir Machado Siqueira

Pelotas, 2020

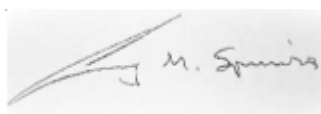
José Coan Campos Júnior

Síntese e Avaliação *In Vitro* da Atividade Antiglioma, Antioxidante e Inibidora da Monoaminoxidase-B de 2-imino-tiazolidin-4-onas

Tese apresentada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro De Ciências Químicas Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 16/10/2020 às 14 h.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Geonir Machado Siqueira – Presidente/Orientador – UFPel



Prof^a. Dr^a. Vânia Rodrigues de Lima – FURG



Prof^a. Dr^a. Rosélia Maria Spanevello – UFPel



Prof. Dr. Patrick Teixeira Campos – IFSUL

Pelotas, outubro de 2020

Dedicatória

À toda minha família: esposa Vanise, filhos Augusto, Sofia e Duda, mãe Daniza, irmãos Thaís e Alexandre, que tiveram toda compreensão, apoio e paciência nesse período em que ficamos quase que incomunicáveis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram diretamente e indiretamente à realização deste trabalho, em especial:

- A minha família por todo o suporte e paciência nos momentos difíceis.
- Ao professor orientador Dr. Geonir Siqueira pela oportunidade, ajuda, confiança, amizade e orientação durante o doutorado.
- Ao professor Dr. Wilson Cunico pela coorientação e ajuda em todo trabalho.
- A todos os colegas de laboratório LaQuiABio, que passaram ou ainda presentes: Daniela Gouvea, Juliano Bosenbecker, Gabriele Berwaldt, Adriana das Neves, Bruna Bento, Bruna Moreira entre tantos outros pela grande colaboração e amizade.
- Aos colegas do Laboratório de Preparo do prédio 29 Maicon, Vânia e Cristiane pela amizade, ajuda e paciência.
- Aos novos colegas professores e alunos dos laboratórios parceiros: NEUROCAN e LABIONEM pela grande ajuda nos diversos testes biológicos realizados.
- A prof^a. Dr^a. Elizandra Braganhol juntamente com a Dr^a. Priscila de Souza pelas análises de citometria de fluxo e morte celular na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.
- A banca examinadora da qualificação e da Tese.
- A Ufpel e as entidades de fomento CNPQ, CAPES e FAPERGS.

“Não acredite em algo simplesmente porque ouviu. Não acredite em algo simplesmente porque todos falam a respeito. Não acredite em algo simplesmente porque está escrito em seus livros religiosos. Não acredite em algo só porque seus professores e mestres dizem que é verdade. Não acredite em tradições só porque foram passadas de geração em geração. Mas, depois de muita análise e observação, se você vê que algo concorda com a razão e que conduz ao bem e benefício de todos, aceite-o e viva-o.”

Buda

RESUMO

CAMPOS, José Coan. **Síntese e Avaliação *In Vitro* da Atividade Antiglioma, Antioxidante e Inibidora da Monoaminoxidase-B de 2-imino-tiazolidin-4-onas**, 2020. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Uma série de novos derivados de 2-imino-4-tiazolidinona (**5a-p**) foi sintetizada e avaliada quanto à sua atividade citotóxica em células de glioma (C6), por outro lado, este trabalho avaliou as ações antioxidantes e neuroprotetoras da molécula contendo um núcleo 2-imino-4-tiazolidinona, o composto 3- (piridin-2-il) -2- (piridina-2-ilimino)tiazolidin-4-ona (PPIT). Dentre os dezesseis compostos sintetizados (**5a-p**), três exibiram potente atividade antitumoral contra a linha celular de glioma testada e apresentaram valores de IC₅₀ bem abaixo do fármaco padrão temozolomida (TMZ). Portanto, os compostos **5a**, **5l** e **5p** foram avaliados no ciclo celular e na análise de morte, devido à potente toxicidade ($2,17 \pm 1,17$, $6,24 \pm 0,59$, $2,93 \pm 1,12$, respectivamente) na linha celular C6. Os estudos de mecanismo de ação demonstraram que **5a** e **5l** induziram apoptose significativamente, uma vez que aumentaram a porcentagem de células na fase Sub-G1 com ausência de necrose. Consistente com esses resultados, o ensaio da caspase-3/7 revelou que **5l** apresenta atividade pró-apoptótica devido à estimulação significativa das caspases-3/7. Além disso, **5a**, **5l** e **5p** aumentam a defesa antioxidante e diminuem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Em relação ao composto **7**, cinco ensaios *in vitro* foram realizados para verificar a capacidade antioxidante do composto: carbonilador de proteínas (PC), ABTS, DPPH, FRAP e atividade semelhante a superóxido dismutase (SOD). Os resultados mostraram que o PPIT reduziu os níveis cerebrais de PC. Embora nenhuma atividade mimética de SOD tenha sido observada, o composto agiu como um eliminador de radicais livres (ABTS e DPPH) e exibiu atividade redutora no ensaio FRAP. Além disso, os efeitos do PPIT na atividade das isoformas da MAO do cérebro (MAO-A e B) foram investigados *in vitro*. Nossos dados apontaram para uma inibição da isoforma MAO-B pelo PPIT sem efeito na atividade da MAO-A. Por último, foi realizado um teste de toxicidade oral aguda. Nenhuma mudança na ingestão de alimentos, peso corporal e marcadores bioquímicos de danos renais e hepáticos foram detectados em camundongos tratados com uma alta dose de PPIT. Em conclusão, o presente estudo demonstrou que os compostos **5a**, **5l**, **5p** e PPIT exibem atividade antiglioma *in vitro* e inibem seletivamente a isoforma MAO-B, respectivamente, sem causar toxicidade.

Palavras-chave: Síntese, Iminotiazolidinonas, Antiglioma, Apoptose, Monoamina Oxidase, Antioxidante.

ABSTRACT

CAMPOS, José Coan. **Synthesis and biological evaluation of 2-imino-4-thiazolidinones as antiglioma, antioxidant and inhibitor of MAO-B activities**, 2020. Doctoral thesis, Post-Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Federal University of Pelotas, 2020.

A series of novel 2-imino-4-thiazolidinone (**5a-p**) derivatives was synthesized and evaluated for their cytotoxic activity against glioma (C6) cancer cell line, on the other hand, this work evaluated the antioxidant and neuroprotective actions of a synthetic molecule containing a 2-imino-4-thiazolidinone nucleus, the compound 3-(pyridin-2-yl)-2-(pyridine-2-ylimino)thiazolidin-4-one (PPIT). Among sixteen synthesized compounds (**5a-p**), three displayed potent antitumor activity against tested glioma cell line showed IC₅₀ values well below the standard drug temozolomide (TMZ). Therefore, compounds **5a**, **5l** and **5p** were evaluated cell cycle and death analysis, due potent toxicity (2.17±1.17, 6.24±0.59, 2.93±1.12, respectively) in C6 cell line. The mechanism of action studies demonstrated that **5a** and **5l** induced apoptosis significantly once increase the percentage of cells in Sub-G1 phase with absence of necrosis. Consistent with these results, caspase-3/7 assay revealed that **5l** present pro-apoptotic activity due to the significant stimulation of caspases-3/7. Moreover, **5a**, **5l** and **5p** increased antioxidant defense and decrease reactive oxygen species (ROS) production. According to compound **7**, five *in vitro* assays were carried out in order to verify the antioxidant capacity of the compound: protein carbonylation (PC), ABTS, DPPH, FRAP and superoxide dismutase (SOD)-like activity. The results showed that PPIT reduced the brain levels of PC. Although no SOD mimetic activity was observed, the compound acted as a free radical scavenger (ABTS and DPPH) and exhibited reducing activity in the FRAP assay. In addition, the effects of PPIT on the activity of brain MAO isoforms (MAO-A and B) were investigated *in vitro*. Our data pointed to an inhibition of the MAO-B isoform by PPIT with no effect on MAO-A activity. Lastly, an acute oral toxicity test was conducted. No changes in food intake, body weight, and biochemical markers of kidney and liver damage were detected in mice treated with a high dose of PPIT. In conclusion, the present study demonstrated that compounds **5a**, **5l**, **5p** and PPIT exhibits *in vitro* antiglioma activity and selectively inhibits the MAO-B isoform, respectively, without causing apparent toxicity.

Key words: Synthesis, Iminothiazolidinones, Antiglioma, Apoptosis, Monoamine Oxidase, Antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de fármacos com anéis heterocíclicos.....	1
Figura 2. Estrutura do anel 2-imino-4-tiazolidinona análogo ao anel tiazolidina da penicilina.	1
Figura 3 Representação esquemática das células da glia e suas interações (Adaptado de WELLER <i>et al.</i> , 2015)	7
Figura 4 Fases do ciclo celular eucariótico (Adaptado de COLLINS; GARRETT, 2005)	10
Figura 5 Ciclo Celular: Ação de Ciclinas-CDKs e seus inibidores (Adaptado de COLLINS; GARRETT, 2005).....	13
Figura 6 Classificação de Gliomas (Adaptado de MALTA <i>et al.</i> , 2018).....	14
Figura 7 Mutação da IDH no ciclo do ácido tricarboxílico que leva à tumorigenese..	16
Figura 8 Inibição da enzima TET (Adaptado de	16
Figura 9 Mecanismo de desmetilação do DNA por TET	17
Figura 10 Alterações na metilação do DNA por regiões genômicas em células tumorais (Adaptado de MALTA <i>et al.</i> , 2018)	18
Figura 11 (A) Desmetilação do DNA causada pela enzima MGMT e resistência à TMZ. (B) Metilação do promotor do gene da enzima MGMT auxiliando na ação da TMZ (Adaptado de JIAPAER <i>et al.</i> , 2018).....	19
Figura 12 (A) Mecanismo de ação dos fármacos EGFR TKI e depatuxizumabe mafodín. (B) Mecanismo de ação dos fármacos bevacizumabe e cediranibe (Adaptado de LE RHUN <i>et al.</i> , 2019)	21
Figura 13 Ativação de genes via PPAR γ (Adaptado de GROMMES; LANDRETH; HENEKA, 2004).	23
Figura 14 (A) Trocador Xc e captação de glutamato extracelular através do EAAT2. (B) Redução da expressão do EAAT2 e consequente aumento de glutamato extracelular e suas implicações (Adaptado de CHING <i>et al.</i> , 2015).....	24
Figura 15 Representação esquemática da desaminação oxidativa de monoaminas pela MAO. Os aldeídos gerados	27
Figura 16 Esquema cinético da reação envolvendo a MAO indicando as semi-reações: redutiva e oxidativa.....	29
Figura 17 Sobreposição das estruturas tridimensionais das isoformas de MAO-A e B. MAO-A é destacada em <i>verde</i> , e MAO-B é destacada em <i>ciano</i> . FAD é destacado em <i>laranja</i> e <i>vermelho</i>	30
Figura 18 Implicações funcionais de MAOs nas vias de sinalização celular.	33
Figura 19. Ciclização seletiva de IMTZD via ligação de hidrogênio intramolecular. ...	38

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Síntese de 2-iminotiazolidinonas (5a-p e 7) provenientes da 2-aminopiridina.....	6
Esquema 2. Reação de formação de IMTSD por ciclização de tioureias.	36
Esquema 3. Reação de formação de IMTSD por ciclização de α -haloacetamidas. ...	37
Esquema 4. Reação de formação de tioureias simétricas e assimétricas juntamente com as respectivas IMTSD.....	37
Esquema 5. Regioseletividade na síntese de IMTSD proveniente de tioureias assimétricas, segundo Yella e colaboradores.	38
Esquema 6. Reação de formação de IMTSD via precursor de reação de Biginelli. ...	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-HG – ácido 2-hidroxipentérico
5hmC – 5-hidroximetilcitosina
5-HT – 5-hidroxitriptamina (Serotonina)
5mC – 5-metilcitosina
A549 – linhagem de adenocarcinoma pulmonar
ABTS – radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
B16F10 – linhagem de melanoma murino
Bcl-2 – gene que regula a morte celular
C6 – linhagem de glioma de rato
CDK – quinases dependente de ciclinas (em inglês: *cyclin-dependent kinases*)
CpG – Citosina-fosfato-guanina
DA – aminas dopaminas
DHPMs – dihidropirimidinas
DNA – ácido desoxirribonucleico (em inglês: *deoxyribonucleic acid*)
DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
E2F – grupo de genes que codifica fatores de transcrição
EAAT2 – transportador excitatório de aminoácidos 2 (em inglês: *excitatory amino acid transporter 2*)
EGFR – receptor do fator de crescimento epidérmico
ERK – (em inglês: *extracellular signal-regulated kinases*)
EROS – espécies reativas de oxigênio
FAD – flavina-adenina dinucleótido
FRAP – método antioxidante de redução do ferro
g-CIMP – fenótipo metilador da ilha de citosina-fosfato-guanina
GFAP – proteína fibrilar ácida da glia
GPx4 – glutathione peroxidase 4
HEK-293 – células normais de rim humano
Hela – linhagem de adenocarcinoma cervical
HepG2 – linhagem de hepatocarcinoma
IC₅₀ – concentração que inibe 50% o crescimento celular
IDH – isocitrato desidrogenase
IF – filamentos intermediários

IGF-1 – fator de crescimento similar à insulina (em inglês: *insulin-like growth factor*)
IMTZD - iminotiazolidinona
JNK – (em inglês: c-Jun N-terminal kinase)
MAO – monoaminoxidase
MAO-A – monoaminoxidase isoforma A
MAO-B – monoaminoxidase isoforma B
MCF-7 – linhagem de adenocarcinoma de mama
MGMT – O6-metilguanina-DNA metiltransferase
MTT – brometo de 3-(4,5-dimetil)-2,5-difeniltetrazólio
NA – noradrenalina
OMS – Organização Mundial de Saúde
p53 – preteína de tumor
PANC-1 – linhagem de carcinoma pancreático
PC – carbonilador de proteínas
PEA – beta-feniletilamina
PHD – prolil hidroxilase
PPARs – receptores ativados por proliferadores de peroxissomo
PPAR γ – receptores ativados por proliferadores de peroxissomo γ
PPIT - 3-(piridin-2-il)-2-(piridine-2-ilimino) tiazolidin-4-ona
PPRE – elemento de resposta do proliferador de peroxissomo
Rb – retinoblastoma
RXR – receptor retinoide-X
SiHa – linhagem de carcinoma de útero
SNC – Serviço Nervoso Central
SOD – superóxido dismutase
TET – translocação de dez-onze metilcitosina dioxigenase (em inglês: *tem-eleven translocation methylcytosine dioxygenase*)
TMZ – temozolomida
TZD – anel heterocíclico 2,4-tiazolidinediona
U251MG – linhagem de células tumorais de glioblastoma maligno
U87MG – linhagem de glioma maligno
VEGF – receptor do fator de crescimento do endotelial vascular
 α -KG – α -cetoglutarato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
2.1 OBJETIVO GERAL	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3 REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1 ATIVIDADE ANTIGLIOMA	7
3.1.1 GLIA	7
3.1.2 CICLO CELULAR E TUMORIGÊNESE.....	8
3.1.3 GLIOMAS	13
3.1.4 MECANISMOS DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS DOS GLIOMAS	15
3.1.4.1 MUTAÇÃO IDH 1/2	15
3.1.4.2 CODELAÇÃO 1P/19Q.....	17
3.1.4.3 G-CIMP	17
3.1.4.4 METILAÇÃO DO PROMOTOR DA O6-METILGUANINA-DNA-METILTRANSFERASE (MGMT)	18
3.1.5 MECANISMO DE AÇÃO DE FÁRMACOS ANTIGLIOMA	19
3.1.6 POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO ANTITUMORAL DAS IMTZDS.....	22
3.2 ATIVIDADE INIBIDORA DAS MAOS	26
3.2.1 MONOAMINOXIDASE (MAO).....	26
3.2.2 ENZIMOLOGIA DAS ISOFORMAS MAO.....	27
3.2.2.1 MECANISMO DE REAÇÃO DA CATÁLISE MAO	27
3.2.2.2 FUNÇÕES CELULARES E FISIOLÓGICAS DAS ENZIMAS MAO	30
3.2.2.3 MANUTENÇÃO DOS NÍVEIS FISIOLÓGICOS DE AMINAS PELAS ENZIMAS MAO	31
3.2.2.4 A EXPRESSÃO DE MAO AFETA A HOMEOSTASE REDOX CELULAR..	32
3.2.2.5 A ATIVIDADE DA MAO MODULA A VIA INTRÍNSECA DA MORTE CELULAR APOPTÓTICA.....	34
3.3 SÍNTESE GERAL DE IMTZD	36
4 RESULTADOS	40
4.1 MANUSCRITO 1: <i>Synthesis and Biological Evaluation of Novel 2-imino-4-thiazolidinones as Potential Antitumor Agents for Glioblastoma</i>	42

4.2 MANUSCRITO 2: <i>3-(pyridin-2-yl)-2-(pyridin-2-ylimino)thiazolidin-4-one as a novel inhibitor of cerebral MAO-B activity with antioxidant properties and low toxicity potential</i>	77
5 CONCLUSÃO.....	105
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais objetivos da síntese orgânica e da química medicinal é produzir novas moléculas capazes de tornarem-se futuros agentes terapêuticos de diversas enfermidades. Na busca dessas moléculas, utilizar estratégias de síntese orgânica envolvendo anéis heterocíclicos torna-se uma tarefa primordial, visto que a maior parte de fármacos e biomoléculas apresentam, pelo menos, um anel heterocíclico como os exemplos elencados na Figura 1 (TAYLOR *et al.*, 2016).

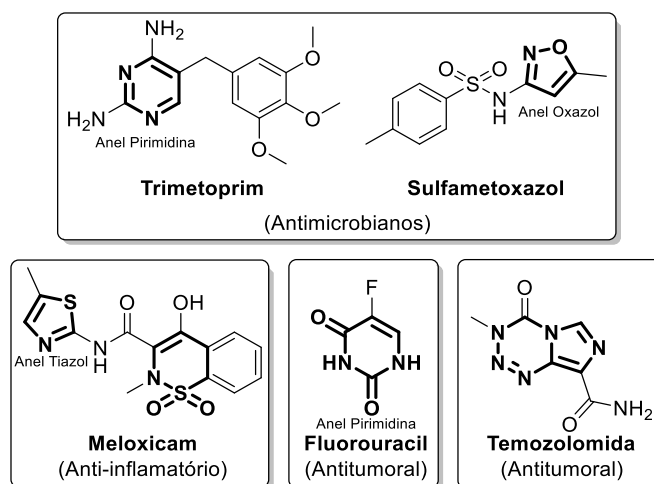


Figura 1. Exemplos de fármacos com anéis heterocíclicos.

Dentre o vasto número de anéis heterocíclicos existentes, as substâncias que possuem o anel tiazolidinona apresentam um papel importante no desenvolvimento de novos protótipos devido à associação com atividades biológicas. A partir da metade do século XX foram publicados trabalhos tanto de síntese quanto de atividade biológica de tiazolidinonas que apresentam propriedades físico-químicas e estrutural semelhantes ao anel da tiazolidina, contido na estrutura da penicilina conhecida como antimicrobiana (Figura 2) (SINGH *et al.*, 1981).

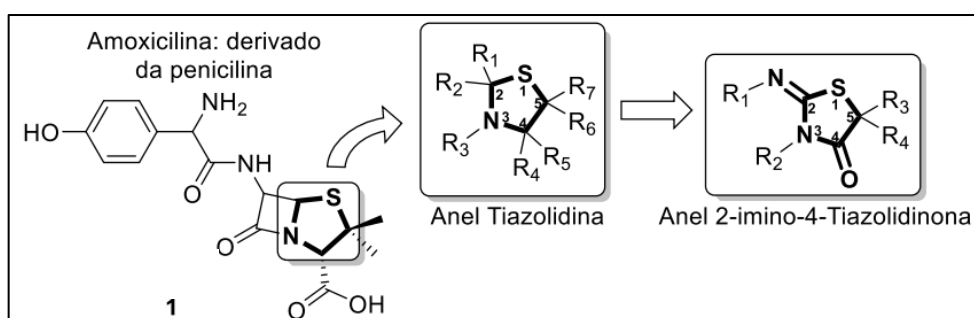


Figura 2. Estrutura do anel 2-imino-4-tiazolidinona análogo ao anel tiazolidina da penicilina.

Como destacado anteriormente, as tiazolidinonas (TZD) são derivadas do anel tiazolidina, ou seja, heterociclos de cinco membros possuindo um átomo de enxofre na posição 1, um átomo de nitrogênio na posição 3 e uma carbonila na posição 4 (Figura 2). Além disso, há uma grande variedade de possibilidades de síntese dessas moléculas variando-se os substituintes na posição 2, 3 e 5, promovendo alterações que aumentem seus efeitos terapêuticos (TRIPATHI *et al.*, 2014).

Dentre as TZD's, as que contém uma carbonila na posição 4 são as que despertaram maior interesse na química medicinal nos últimos anos. Na mesma proporção, vem crescendo o número de trabalhos referente a iminotiazolidinonas, mais precisamente, as 2-imino-4-tiazolidinonas (IMTZD), que possuem um grupamento imino na posição 2 (Figura 2) (TRIPATHI *et al.*, 2014).

Na literatura encontram-se diversos trabalhos contendo o anel IMTZD, que além de apresentarem resultados de síntese satisfatórios, apresentam dados com diversas propriedades biológicas como: antimicrobiana (CAI; WU; CHANG, 2016), antiviral (KÜÇÜKGÜZEL *et al.*, 2013), anti-inflamatória (SINGH *et al.*, 2015), anticâncer (APPALANAIDU *et al.*, 2016), antidiabetes (SAEED *et al.*, 2014) entre outras, despertando ainda mais os estudos desse anel.

Outro anel heterocíclico importante e presente em diversas substâncias tanto naturais (alcaloides) quanto sintéticas (fármacos) é o anel piridínico, que por sua vez contribui em diversos efeitos biológicos como: inibidor de DNA topoisomerases (anticâncer) (SHRESTHA *et al.*, 2018a, 2018b), herbicida (CAI *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2015), inibidor seletivo da butirilcolinesterase (anti-Alzheimer) (MAKHAEVA *et al.*, 2018), antibacterial (CAI; WU; CHANG, 2016) etc. Talvez o início do desenvolvimento de novas substâncias baseadas no anel piridínico esteja nas conhecidas propriedades neuronais dos alcaloides piridínicos, como por exemplo a nicotina, que ativa receptores nicotínicos de acetilcolina no cérebro desencadeando o aumento dos níveis de neurotransmissores responsáveis por diversas enfermidades (ORTELLS; ARIAS, 2010).

O câncer é uma das doenças que mais acomete os humanos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 9 milhões de pessoas foram acometidas da doença em 2018, no último levantamento (GLOBOCAN OBSERVATORY, 2019). Alguns medicamentos estão disponíveis no mercado para o tratamento desta doença como: os agentes antimetabólitos (Fluorouracil) (LOVEN

et al., 2002) e os antibióticos anticâncer (Doxorrubicina) (SKLADANOWSKI; KONOPA, 1993).

O desenvolvimento de fármacos anticâncer com menor efeito secundário é muito importante para a quimioterapia do câncer. A necessidade de agentes terapêuticos anticâncer potentes levou à descoberta de pequenas moléculas sintéticas que possuem atividade anticâncer com menos efeitos colaterais. Algumas IMTSD já estudadas apresentaram atividade inibindo o crescimento de células de adenocarcinoma (HT29) (OTTANÀ *et al.*, 2005) e célula cancerígenas de pulmão humano (linhagens: H460 e H460TaxR) (TERAISHI *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2008).

Mushtaque e colaboradores (MUSHTAQUE *et al.*, 2017) sintetizaram uma bis-IMTSD que foi mais ativa contra as linhagens de hepatocarcinoma (HepG2) seguida pela adenocarcinoma de mama (MCF-7), carcinoma de útero (SiHa) e adenocarcinoma cervical (Hela) e menor toxicidade frente as células não tumorais de rim humano (HEK-293). Como comparação, os valores de IC₅₀ (concentração que inibe 50% o crescimento das células) de HepG2, MCF-7, Hela, SiHa e HEK-293, foram respectivamente: 7,5 µM; 52,0 µM; 66,98 µM; 74,83 µM e 287,89 µM, enquanto que o fármaco padrão doxorrubicina apresentou valores de IC₅₀ igual a 3,0 µM e 8,1 µM frente a HepG2 e MCF-7, respectivamente.

Outra série de IMTSD foi sintetizada por Appalanaidu e colaboradores (APPALANAIDU *et al.*, 2016), que apresentaram uma potente atividade anticâncer frente a linhagens de células tumorais de melanoma murino – B16F10, de pulmão – A549 e de pâncreas – PANC-1, além de apresentar baixa citotoxicidade em linhagem de células CHO. Dentre os compostos sintetizados, três foram citotóxicas diante de B16F10 com IC₅₀ entre 3,4 e 7 µM, induzindo a apoptose. Dois desses compostos demonstraram a indução das fases G0/G1 e outro as fases G2/M no ciclo celular da linhagem B16F10.

Recentemente, estudos realizados pelo Laboratório de Química Aplicada à Bioativos (LaQuiABio) em parceria com Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer (NeuroCan) apresentaram resultados satisfatórios em relação a atividade antiglioma de compostos contendo o anel 4-tiazolidinona (DA SILVA *et al.*, 2016; VASCONCELOS *et al.*, 2020) possibilitando novos estudos de tiazolidinonas como as IMTSD para alcançar resultados semelhantes.

Monoaminooxidasas (MAO) são enzimas que requerem dinucleotídeo flavina adenina (FAD) para executar sua função adequadamente. Essas enzimas estão localizadas na parte externa da membrana mitocondrial e têm a função de desaminar as aminas biogênicas. A enzima possui duas formas com mais de 70% de homogeneidade e essas duas formas podem ser diferenciadas por seus substratos, que são principalmente aminas ou neurotransmissores. A MAO-A apresenta afinidade pela noradrenalina (NA) e serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), enquanto MAO-B demonstra afinidade pela benzilamina e beta-feniletilamina (PEA), as aminas dopamina (DA) e tiramina mostram afinidade semelhante para cada forma de enzima. Essas enzimas estão intimamente relacionadas a um papel fisiológico fundamental na regulação do sistema nervoso e no desenvolvimento de distúrbios neuropsiquiátricos (DROZAK; KOZŁOWSKI, 2006; FINBERG; RABEY, 2016).

A MAO-B tem sido implicada na patogênese da doença de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas (BORRONI *et al.*, 2017). Além disso, os inibidores da MAO-B atenuam o estado de deficiência de DA e podem ter propriedades neuroprotetoras em pacientes com doença de Parkinson (DP) (DEZSI; VECSEI, 2017).

Realizando uma busca na literatura encontra-se apenas um estudo de IMTSD como inibidor de MAO. Abbas e colaboradores (ABBAS *et al.*, 2017) sintetizaram uma série de bis-IMTSD que apresentaram eficiente inibição em ambas MAO's, contudo um dos composto foi destaque para inibição da MAO-A por apresentar valor de $IC_{50} = 0,001 \mu M$ comparado com um valor $IC_{50} = 0,0045 \mu M$ do inibidor padrão Clorgilina.

Com base no referencial acima essa tese teve como objetivo sintetizar novos compostos com o anel IMTSD e o grupamento piridínico com intuito de avaliar a atividade antiglioma, em parceria com o Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer (NeuroCan) juntamente com a atividade inibitória das MAO's, em parceria com o Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM).

2 OBJETIVOS

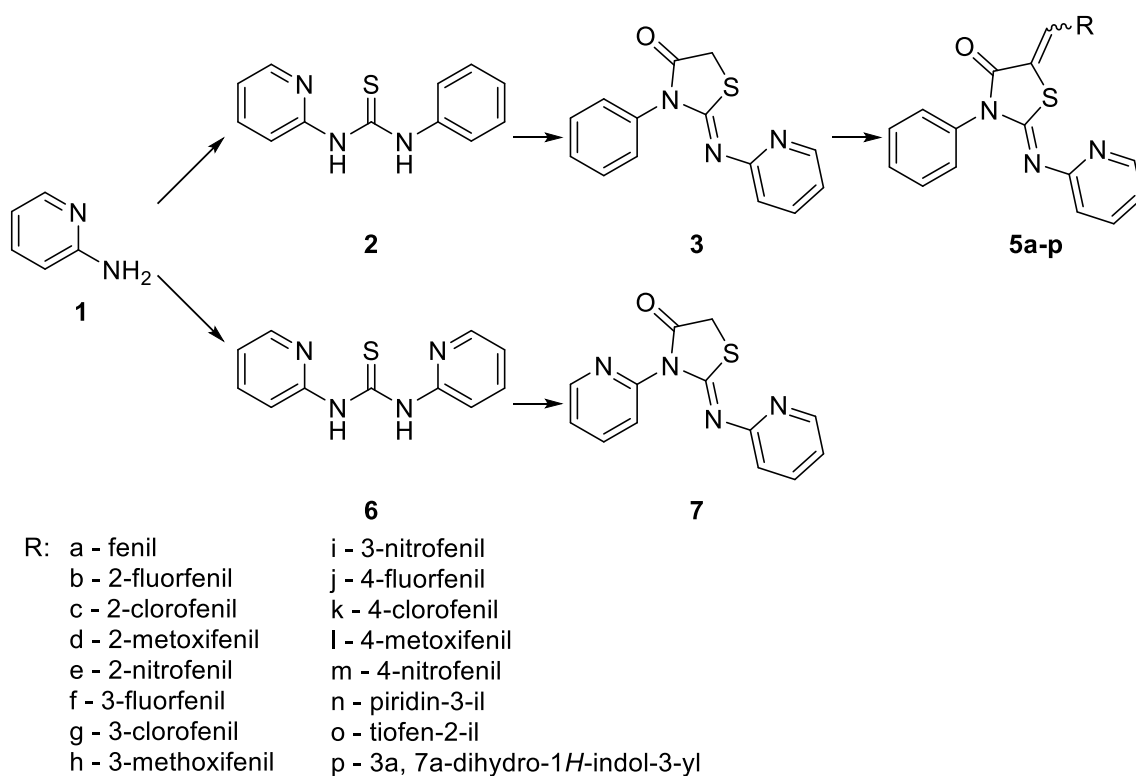
2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste estudo será sintetizar substâncias que contenham IMTSD e piridina em suas estruturas, configurando uma hibridização molecular entre essas duas classes no intuito de se obter protótipos com efeito antitumoral da linhagem de glioma (C6) e atividade inibitória de MAO's.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

São objetivos específicos desse trabalho:

- (a). Sintetizar e caracterização uma série de IMTSD **5a-p**, através de condensações na posição 5 do anel IMTSD (Esquema 1), utilizando aldeídos heterocíclicos e benzaldeídos substituídos com grupos doadores e retiradores de elétrons.
- (b). Sintetizar o composto **7**, que apresenta tanto o anel IMTSD, quanto os grupamentos piridínicos ligados na posição 3 e na imina do IMTSD.
- (c). Avaliar a atividade antitumoral dos compostos **5a-p** frente a linhagem de células C6, além de verificar a toxicidade em astrócitos utilizando metodologias *in vitro* como testes de viabilidade celular (MTT), análise do ciclo celular por citometria de fluxo, ensaios antioxidantes, análise de apoptose pelo método de Hoechst e iodeto de propídeo.
- (d). Avaliar a atividade inibitória das MAO's do composto **7** juntamente com a atividade antioxidante do mesmo.



Esquema 1. Síntese de 2-iminotiazolidinonas (**5a-p** e **7**) provenientes da 2-aminopiridina

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ATIVIDADE ANTIGLIOMA

3.1.1 GLIA

Células neuronais e gliais constituem o sistema nervoso central (SNC) atuando em conjunto no adequado funcionamento do organismo. As células gliais incluem os astrócitos, oligodendrócitos, ependimócitos e micróglia, cada qual desempenham um papel distinto e crucial na estrutura e no funcionamento do tecido nervoso. Uma representação esquemática dos diferentes tipos de células da glia no SNC, suas interações entre si e com os neurônios, está indicada na Figura 3. Estas células são altamente complexas e estão envolvidas em diversas funções, como será abordado na sequência (JAWORSKA-ADAMU, 2010).

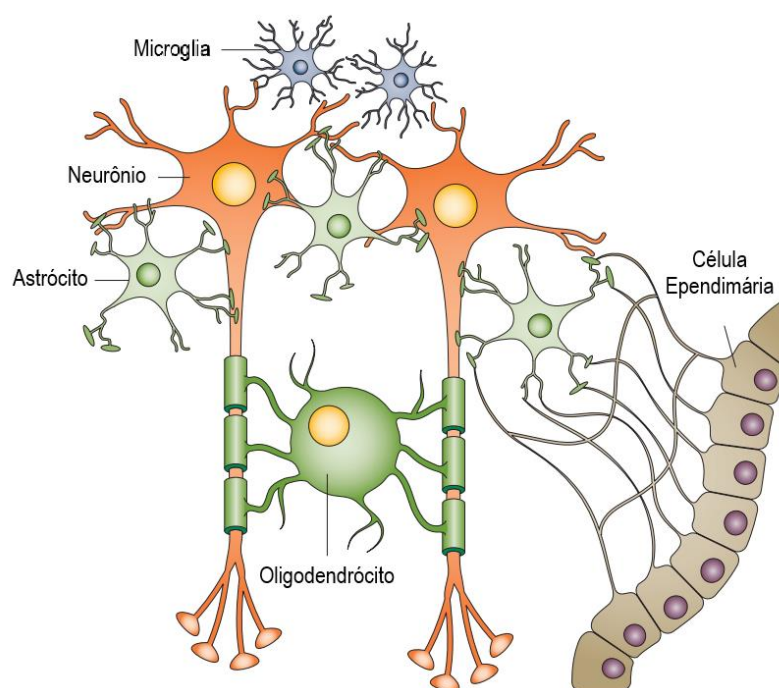


Figura 3. Representação esquemática das células da glia e suas interações
(Adaptado de WELLER *et al.*, 2015).

Os astrócitos são as maiores células da glia, constituem aproximadamente 50% da população glial e são o tipo celular mais abundante no SNC de mamíferos. Estas células possuem diversos prolongamentos que envolvem os capilares cerebrais e os induzem a formar junções oclusivas, que constituem a barreira hematoencefálica. Dentre outras funções, dão suporte à atividade neuronal, incluindo a formação de sinapses, maturação e plasticidade da sinapse, regulando o

transporte de íons e neurotransmissores. Os astrócitos são responsáveis também pela regulação da resposta imune no SNC. Estas células são responsáveis pela sustentação mecânica do tecido nervoso, pois contêm em seu citoplasma filamentos intermediários (IF) constituídos pelas proteínas vimentina, nestina, sinemina e pela proteína fibrilar ácida da glia (GFAP), principal proteína IF. As fibrilas gliais têm função de sustentação mecânica e desta forma os astrócitos e seus prolongamentos constituem uma trama ancorada nos vasos, na qual se apoiam os neurônios e outras células do SNC (BECHMANN; GALEA; PERRY, 2007; FARINA; ALOISI; MEINL, 2007; MIDDELDORP; HOL, 2011; PARPURA *et al.*, 2012; SALMINEN *et al.*, 2011).

Os oligodendrócitos, dentre outras funções, são responsáveis por produzir a bainha mielina. Estes apresentam poucos e delicados prolongamentos que se enrolam ao redor dos axônios, servindo como isolante elétrico para neurônios do SNC. Possuindo um arranjo epitelial, os endotélio são células que revestem os ventrículos, o canal central do cérebro e da medula espinhal. Os endotélio estão em contato com o líquido cefalorraquidiano, encontrando no interior das cavidades cerebrais e em alguns locais os endotélio apresentam cílios para auxiliar na circulação deste líquido. Já as micróglia são pequenas células cujo fenótipo é adaptado de acordo com o ambiente neural, possuem pronta resposta aos estímulos fisiológicos, além de possuírem alto poder fagocitário e atuam como sequestradores de partículas sólidas e microrganismos. Estão dispersas no SNC e são pouco numerosas. São também responsáveis pela função imunológica no tecido nervoso, possuindo capacidade fagocitária e expressam receptores de citocinas, desempenhando um papel importante no processo de defesa e inflamação (ALOISI, 2001; BRUNI, 1998; GABRION *et al.*, 1998; VERKHRATSKY; ORKAND; KETTENMANN, 1998; WILLIAMS; PIATON; LUBETZKI, 2007; WIRENFELDT; BABCOCK; VINTERS, 2011).

3.1.2 CICLO CELULAR E TUMORIGÊNESE

O crescimento e manutenção dos organismos multicelulares estão intimamente associados ao comportamento biológico de suas células. A minoria das células presentes em seres humanos adultos encontra-se em um estado de ativa proliferação, assim como as células epiteliais e da medula óssea. Células altamente diferenciadas, como neurônios e células musculares estriadas, possuem um comportamento de não proliferação. Alguns tipos celulares, como as células da glia,

pulmão e os hepatócitos, encontram-se em estado de repouso (quiescência). Porém, ocasionalmente, estas podem replicar, dividindo-se quando ocorre dano ao tecido ou intervenção cirúrgica (LIU *et al.*, 2011; VUKOVIC *et al.*, 2011; WILLIAMS; STOEBER, 2012).

O programa de replicação celular é constituído de um período de crescimento, no qual ocorre o aumento da massa celular através da síntese de macromoléculas, de um período de replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e outro de divisão celular. Estes eventos fazem parte de um ciclo, conhecido como ciclo celular, que consiste em uma sequência ordenada de eventos controlados e possui dois grandes momentos: a mitose e a interfase. A mitose, também chamada de fase M, consiste em diferentes etapas de preparação à divisão celular e, por fim, a divisão da célula em duas células filhas com genoma idêntico. A interfase constitui o período de intensa atividade metabólica e subdivide-se em três períodos distintos, as fases G1, S e G2 (CREWS; SHOTWELL, 2003; SHERR, 2000; SHERR; ROBERTS, 1995).

A fase G1 é a mais longa do ciclo celular. Nesta etapa a célula está metabolicamente ativa, sintetizando RNA, proteínas e outra macromoléculas essenciais à divisão celular. Durante esse período ocorre também a síntese de enzimas que são necessárias na replicação do DNA. Durante esta fase fatores inter(extra)celulares sinalizam para a célula a continuidade da proliferação ou interrupção da fase G1 e entrar em quiescência. Em seres humanos adultos a maioria das células encontra-se em um estado de inativação especializado, denominado estado de quiescência ou G0, no qual a célula desempenha suas funções normais, contudo encontra-se num estado de baixo metabolismo e não proliferação. Se as condições extracelulares são favoráveis e os sinais para crescimento e divisão estão presentes, as células no início de G1 ou de G0 avançam até um ponto antes do início da replicação do DNA, conhecido como ponto de restrição. Este é o momento no qual a célula monitora tanto seu ambiente interno, verificando se o seu DNA está íntegro, quanto o ambiente externo, verificando os fatores mitogênicos secretados por células vizinhas, que sinalizam para a célula se ela deve seguir para a duplicação do seu DNA (ALEXANDER *et al.*, 2012; CREWS; MOHAN, 2000; SANDAL, 2002).

Durante a fase S ocorre a replicação semiconservativa do DNA. O genoma é duplicado e cada cromossomo passa ter um par de cromátide-irmãos. Tão logo se complete a duplicação do DNA, inicia-se a fase G₂ que é a última fase da interfase antes da mitose. Como é um momento muito importante, há um ponto de controle, em que ocorre a verificação se o DNA foi completamente e fielmente duplicado. Nas células normais a mitose pode ser inibida se for sinalizado para a célula que seu genoma necessita de reparo, ou pela sinalização de fatores extracelulares, os quais podem resultar do contato com células vizinhas (inibição por contato) ou pela redução da produção e/ou disponibilidade de fatores de crescimento. O resumo do ciclo celular de uma típica célula eucariótica está representado na Figura 4 e demonstra os pontos de checagem e o sentido no qual o ciclo ocorre, juntamente com o estado de quiescência G₀, que pode ser reversível, onde a célula retorna para a fase G₁ em direção a duplicação, ou irreversível, ocorrendo o processo de diferenciação celular (HERRICK, 2011; SANDAL, 2002; WILLIAMS; STOEBER, 2012).

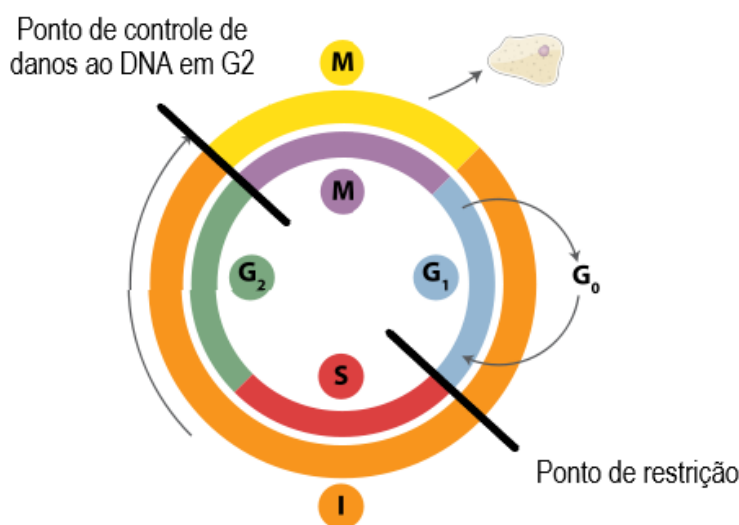


Figura 4. Fases do ciclo celular eucariótico (Adaptado de COLLINS; GARRETT, 2005).

O processo de proliferação celular é rigorosamente controlado e está basicamente sob o comando de dois grupos de proteínas, as quinases e suas subunidades regulatórias, as ciclinas. As quinases possuem atividade catalítica e são conhecidas como quinases dependentes de ciclinas (CDK – *cyclin-dependent kinases*) devido a sua ativação quando ligadas a ciclinas. Diferentes complexos ciclina-CDK controlam a progressão do ciclo celular no decorrer das fases G₁, S, G₂ e M. As principais transições do ciclo celular são processos dependentes de

diferentes complexos ciclina-CDK, a decisão de entrar em quiescência (G0), a síntese de DNA (S) e a transição da fase G2 para a mitose, são exemplos desses processos. Ciclinas do tipo D ligam-se a CDK4 e a CDK6 ativando-as e ajudam a promover a passagem pelo ponto de restrição no final de G1. A ciclina E liga-se a CDK2 no final da fase G1 e permite que a célula entre em processo de replicação do DNA; durante a fase S é necessário que a ciclina A se associe a CDK2 para que ocorra o início da replicação do DNA; a ciclina B promove eventos da mitose ao ligar-se a CDK1, fosforilando proteínas-chave que promovem a condensação dos cromossomos, quebra do envelope nuclear e permite que os microtúbulos do citoesqueleto se reorganizem para formar o fuso mitótico (BERTHET; KALDIS, 2007; COLLINS; GARRETT, 2005; ROBERTS *et al.*, 2012).

Quando as células são estimuladas a se dividir durante G1 os complexos ciclina D-CDK e ciclina E-CDK fosforilam diferentes resíduos de aminoácidos da proteína Retinoblastoma (Rb). Quando fosforilada, Rb tem sua afinidade por E2F diminuída e libera esta proteína que se liga às sequências específicas do DNA, resultando na transcrição de genes envolvidos na replicação do DNA e de genes essenciais para a entrada da célula na fase S. O supressor tumoral Rb previne a degradação dos inibidores de ciclina-CDK p21^{Cip1} e p27^{KIP1}, agindo como inibidor da progressão do ciclo celular. Mutações ou a perda das cópias dos genes Rb leva à proliferação descontrolada, o que explica parte do estado de crescimento neoplásico (KALDIS; RICHARDSON, 2012; STOCKWELL *et al.*, 2012; WEINBERG, 1995).

Baixos níveis de danos ao DNA por exposição à radiação, agentes químicos ou níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROS), ocorrem durante a vida normal de qualquer célula e é essencial que estes danos sejam reparados antes da célula se duplicar. O grande problema ocorre quando os dois principais pontos de checagem, ao final de G1 (ponto de restrição) que impede a célula de avançar até a fase S, e em G2 que impede a célula de entrar em mitose, não estão funcionando corretamente e os danos ao DNA se acumulam nas progênies da célula. Ao longo do tempo, o acúmulo de danos genéticos leva a um aumento na frequência da propagação dessas mutações promovendo a formação de tumores. Células tumorais são capazes de ignorar os sinais de parada de proliferação devido a alterações funcionais. A maioria dos cânceres humanos contém alterações genéticas que desabilitam o ponto de verificação presente em G1/S, levando a uma descontrolada

entrada no ciclo celular e à proliferação celular (BERTHET; KALDIS, 2007; MALUMBRES; BARBACID, 2001).

A homeostase dos organismos multicelulares está intimamente ligada à regulação do ciclo celular. A perda desta regulação pode originar a multiplicação descontrolada de células gerando efeitos nocivos ao organismo, frequentemente conduzindo a formação de tumores. Grande parte dos genes supressores tumorais codifica a síntese de proteínas com funções de regulação do ciclo celular, as quais, quando ausentes ou ineficientes, podem contribuir para a evolução de células tumorais. Muitas células tumorais possuem deficiência nas vias que sinalizam a parada do ciclo no ponto de checagem em G1, dependendo da barreira em G2 para reparar danos ao DNA. A principal molécula que governa o ponto de checagem em G2/M e a entrada da célula em M é CK1/CDC2 (ALEXANDER *et al.*, 2012; WEI; ZAIKA; ZAIKA, 2012).

Dentre outros fatores, danos à molécula de DNA levam à ativação dos genes regulatórios da proteína p53 que é codificada pelo gene TP53 desempenha um papel central na parada do ciclo celular e no processo de morte celular pela via apoptótica. A regulação de p53 é pós-traducional, normalmente na célula atua como uma proteína instável com um tempo de vida médio de 15 minutos, porém tem seus níveis basais aumentados rapidamente em resposta a danos ao DNA. Com a sua estabilização, através de fosforilação, p53 pode atuar como inibidor da transcrição de ciclina B, proporcionando proteção contra a entrada da célula na mitose. Em resposta ao estresse genotóxico p53 estimula a transcrição de vários genes envolvidos na parada do ciclo celular, incluindo o gene inibidor de crescimento p21^{wqf/Cip1} que pode atuar em diferentes fases do ciclo celular (Figura 5) (LIPSKI *et al.*, 2012).

A proteína p21^{Cip1} é essencial para o reparo ao DNA e sobrevivência celular. Ela inibe os complexos ciclina E- e A-CDK ligando-se a estes complexos e suprimindo sua ação (Figura 5). Outras proteínas que ajudam a bloquear a entrada na fase S por um mecanismo similar à p21^{Cip1} são as proteínas p27^{KIP1} e p57^{KIP2}. As proteínas da família INK4, p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C} e p19^{INK4D} inibem especificamente CDK4 e CDK6 (Figura 5). Frequentemente p16^{INK4A} encontra-se inativado em células tumorais. Mutações em p53, um dos principais genes supressores de tumor, ocorrem em pelo menos metade dos cânceres humanos. A maioria das alterações genéticas somáticas existentes em tumores derivados das

células da glia envolvem a inativação das vias dos genes supressores de tumor p53 e a proteína Rb (KYRITSIS *et al.*, 2010; ROBERTS *et al.*, 2012; WEI; ZAIKA; ZAIKA, 2012).

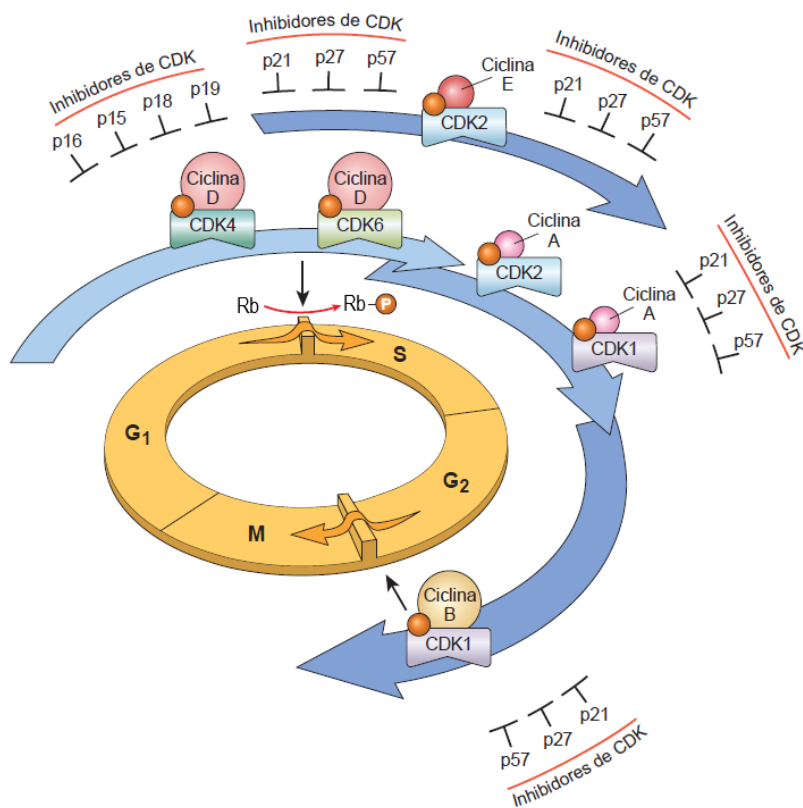


Figura 5. Ciclo Celular: Ação de Ciclinas-CDKs e seus inibidores (Adaptado de COLLINS; GARRETT, 2005).

3.1.3 GLIOMAS

Gliomas, meningiomas, tumores neurais e a meduloblastoma estão entre as principais classes de tumores cerebrais. A maioria dos tumores do cérebro e da medula espinhal se manifesta a partir de células da glia, estes tumores são denominados de gliomas e dentro desta classe estão incluídos os astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas (ROUSSEAU; MOKHTARI; DUYCKAERTS, 2008).

Gliomas são tumores cerebrais primários que se acredita derivarem do tronco neuroglial ou células progenitoras (WELLER *et al.*, 2015). Os gliomas foram classificados de acordo com a Organização Mundial da Saúde de 2007, em uma escala ascendente de I a IV e nomeados de acordo com as células progenitoras (SAMUDRA *et al.*, 2019): (I) astrocitoma de células ciliadas; (II) astrocitoma difuso;

(III) astrocitoma anaplásico, oligodendroglioma anaplásico e astrocitoma anaplásico; e (IV) glioblastoma (LIU; LI, 2018).

A classificação atualizada da Organização Mundial da Saúde de 2016 recomenda o diagnóstico molecular do *status* mutacional da isocitrato desidrogenase (IDH). Os gliomas com IDH mutantes manifestam o fenótipo metilador da ilha de citosina-fosfato-guanina (CpG) (g-CIMP) (MALTA *et al.*, 2018). A classificação baseada na metilação do DNA, feita após uma grande análise genômica, refinou subgrupos anteriores de glioma com base na mutação da IDH e no status de codeleção 1p/19q. Os subgrupos foram direcionados principalmente pelo status da mutação IDH 1/2 e classificados como: IDH-tipo selvagem e IDH-mutantes (CECCARELLI *et al.*, 2016) (Figura 6).

Os tumores IDH tipo selvagem foram subdivididos nos tipos clássico, mesenquimal, LGm6-GBM e astrocitoma pilocítico. Os IDH-mutantes foram agrupados como codificadores e não codificadores de 1p/19q e refinados em 2 subgrupos distintos, com base na extensão da metilação do DNA em g-CIMP baixo e g-CIMP alto, fornecendo um aprimoramento na classificação do glioma, independente do grau e da histologia (CECCARELLI *et al.*, 2016).

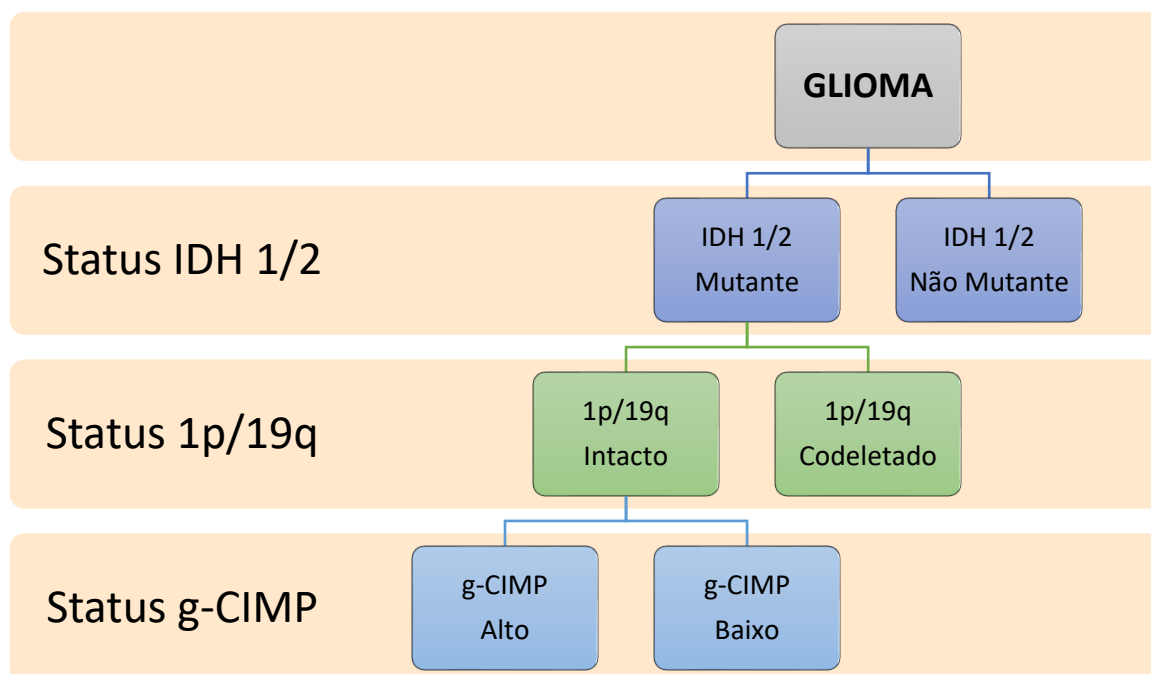


Figura 6. Classificação de Gliomas (Adaptado de MALTA *et al.*, 2018).

Mutação da enzima IDH, codeleção de 1p/19q, metilação do promotor da enzima O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) e g-CIMP+ são biomarcadores prognósticos favoráveis independentes, ou seja, essas alterações são benéficas para os pacientes (MUR *et al.*, 2015).

Cirurgia, radioterapia e quimioterapia com agentes alquilantes ainda são a base do tratamento, afetando enormemente a qualidade de vida dos pacientes. A cirurgia pode estar associada a déficits funcionais agudos, a radioterapia representa um grande risco de comprometimento neurocognitivo e a quimioterapia pode causar toxicidade hematológica e outras toxicidades (WELLER *et al.*, 2015).

Além do tratamento do próprio tumor, muitos pacientes requerem tratamento dos sintomas neurológicos associados, incluindo alterações cognitivas e comportamentais, fadiga e convulsões, os quais também afetam a qualidade de vida dos pacientes (SAMUDRA *et al.*, 2019).

3.1.4 MECANISMOS DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS DOS GLIOMAS

3.1.4.1 MUTAÇÃO IDH 1/2

A enzima IDH1 é responsável pela reação que transforma o isocitrato e o NADP+ em α -cetoglutarato (α -KG) e NADPH, essa reação ocorre no citosol da célula. Mutações nessa enzima levam a formação do ácido 2- hidroxipentérico (2-HG) a partir de α -cetoglutarato (α -KG) (Figura 7), reduzindo os níveis do α -KG e aumentando os de 2-HG, resultando na inibição das enzimas de desmetilação de histona JHDM1, JMJD2 e 5mC hidroxilase, que é da família das enzimas de translocação de dez-onze metilcitosina dioxigenase (TET). A inibição dessas enzimas causa hipermetilação de histonas. A enzima 5-metilpirimidina hidroxilase (5MPH) também é inibida, causando hipermetilação do DNA. Assim, a mutação da IDH pode afetar os padrões de metilação do DNA alterando a expressão de oncogenes, genes supressores de tumores ou outros componentes críticos e metabólicos da via (LIU; LI, 2018) (Figura 7).

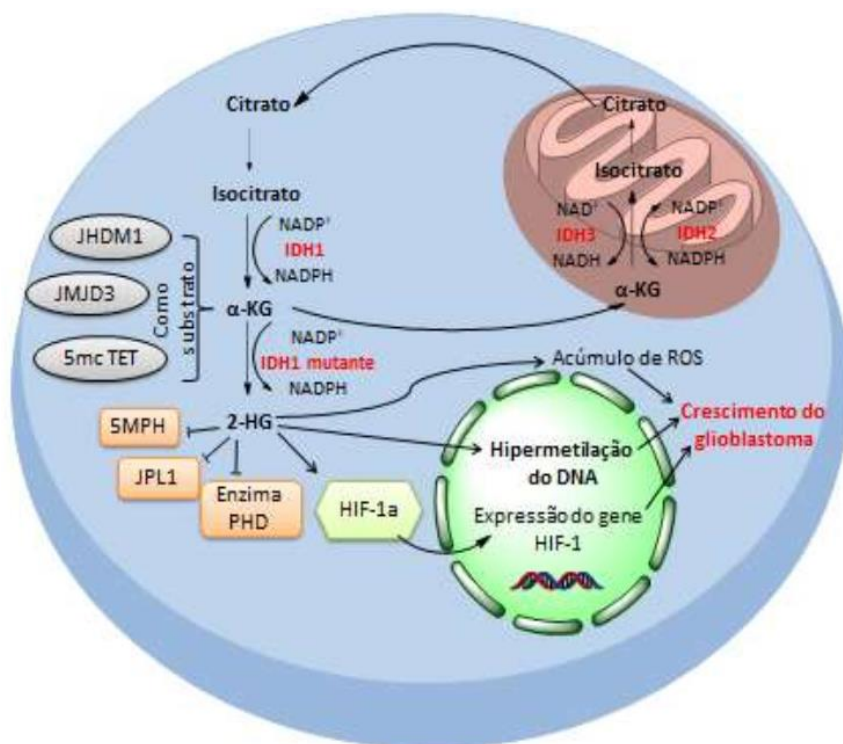


Figura 7. Mutação da IDH no ciclo do ácido tricarboxílico que leva à tumorigênese.

A Figura 8 exemplifica uma das inibições enzimáticas citadas acima, o acúmulo de 2-HG inibe a enzima TET, desta forma não ocorre a desmetilação da 5-metilcitosina (5mC) e a 5-hidroximetilcitosina (5hmC) não é formada, ou seja, o DNA permanece metilado (Figura 8) (WU; ZHANG, 2011).

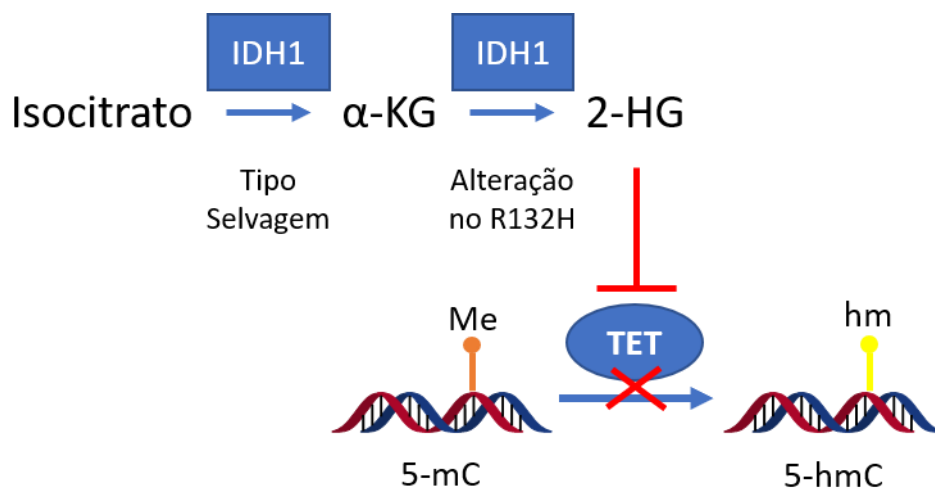


Figura 8. Inibição da enzima TET.

O 2-HG também inibe a enzima prolil hidroxilase (PHD) a qual catalisa muitas reações, como o reparo do DNA alquilado, detecção de níveis de oxigênio e resposta a hipóxia (LIU; LI, 2018). Os níveis aumentados de 2-HG também podem levar a ativação do fator induzível por hipóxia-1 (HIF-1), o qual está envolvido na regulação da expressão gênica no ambiente hipóxico, angiogênese, sobrevivência celular, metabolismo da glicose e transcrição de genes invasivos (ZHAO *et al.*, 2009). Além disso, as semelhanças estruturais entre 2-HG e glutamato indicam que o 2-HG pode ativar os receptores de glutamato nos neurônios, interferindo na homeostase intracelular do cálcio e na produção de EROs (LIU; LI, 2018).

3.1.4.2 CODELAÇÃO 1P/19Q

A codeleção 1p/19q provavelmente ocorre após uma translocação não equilibrada entre os braços dos cromossomos 1 e 19, levando a uma perda combinada de material genético (JENKINS *et al.*, 2006).

3.1.4.3 G-CIMP

O *status* de metilação do DNA resulta da ação das enzimas metilantes e/ ou desmetilantes. A metilação do DNA é a transferência do grupo metil para a posição 5' do anel da citosina através da ação de uma enzima metilante levando a formação da 5mC (Figura 9), isso ocorre principalmente nos dinucleotídeos - CpG (GOLL; BESTOR, 2005). Os CpGs dispersos por todo o genoma são geralmente metilados, a ilha de CpGs, localizada nas regiões promotoras, geralmente não é metilada (Figura 10). Em condições fisiológicas, a metilação da ilha de CpGs geralmente ocorre como um mecanismo de repressão genética em regiões específicas (DE CARVALHO; YOU; JONES, 2010)

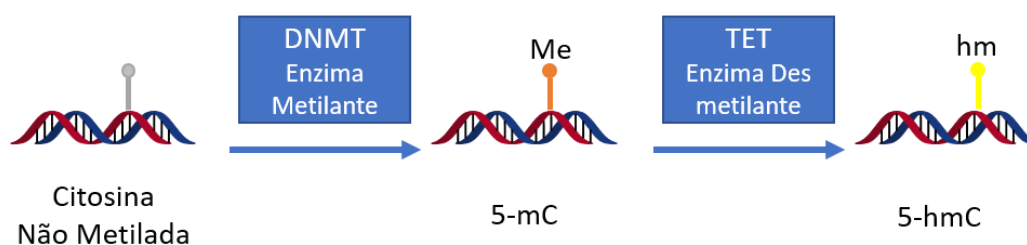


Figura 9. Mecanismo de desmetilação do DNA por TET.

No câncer, a metilação do DNA se torna aberrante e é caracterizada principalmente por hipermetilação em torno dos promotores dos genes e corpos gênicos e hipometilação entre elementos não promotores (Figura 5). A

hipermetilação do promotor é um importante mecanismo de silenciamento epigenético dos genes supressores de tumores (MALTA *et al.*, 2018).

Com base na extensão da metilação global do DNA, descobriu-se dois subconjuntos de gliomas IDH-mutantes/G-CIMP+: um que apresenta baixo grau de metilação do DNA e pior resultado (G-CIMP-baixo); e outro que descreve alta metilação do DNA e melhores resultados (G-CIMP-alto) (Figura 6). Essa classificação reflete um refinamento do diagnóstico de tumores, integrando as características genótípicas e fenotípicas e estreitando os subgrupos definidos. Esse esquema pode ser útil para prever o resultado do paciente e tornar as estratégias terapêuticas mais eficazes e adaptadas a cada paciente (MALTA *et al.*, 2018).

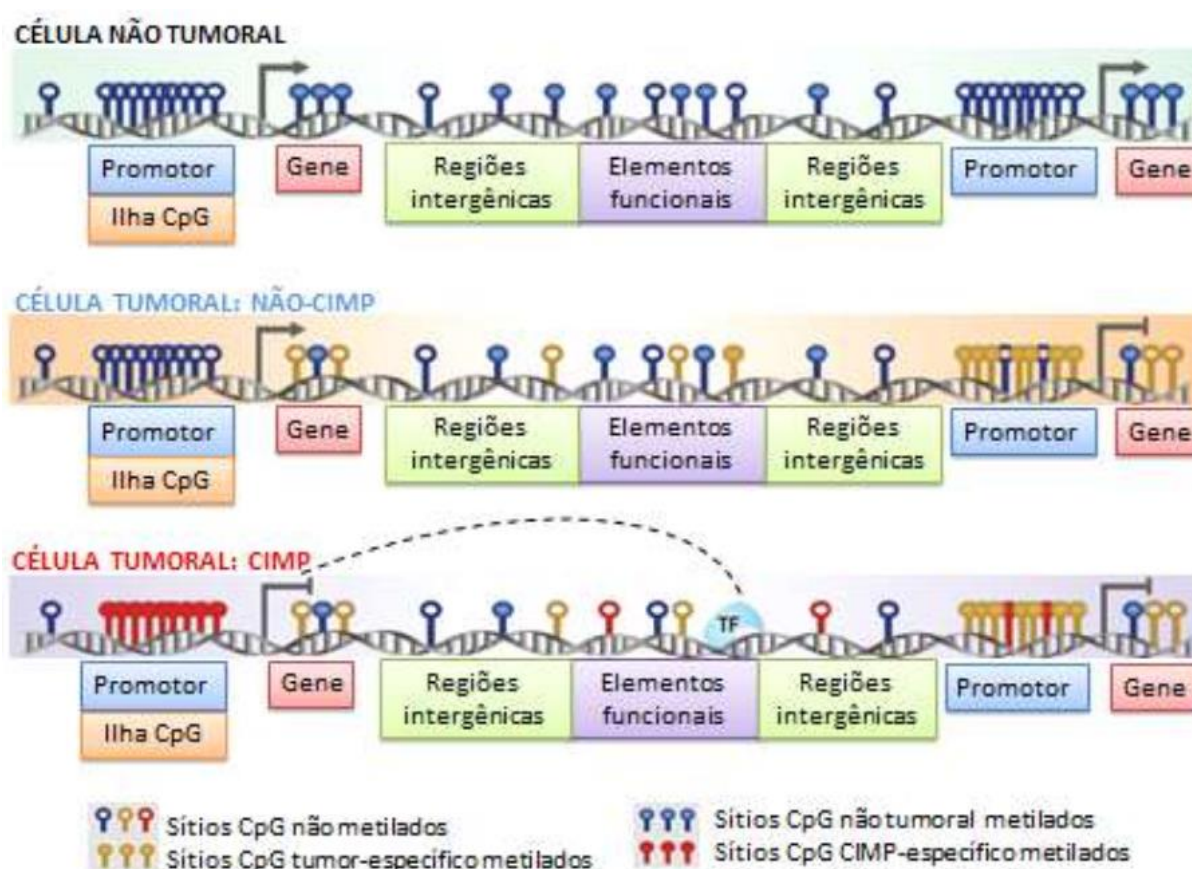


Figura 10. Alterações na metilação do DNA por regiões genômicas em células tumorais (Adaptado de MALTA *et al.*, 2018)

3.1.4.4 METILAÇÃO DO PROMOTOR DA O6-METILGUANINA-DNA-METILTRANSFERASE (MGMT)

A MGMT é uma enzima de reparo de DNA que interfere na ação da TMZ. Essa enzima atua transferindo o grupo metil da posição O6 da guanina do DNA para a sua própria cisteína, o que repara os danos letais ao DNA induzido pela TMZ,

permitindo que a célula tumoral sobreviva (Figura 11a) (JIAPAER *et al.*, 2018). Os níveis de expressão da MGMT correlacionam-se diretamente com o *status* da metilação da ilha CpG do promotor do gene da MGMT, ou seja, quando o promotor está metilado ocorre diminuição da expressão da MGMT e quando ele não está metilado a enzima é expressa normalmente.

Casos de glioblastoma com o promotor da MGMT metilado (Figura 11b) mostraram sobrevida prolongada em comparação a casos em que o promotor não estava metilado. Portanto, a enzima MGMT contribui para a resistência à TMZ (JIAPAER *et al.*, 2018).

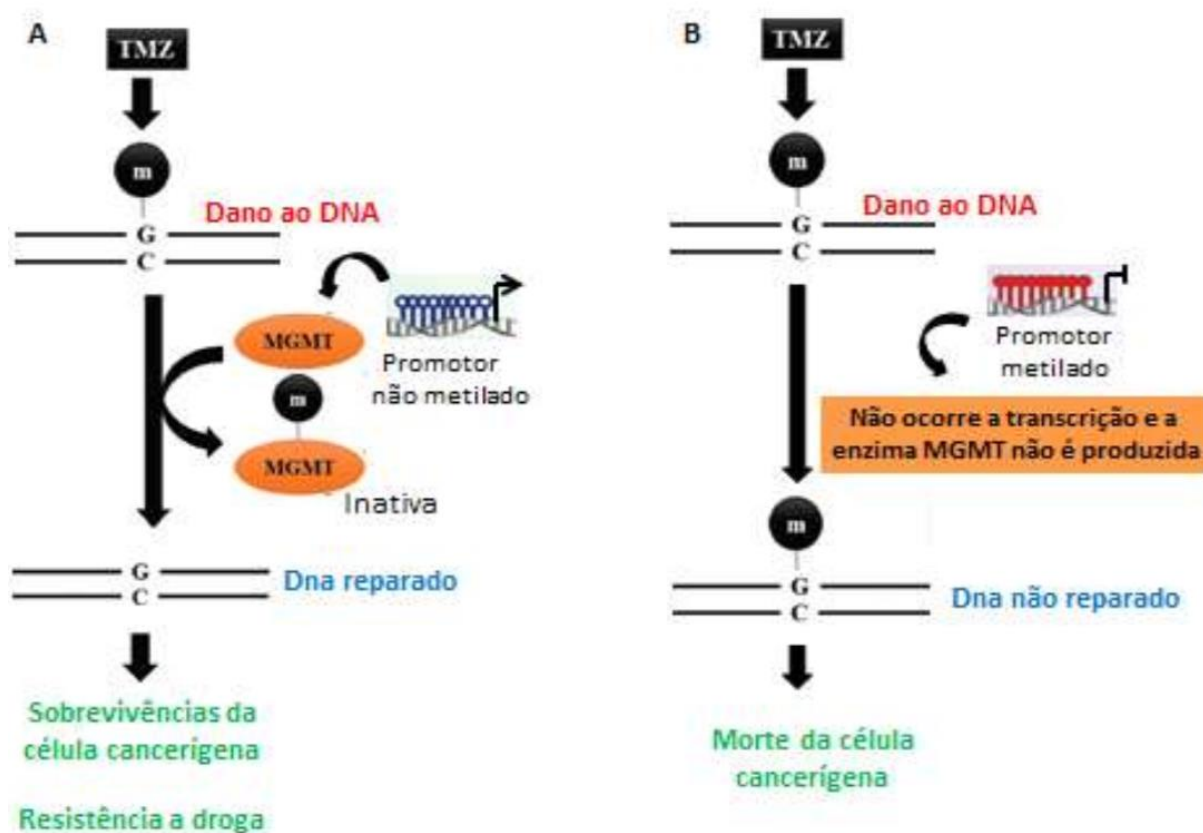


Figura 11. (A) Desmetilação do DNA causada pela enzima MGMT e resistência à TMZ. (B) Metilação do promotor do gene da enzima MGMT auxiliando na ação da TMZ (Adaptado de JIAPAER *et al.*, 2018).

3.1.5 MECANISMO DE AÇÃO DE FÁRMACOS ANTIGLIOMA

A maioria dos ensaios clínicos aborda a sinalização oncogênica via receptores de tirosina quinases, controle do ciclo celular e suscetibilidade à indução de apoptose. Na revisão publicada por Le Rhun *et al.* 2019, vários fármacos que foram testados em estudos de fase II e que atuam nas vias celulares frequentemente

alteradas no glioblastoma, como a PI3K/AKT/mTOR, a proteína de tumor (p53) e a do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) falharam na melhora dos resultados terapêuticos (LE RHUN *et al.*, 2019).

Com exceção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) - bevacizumabe, que prolongou a sobrevida sem progressão, mas não a sobrevida global, nenhuma intervenção farmacológica demonstrou alterar o curso da doença, e a quimioterapia com TMZ é ainda considerada o tratamento padrão de glioblastoma desde 2005 (LE RHUN *et al.*, 2019).

O mecanismo de ação de fármacos que atuam no EGFR e no VEGF são ilustrados na Figura 12. A ativação do EGFR leva a proliferação, invasão e resistência à indução de apoptose. O fármaco EGFR TKI inibe esse receptor, impedindo a ativação da proliferação (Figura 12a). O depatuxizumabe mafodotin, um anticorpo monoclonal associado a uma toxina, atua de outra forma, após a sua ligação ao EGFR, ocorre a internalização do anticorpo com posterior liberação da toxina, levando também a uma inibição da proliferação celular (Figura 12a) (BRENNAN *et al.*, 2013; FELSBURG *et al.*, 2017; LE RHUN *et al.*, 2019).

A Figura 12b ilustra o mecanismo de ação dos medicamentos bevacizumabe e cediranibe. O anticorpo monoclonal bevacizumabe se liga ao VEGF enquanto o fármaco cediranibe atua inibindo o receptor do VEGF (VEGFR), nos dois casos as vias intracelulares que levam a proliferação e angiogênese não são ativadas (LE RHUN *et al.*, 2019; PLATE *et al.*, 1994; SZABO *et al.*, 2016).

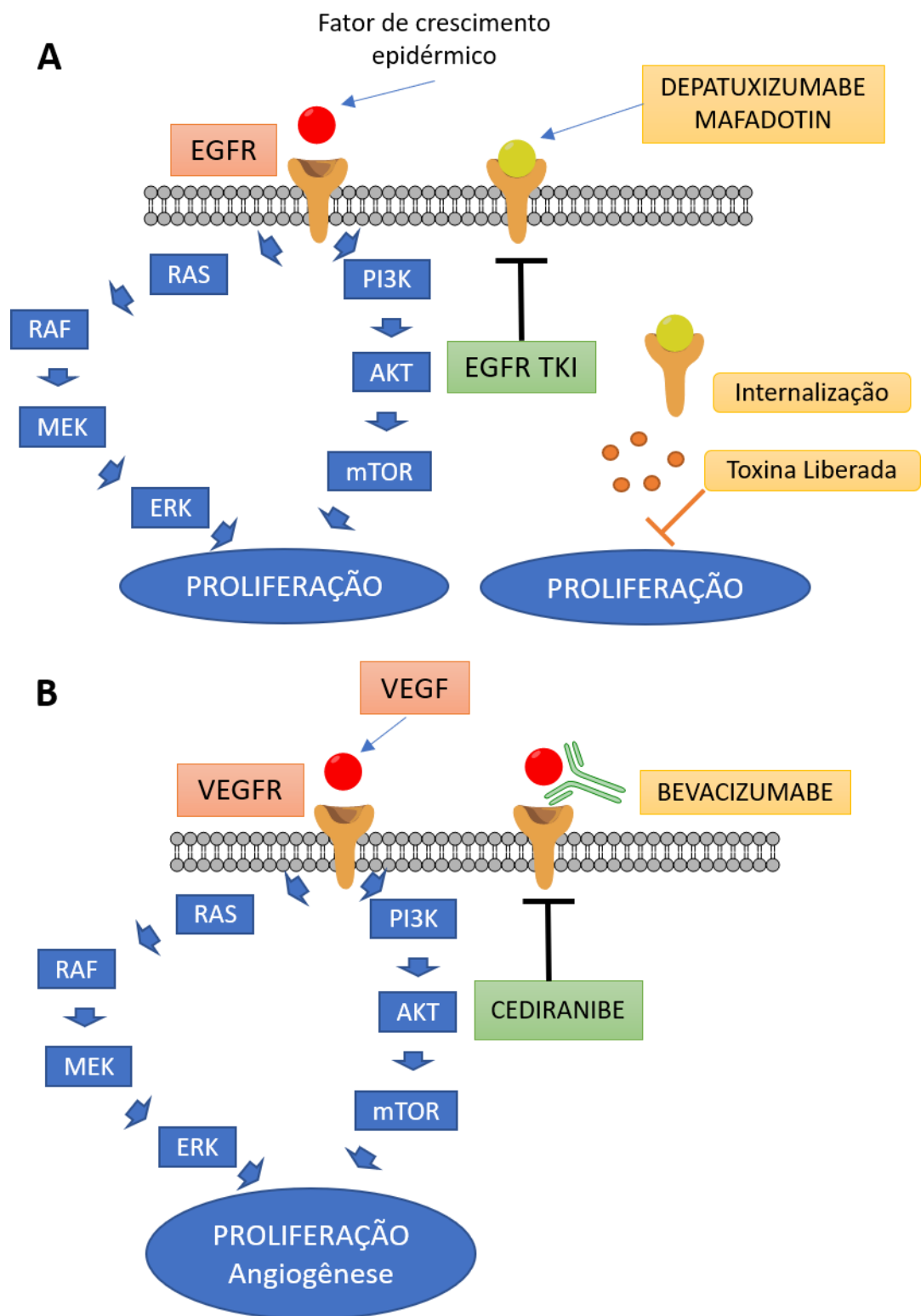


Figura 12. (A) Mecanismo de ação dos fármacos EGFR TKI e depatuxizumabe mafodin. (B) Mecanismo de ação dos fármacos bevacizumabe e cediranibe (Adaptado de LE RHUN *et al.*, 2019).

3.1.6 POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO ANTITUMORAL DAS IMTZDS

Em virtude dos resultados clínicos não satisfatórios citados acima e da baixa sobrevida global proporcionada pelo principal medicamento antiglioma - TMZ, estudos *in vitro* têm sido realizados com o intuito de analisar compostos mais eficazes e com diferentes mecanismos de ação, como por exemplo, as 2,4-tiazolidinediona (TZDD), compostos análogos ao IMTZD. Esses compostos podem atuar de diferentes maneiras, como por exemplo, através da ativação do receptor PPAR γ (ZANDER *et al.*, 2002), aumento da expressão do transportador excitatório de aminoácidos 2 (EAAT2) (CHING *et al.*, 2015), inibição do receptor de IGF-1 (IGF - 1R) (LIU *et al.*, 2010), entre outros (YOUSEFNIA *et al.*, 2018).

Os PPARs são receptores nucleares (FERRÉ, 2004), o subtipo PPAR γ é expresso em vários tipos celulares neuronais, incluindo microglia, astrócitos, oligodendrócitos e neurônios (CHING *et al.*, 2015). Esse receptor é distribuído em uma variedade de células cancerígenas, dentre elas o glioblastoma (MOROSETTI *et al.*, 2004), possuindo agonistas naturais e sintéticos como por exemplo as TZDDs, pioglitazona, rosiglitazona, troglitazona e ciglitazona (YOUSEFNIA *et al.*, 2018).

Após a ativação por ligantes, o PPAR γ forma um heterodímero com o receptor retinoide-X (RXR), e esse complexo liga-se ao elemento de resposta do proliferador de peroxissoma (PPRE) dos genes alvo para induzir a transativação do sinal (Figura 13). Esse receptor regula o metabolismo da gordura, a homeostase energética, a proliferação e a inflamação (MOROSETTI *et al.*, 2004).

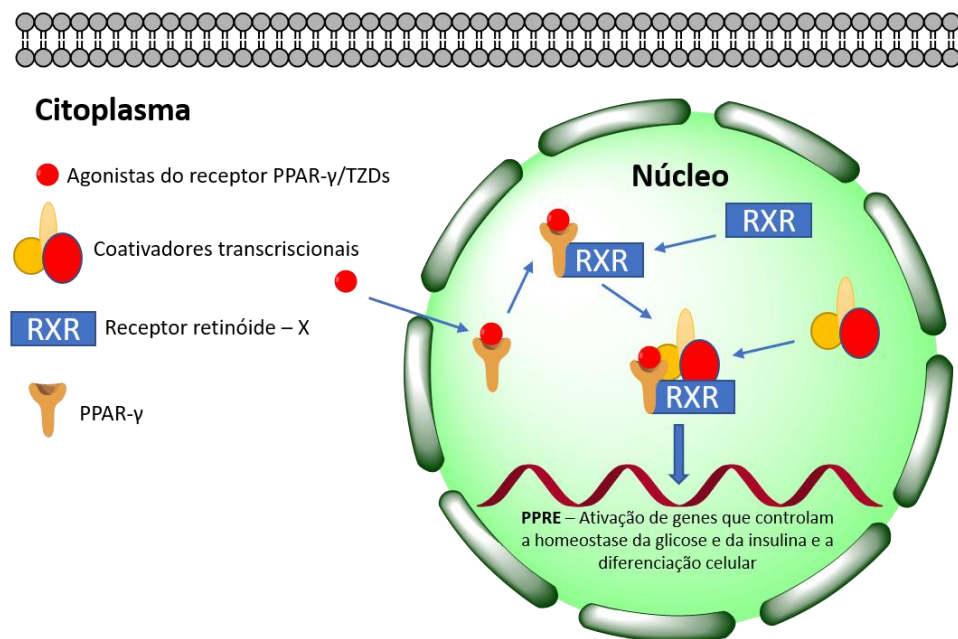


Figura 13. Ativação de genes via PPAR γ (Adaptado de GROMMES; LANDRETH; HENEKA, 2004).

O estudo realizado por Zander, et al. 2002 demonstrou que células C6 de glioma incubadas com 30 μ M de ciglitazona aumentam a expressão das proteínas pró-apoptóticas BAX e BAD, portanto um possível mecanismo de ação antiglioma das glitazonas seria o aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas através da ativação do PPAR γ . As proteínas BAX e BAD são expressas quando ocorre ativação dos seus respectivos genes. A indução da apoptose causada pelo PPAR γ também pode ocorrer através da diminuição da atividade de p-p85, p-Akt, redução da expressão de proteínas do linfoma de células B-2 (Bcl-2) ou supressão da via PI3K/Akt (YOUSEFNIA *et al.*, 2018). Em geral, o envolvimento de ligantes do PPAR γ na tumorigênese sugere que eles possuem potencial terapêutico isoladamente ou em combinação com outros medicamentos anticâncer (YOUSEFNIA *et al.*, 2018). Nesse contexto, Grommes et al., 2010 mostraram que pacientes diabéticos com glioblastoma que foram tratados com agonistas do PPAR γ exibiram uma sobrevida média aumentada de 19 meses em comparação com pacientes que receberam o tratamento padrão para glioblastoma, para os quais a sobrevida mediana foi de 6 meses (GROMMES *et al.*, 2010).

Outro mecanismo de ação antiglioma estudado é o aumento da expressão do EAAT2 em células que possuem uma redução desse transportador, como nas células U87MG de glioma (CHING *et al.*, 2015). O EAAT2 é responsável por até 90% da captação extracelular de glutamato para o interior das células gliais. Após o

glutamato ser transportado para o interior dessa célula esse é trocado, através do trocador Xc, por cisteína extracelular (YE; SONTHEIMER, 1999). A captação intracelular de cisteína via sistema Xc permite a sobrevivência das células do glioma através da formação da glutathiona, a qual protege a célula contra as espécies reativas endógenas de oxigênio (CHUNG *et al.*, 2005) (Figura 14).

As linhagens celulares de glioblastoma, assim como outras linhagens de glioma, expressam baixos níveis do EAAT2. O número reduzido desse transportador resulta em concentrações extracelulares anormalmente altas de glutamato, gerando excitotoxicidade, que causa necrose do parênquima adjacente e contribui para a proliferação (CHING *et al.*, 2015).

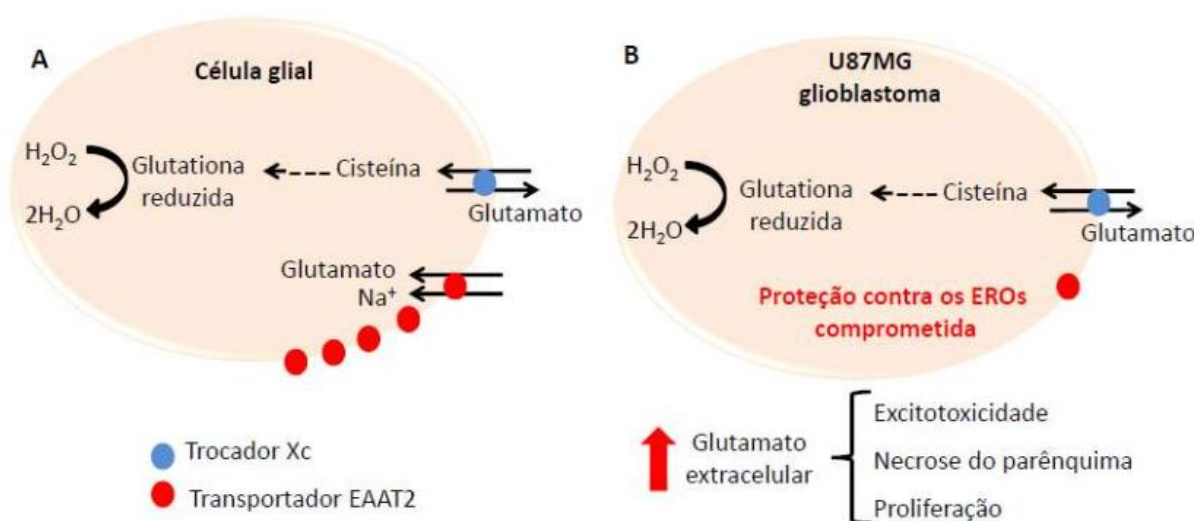


Figura 14. (A) Trocador Xc e captação de glutamato extracelular através do EAAT2. (B) Redução da expressão do EAAT2 e consequente aumento de glutamato extracelular e suas implicações (Adaptado de CHING *et al.*, 2015).

O estudo realizado por Ching *et al.* 2015 verificou que a pioglitazona aumenta a expressão do EAAT2 em células U87 e reduz os níveis extracelulares de glutamato, possuindo, portanto, um efeito antiproliferativo. Além disso, o antagonista do PPAR γ GW9662 inibiu o efeito da pioglitazona nos níveis extracelulares de glutamato, indicando dependência do receptor PPAR γ . A pioglitazona também reduziu significativamente a viabilidade celular das células U87MG (30-100 μ M) e U251MG (100 μ M). O efeito na viabilidade foi parcialmente dependente da ativação do PPAR γ nas células U87MG, mas não nas células U251MG (CHING *et al.*, 2015).

Além desse mecanismo de ação antiproliferativo, proposto para a pioglitazona, estudos demonstram que agonistas do PPAR γ podem aumentar ou diminuir a proliferação de células cancerígenas de diferentes linhagens através da regulação da expressão de fatores proliferativos como: o fator nuclear Kappa β , a p38^{MAPK}, a ciclina D, o receptor para produtos de glicação avançada e os inibidores das quinase dependente de ciclina ou quinase 4 dependente de ciclina (YOUSEFNIA *et al.*, 2018).

Derivados da TZDD também demonstraram a capacidade de inibir os receptores do fator de crescimento tipo insulina (IGF-1R) (LIU *et al.*, 2010; MUGHAL; KUMAR; VIKRAM, 2015), os quais são importantes para a captação de glicose em astrócitos (FERNANDEZ *et al.*, 2017) e desempenham um papel central nas vias de sinalização que envolvem crescimento celular, proliferação e apoptose (LIU *et al.*, 2010). O IGF-1R possui uma forte atividade anti-apoptótica e a regulação negativa desse receptor leva à apoptose maciça de células cancerígenas (BASERGA; PERUZZI; REISS, 2003).

IGF-1R é altamente relacionado ao receptor de insulina (IR), uma vez que quando ocorre a ligação simultânea da insulina ao seu receptor e do fator de crescimento tipo insulina (IGF-1) ao seu receptor, há um aumento da captação de glicose em astrócitos (FERNANDEZ *et al.*, 2017). Nas células tumorais há uma alta expressão dos IGF-1R (LIU *et al.*, 2010), o que possibilita o aumento da captação de glicose e redução do dano oxidativo. As células tumorais captam mais glicose do que as células normais porque realizam mais a glicólise anaeróbica do que a aeróbica, isso ocorre para que haja uma redução dos níveis de espécies reativas produzidas durante a fosforilação oxidativa da glicólise aeróbica (GHANBARI MOVAHED *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2010), logo, supõem-se que inibidores dos IGF-1R reduzam a captação de glicose pela célula tumoral as deixando mais suscetíveis ao dano oxidativo.

3.2 ATIVIDADE INIBIDORA DAS MAOS

3.2.1 MONOAMINOXIDASE (MAO)

As monoaminas oxidases (MAO, E.C. 1.4.3.4.) são flavoproteínas que catalisam a desaminação oxidativa de uma série de monoaminas biogênicas e dietéticas formando os aldeídos correspondentes, peróxido de hidrogênio e amônia (Figura 15). Em humanos, existem duas isoformas de MAO separadas (MAO-A e MAO-B), que exibem diferentes, mas sobrepostas, substrato e especificidades de inibidor (GAWESKA; FITZPATRICK, 2011; SHIH; CHEN; RIDD, 1999). A MAO-A, que oxida preferencialmente a serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), a norepinefrina (NE) e a epinefrina (EN), é irreversivelmente inibida por baixas doses de clorgilina. Em contraste, MAO-B prefere feniletilamina (PEA) como substrato e é irreversivelmente inativada por baixas doses de deprenil (selegilina). A dopamina (DA) e a tiramina são substratos comuns para MAO-A e MAO-B. Devido à sua capacidade de metabolizar monoaminas que funcionam como neurotransmissores, a pesquisa sobre as isoformas da MAO no passado se concentrou no papel cerebral das duas enzimas. No entanto, estudos de expressão mais recentes indicaram expressão abundante de isoformas da MAO em tecidos periféricos, que claramente excede a expressão no cérebro (SU *et al.*, 2004). Por exemplo, a MAO-A humana é expressa predominantemente na placenta, tecido adiposo, na glândula tireóide e no pulmão, enquanto a expressão em várias partes do cérebro é bastante baixa. Em contraste, a MAO-B é predominantemente expressa em várias partes do sistema nervoso central (hipotálamo, córtex pré-frontal, amígdala, medula espinhal), mas útero, rim, fígado e coração também são fontes ricas de MAO-B. No sistema nervoso central, a MAO-A é encontrada predominantemente em neurônios catecolaminérgicos, enquanto a MAO-B é mais abundante em neurônios serotoninérgicos e histaminérgicos, bem como em células gliais (SHIH; CHEN; RIDD, 1999). A atividade anormal da MAO tem sido implicada em uma série de distúrbios neurológicos e psiquiátricos, como depressão e ansiedade (BORTOLATO; CHEN; SHIH, 2008).

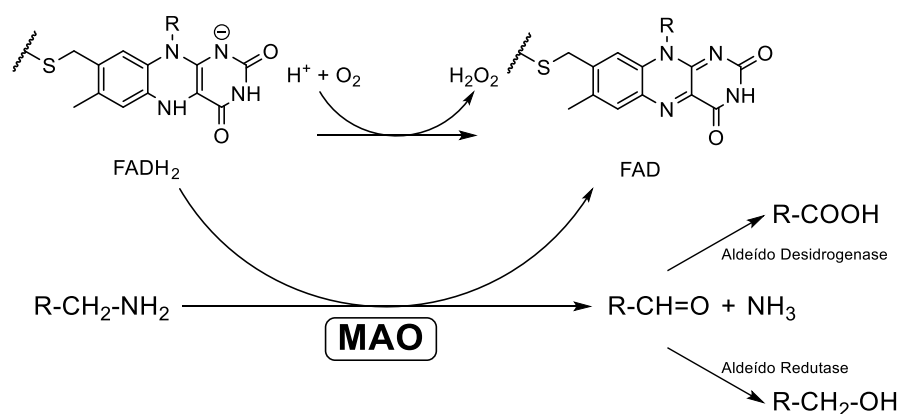


Figura 15. Representação esquemática da desaminação oxidativa de monoaminas pela MAO. Os aldeídos gerados são metabolizados por aldeído desidrogenase e redutase.

Os inibidores da monoamina oxidase foram desenvolvidos há muito tempo e são amplamente utilizados em clínicas para o tratamento de muitas doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas. Os inibidores da MAO-A demonstraram ser drogas antidepressivas eficazes (BORTOLATO; CHEN; SHIH, 2008). Em contraste, os inibidores da MAO-B, como a selegilina e a rasagilina, têm sido usados para o tratamento da doença de Parkinson (MANDEL *et al.*, 2003), mas permanece uma questão de discussão se as atividades inibitórias da MAO desses compostos são a base para o tratamento terapêutico efeito. Os avanços recentes no desenvolvimento de inibidores da MAO clinicamente relevantes e as melhorias em nossa compreensão dos mecanismos moleculares das interações enzima-inibidor não só forneceram uma excelente base para o tratamento clínico de doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas, mas também demonstraram a papel importante da MAO no cérebro.

3.2.2 ENZIMOLOGIA DAS ISOFORMAS MAO

3.2.2.1 MECANISMO DE REAÇÃO DA CATÁLISE MAO

Como indicado acima, as monoamina oxidases (MAOs) são flavoproteínas cataliticamente ativas que catalisam a oxidação de amins nos aldeídos correspondentes. Esta reação requer dioxigênio molecular e produz quantidades estequiométricas de peróxido de hidrogênio e amônia (EDMONDSON *et al.*, 2009; SCRUTTON, 2004). Como o peróxido de hidrogênio é um produto da reação da MAO, as duas isoformas da MAO têm sido implicadas na regulação redox celular.

Embora as monoamina oxidases tenham sido estudadas extensivamente, seus mecanismos catalíticos detalhados não foram totalmente esclarecidos. O conhecimento atual sobre a catálise de MAO está resumido na Figura 16. Após a ligação do substrato de amina no sítio ativo, o cofator FAD oxidado é reduzido e um complexo de imina ligado à enzima (MAO-FADred-imina) é formado. Para a maioria dos substratos, esse complexo (MAO-FAD-imina-red) reage então com o oxigênio atmosférico para reoxidar o FAD (MAO-FADox-imina) e liberar peróxido de hidrogênio. Em seguida, o complexo MAO-FADoximina se dissocia, liberando a imina que se hidrolisa não enzimaticamente para produzir o produto aldeído e a amônia. Alternativamente, o complexo de enzima-imina reduzido (MAO-FADred-imina) pode primeiro se dissociar, liberando a imina, que hidrolisa para produzir os produtos aldeído e amônia. Finalmente, a enzima reduzida (MAO-FADred) é reoxidada pelo oxigênio atmosférico para formar peróxido de hidrogênio. Assim, a reação MAO consiste em uma semi-reação redutiva e uma semi-reação oxidativa, na qual o estado de oxidação do FAD ligado à enzima circula entre o FADox e o FADred (Figura 16). A semi-reação redutiva é iniciada por uma clivagem na ligação C–H do átomo de carbono pró-quiral da porção amina. A estereoquímica da abstração de hidrogênio (remoção de hidrogênio pro-R) é bem definida (YU *et al.*, 1986), e experimentos com MAO-B bovino sugeriram que o tunelamento de hidrogênio pode estar envolvido (JONSSON; EDMONDSON; KLINMAN, 1994). A oxidação catalisada por MAO de substratos marcados estereoespecificamente revelou pronunciados efeitos de isótopos cinéticos (NANDIGAMA; EDMONDSON, 2000; WALKER; EDMONDSON, 1994), sugerindo que a clivagem da ligação C–H pode constituir a etapa limitante da taxa do ciclo catalítico. Em princípio, a abstração inicial de hidrogênio pode ocorrer por meio de três mecanismos diferentes: (1) transferência de hidreto heterolítico, (2) abstração de H⁺ heterolítico e (3) remoção homolítica de um radical hidrogênio (H•). Existem prós e contras para cada um desses mecanismos e, portanto, a química detalhada das diferentes reações elementares ainda precisa ser trabalhada.

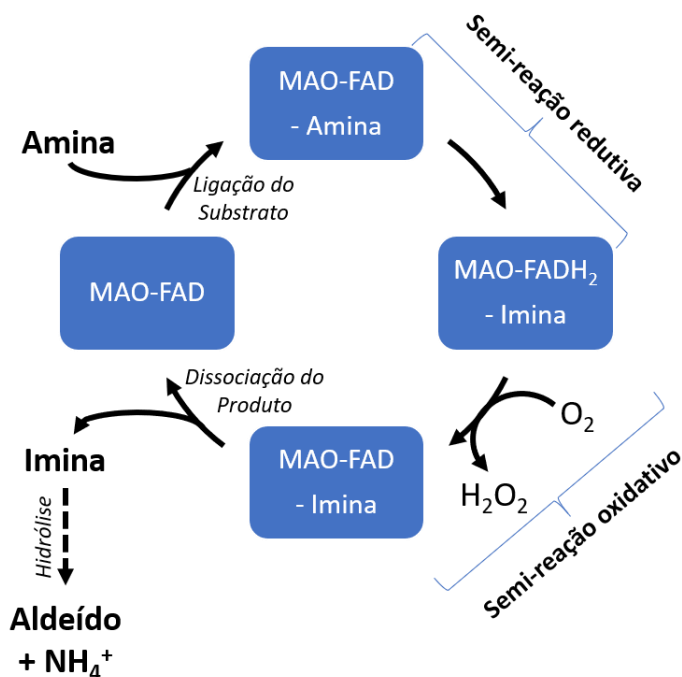


Figura 16. Esquema cinético da reação envolvendo a MAO indicando as semi-reações: redutiva e oxidativa.

Outro problema não resolvido do mecanismo de reação das isoformas da MAO é a questão do modo de interação entre os substratos da MAO e o cofator de flavina. A maioria dos especialistas concorda que a porção amina desprotonada dos substratos da MAO se liga ao sítio ativo. As aminas desprotonadas são então oxidadas à imina protonada, e o cofator FAD oxidado é reduzido à sua forma de hidroquinona. Os dados estruturais de várias isoformas de MAO sugerem que o cofator de flavina no sítio ativo das enzimas pode não estar presente como uma porção plana. Em vez disso, o anel isoaloxazina exibe uma conformação curvada (Figura 17) na forma oxidada da enzima, à qual o substrato está ligado. É provável que tal flexão induza a rearranjos na distribuição da densidade de elétrons do anel aloxazina (EDMONDSON *et al.*, 2009). Além disso, os resíduos de tirosila na proximidade do local de ligação do substrato (Tyr435 para MAO-B, Tyr444 para MAO-A) foram sugeridos para aumentar o caráter nucleofílico do nitrogênio da amina dos substratos, e esses dois fatores podem contribuir para permitir um ataque nucleofílico do substrato de amina desprotonada no cofator FAD ligado covalentemente (EDMONDSON *et al.*, 2009).

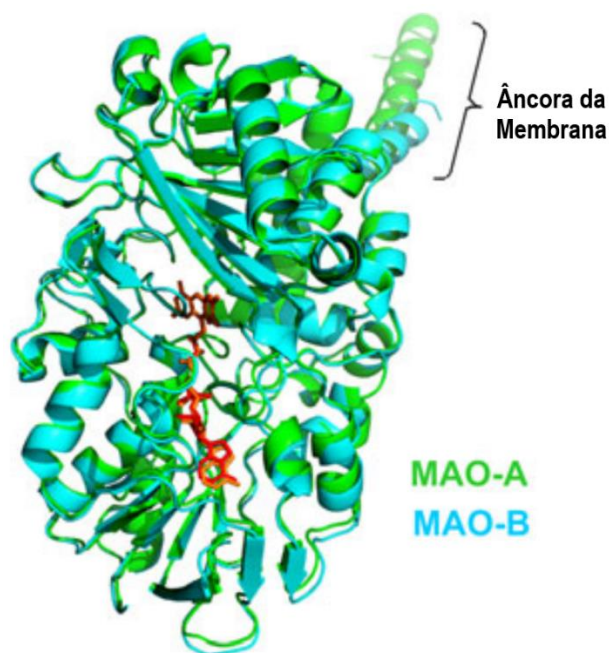


Figura 17. Sobreposição das estruturas tridimensionais das isoformas de MAO-A e B. MAO-A é destacada em *verde*, e MAO-B é destacada em *ciano*. FAD é destacado em *laranja e vermelho*.

3.2.2.2 FUNÇÕES CELULARES E FISIOLÓGICAS DAS ENZIMAS MAO

A função biológica das monoaminooxidasas tem sido definida principalmente por suas atividades enzimáticas em aminas biogênicas e a produção concomitante de peróxido de hidrogênio. Assim, o impacto das enzimas MAO tem sido discutido predominantemente no que diz respeito ao metabolismo da amina, por um lado, e à produção de peróxido de hidrogênio, por outro. Pouca atenção, entretanto, tem sido dada aos outros produtos da reação MAO, a saber, amônia e aldeídos. Tanto a amônia quanto os aldeídos correspondentes que são produzidos pela desaminação oxidativa podem afetar o metabolismo celular e as funções celulares. As duas isoformas de MAO (MAO-A e MAO-B) que são conhecidas em mamíferos são caracterizadas por propriedades enzimáticas exclusivas, conforme descrito na seção anterior. Além disso, cada isoforma parece servir a funções específicas no organismo, conforme indicado por seus perfis de expressão específicos de isoforma distintos. No entanto, enquanto o papel da MAO-A como uma enzima de controle dos níveis de neurotransmissores, em particular de 5-HT, está bem estabelecido, o papel biológico da MAO-B é muito menos compreendido.

3.2.2.3 MANUTENÇÃO DOS NÍVEIS FISIOLÓGICOS DE AMINAS PELAS ENZIMAS MAO

A pesquisa sobre MAOs foi focada no passado em seus papéis no sistema nervoso central, uma vez que ambas as isoenzimas são expressas em várias populações de células do cérebro (JAHNG *et al.*, 1997). Enquanto os principais locais de expressão da MAO-A são neurônios adrenérgicos e noradrenérgicos do *locus coeruleus*, a MAO-B é predominantemente expressa nos neurônios serotoninérgicos da rafe e nos neurônios histaminérgicos do hipotálamo posterior, bem como nos astrócitos (JAHNG *et al.*, 1997; SAURA *et al.*, 1996; WESTLUND *et al.*, 1988). A expressão de ambas as isoformas no cérebro destacou sua importância na regulação da homeostase de neurotransmissores, em particular de 5-HT e DA (CASES *et al.*, 1995; GRIMSBY *et al.*, 1997). Portanto, os MAOs foram reconhecidos como alvos farmacológicos importantes no tratamento de distúrbios neurológicos e doenças neurodegenerativas que são caracterizadas por metabolismo anormal de aminas (BORTOLATO; CHEN; SHIH, 2008; HENCHCLIFFE; SEVERT, 2011). Além do sistema nervoso central, descobriu-se que a maioria dos tecidos periféricos contém ambas as enzimas MAO (BILLETT, 2004). Ambas as isoenzimas são altamente expressas no trato gastrointestinal e no fígado, onde são consideradas vitais para a degradação das aminas alimentares ingeridas que, de outra forma, poderiam exibir efeitos deletérios no organismo (YAMADA; YASUHARA, 2004). Em outras palavras, acredita-se que as enzimas MAO funcionem como um firewall contra o bombardeio alimentar de aminas. A inibição farmacológica da atividade da MAO-A pode resultar em uma crise hipertensiva fatal quando a amina tiramina simpatomimética é ingerida (YOUDIM; FINBERG, 1987). Por outro lado, o 5-HT, que é degradado pela MAO-A, é vital para a regulação da função da mucosa intestinal (HANSEN; WITTE, 2008). Apesar do fato de que os níveis de expressão de MAOs no trato gastrointestinal excedem aqueles no cérebro, surpreendentemente, pouco se sabe sobre os papéis dos MAOs neste órgão.

Ambas as isoformas MAO também são encontradas nos rins, onde eles estão envolvidos na regulação da pressão arterial (LI *et al.*, 2008). A expressão de MAO-A no sinciciotrofoblasto da placenta e em monócitos estimulados por interleucina-4, e a expressão de MAO-B em plaquetas e linfócitos não são totalmente compreendidas, mas têm sido relacionadas à eliminação de aminas vasoativas endógenas e xenobióticas (BEN-HARARI; YOUDIM, 1981; BILLETT,

2004; BOND; CUNDALL, 1977; CHAITIDIS *et al.*, 2004; SIVASUBRAMANIAM *et al.*, 2002). De fato, a expressão prejudicada de MAO-A na placenta se correlaciona com a ocorrência de pré-eclâmpsia, que é caracterizada por hipertensão (SIVASUBRAMANIAM *et al.*, 2002), mas as condições patológicas não foram completamente esclarecidas.

3.2.2.4 A EXPRESSÃO DE MAO AFETA A HOMEOSTASE REDOX CELULAR

Conforme descrito acima, a expressão de MAO tem sido principalmente relacionada à sua capacidade de desativar aminas em vários tecidos. No entanto, a atividade da MAO é sempre acompanhada pela produção de peróxido de hidrogênio (Figura 15). O peróxido de hidrogênio junto com o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e o radical hidroxila ($OH \cdot$) são classificados como EROS. EROS têm funções biológicas duplas (Figura 18). Tradicionalmente, as EROS têm sido consideradas potentes riscos biológicos que causam modificações oxidativas de praticamente todas as macromoléculas, como ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (UFER *et al.*, 2010). Essas modificações oxidativas podem impactar a funcionalidade dessas moléculas e podem, eventualmente, induzir a morte celular (MAGDER, 2006). Curiosamente, as próprias proteínas MAO mostraram ser direcionadas por modificações oxidativas, que causam sua subsequente desativação (WIESNER *et al.*, 1989). Por outro lado, tornou-se recentemente aparente que o tom do peróxido celular é um importante elemento regulador das cascatas de sinalização intracelular e da expressão gênica (UFER *et al.*, 2010). Por causa dessa função reguladora, o equilíbrio redox de uma célula é mantido e precisamente ajustado por uma série de mecanismos pró-oxidativos e antioxidantes (UFER *et al.*, 2010). Foi demonstrado que a produção de peróxido de hidrogênio pela atividade da MAO altera este equilíbrio redox celular em vários modelos celulares, incluindo epitélio renal (VINDIS *et al.*, 2001), miócitos (MANOLI *et al.*, 2005; MIALET-PEREZ *et al.*, 2007) e neurônios (FITZGERALD *et al.*, 2007). Notavelmente, a própria expressão da MAO-A é induzida por peróxidos em células monocíticas (CHAITIDIS *et al.*, 2005), sugerindo a existência de *loops* positivos de resposta regulatória.

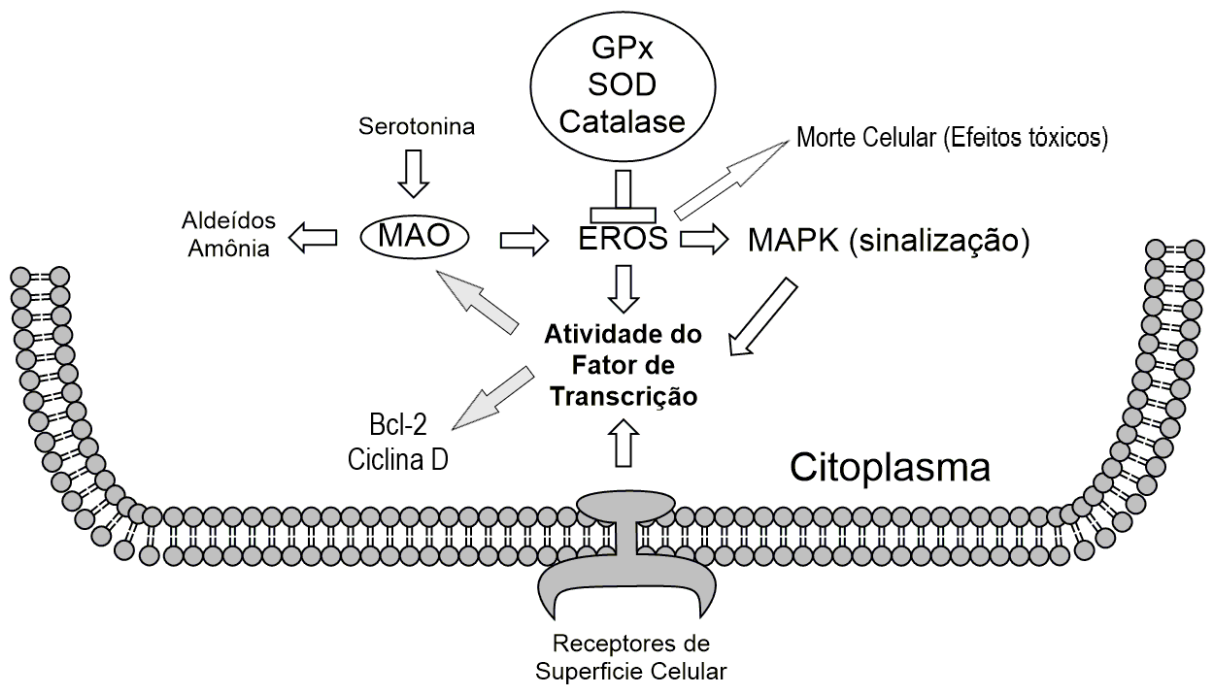


Figura 18. Implicações funcionais de MAOs nas vias de sinalização celular.

Os mediadores da sinalização celular e regulação da expressão gênica que são afetados pelo peróxido celular incluem proteínas quinases como ERK (quinase regulada por sinal extracelular) e JNK (quinase N-terminal c-Jun), e os fatores de transcrição NF-kappa B e AP1 (proteína ativadora 1) (BRIGELIUS-FLOHÉ; FLOHÉ, 2011; GUYTON *et al.*, 1996; UFER *et al.*, 2010). Em particular, a ativação de ERK1/2 através do peróxido de hidrogênio gerado pela atividade da MAO foi mostrada em vários relatórios (FITZGERALD *et al.*, 2007; KUNDUZOVA *et al.*, 2002; VINDIS *et al.*, 2001). A ativação de ERK1/2 resulta em sua translocação do citoplasma para o núcleo, onde pode alterar a expressão gênica por fosforilação de uma série de proteínas-alvo (YOON; SEGER, 2006). Os alvos da ativação de ERK1/2 são fatores pró-sobrevivência, como reguladores do ciclo celular (THEODORAS; ZON; KYRIAKIS, 1997). De fato, o peróxido de hidrogênio gerado pela atividade da MAO-A estimula a proliferação celular em vários modelos celulares (KALUDERCIC *et al.*, 2011; VINDIS *et al.*, 2001). Por outro lado, o estresse oxidativo produzido pela atividade da MAO promoveu a morte celular em células neuronais e cardíacas (FITZGERALD *et al.*, 2007; KALUDERCIC *et al.*, 2011). Assim, o efeito da atividade da MAO nas funções celulares depende da quantidade de peróxido de hidrogênio produzida e da capacidade das células de lidar com níveis aumentados de peróxido de hidrogênio (GIORGIO *et al.*, 2007) (Figura 18). Neurônios dopaminérgicos na substância negra de pacientes com Parkinson exibem

capacidades antioxidantes prejudicadas, conforme indicado por baixos níveis de glutathione reduzida (PEARCE *et al.*, 1997). Em tais células, espera-se que um aumento relativamente modesto na atividade da MAO leve a alterações funcionais pronunciadas. Em contraste, células com alta capacidade antioxidante podem ser menos sensíveis às alterações redox induzidas pela super expressão de MAO. Deve-se enfatizar neste ponto que a sinalização celular dependente de redox está sempre acoplada a outros mecanismos de sinalização e, em alguns casos, os alvos celulares são os mesmos. Por exemplo, nas células do músculo liso vascular, o peróxido de hidrogênio atua em conjunto com o 5-HT por meio da ativação dos receptores de superfície celular do 5-HT para ativar ERK1/2 e causar sua translocação para o núcleo (MIALET-PEREZ *et al.*, 2007).

Em conclusão, a atividade da MAO resulta na geração de estresse oxidativo celular, que por sua vez é traduzido em alteração da sinalização celular e expressão gênica (Figura 18). No entanto, deve-se ter cuidado ao discutir o papel biológico desse produto altamente reativo da atividade da MAO.

Dependendo das concentrações relativas de peróxido de hidrogênio e da atividade das vias de antagonismo, o resultado da sinalização induzida pelo peróxido de hidrogênio pode ser diametralmente oposto (Figura 18).

3.2.2.5 A ATIVIDADE DA MAO MODULA A VIA INTRÍNSECA DA MORTE CELULAR APOPTÓTICA

A atividade da MAO também foi associada à indução de morte celular. A morte celular pode ocorrer de uma maneira amplamente não regulada (necrose) ou seguindo um processo altamente ordenado (apoptose) (KANDUC *et al.*, 2002). As vias de sinalização da apoptose podem ser subdivididas em via extrínseca, que retransmite os sinais dos receptores da superfície celular para a maquinaria apoptótica intracelular e a via intrínseca, que depende da integridade mitocondrial. A apoptose induzida por qualquer uma das vias frequentemente resulta na ativação da caspase-3 efetora (PORTER; JÄNICKE, 1999). A via extrínseca traduz os sinais dos receptores de morte celular na superfície celular por meio da ativação da caspase-8 para a caspase-3 efetora. Em contraste, a via intrínseca é induzida por disfunção mitocondrial, que leva à liberação de citocromo C do espaço intermembrana para o citosol e, subsequentemente, à ativação da caspase-9 (FRANKLIN, 2010). Alternativamente, uma resposta ao estresse no retículo endoplasmático pode ativar

a caspase-12, que então ativa as caspases efetoras a jusante (FRANKLIN, 2010; MARTINOU; YOUNG, 2011).

Sua posição privilegiada na membrana mitocondrial externa torna as enzimas MAO excelentes candidatas a reguladores da via intrínseca da apoptose. O evento chave da via intrínseca – a liberação de citocromo c – é regulado pela complexa interação de proteínas mitocondriais pró e anti-apoptóticas, em particular de proteínas Bcl-2 (MARTINOU; YOUNG, 2011). Além disso, o equilíbrio entre a produção mitocondrial de EROS e a atividade das enzimas eliminadoras de EROS, incluindo superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase 4 (GPx4), modula este evento-chave de sinalização apoptótica (HOLLEY; DHAR; CLAIR, 2010; IMAI; NAKAGAWA, 2003). A atividade da GPx4, por exemplo, suprime a morte celular por apoptose, reduzindo os hidroperóxidos da cardiolipina, um fosfolípido específico da mitocôndria (IMAI; NAKAGAWA, 2003). O citocromo c é retido no espaço intermembrana mitocondrial por meio de sua associação com a cardiolipina. Essa ligação é prejudicada quando a cardiolipina é oxidada a hidroperóxidos de cardiolipina. A atividade da MAO, por outro lado, gera peróxidos na superfície mitocondrial e, portanto, MAO-A e GPx4 podem ser consideradas enzimas antagonistas. A regulação positiva da expressão de MAO-A pode inclinar o equilíbrio redox mitocondrial afinado em favor de eventos pró-oxidativos, que podem prejudicar a cadeia respiratória e outras funções mitocondriais (CADENAS; DAVIES, 2000; COHEN; FAROOQUI; KESLER, 1997). Além disso, o peróxido de hidrogênio produzido pela MAO ativa as proteínas quinases como a JNK (KALUDERCIC *et al.*, 2011). Esta quinase, por sua vez, inicia eventos de sinalização que levam à indução de proteínas pró-apoptóticas da família de proteínas Bcl-2 (DEL RIO; SERAFINI; PELLEGRINI, 2002). As proteínas quinases da família das MAP quinase também afetam a própria expressão do gene MAO. A sinalização da MAP quinase mostrou induzir a expressão da MAO-B através dos fatores de transcrição c-Jun e Egr-1 (CAO *et al.*, 2009; WONG *et al.*, 2002a, 2002b), e da MAO-A através do silenciamento do repressor transcricional CDCA7L (OU; CHEN; SHIH, 2006). Além disso, a MAP quinase p38 foi recentemente mostrado para inibir a atividade MAO-A diretamente pela fosforilação da proteína MAO (CAO *et al.*, 2009).

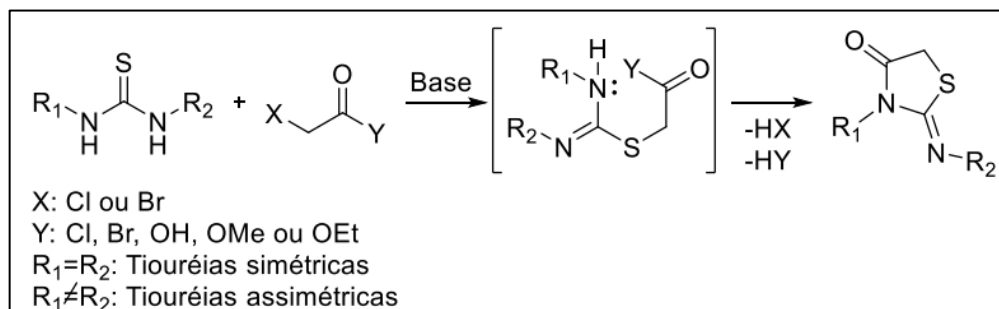
Tomados em conjunto, esses dados implicam a MAO em vários níveis de sinalização apoptótica. Isso inclui a ação direta das EROS produzidas pela MAO na integridade mitocondrial, a modulação da sinalização da MAP quinase e a regulação

da expressão gênica sensível a redox. Por sua vez, a expressão e a atividade da MAO são controladas pela sinalização da quinase MAP sensível a redox e pela atividade do fator de transcrição. Esses circuitos reguladores sobrepostos tornam muito difícil traduzir diretamente os fenômenos *in vitro* para a situação *in vivo*.

3.3 SÍNTESE GERAL DE IMTSD

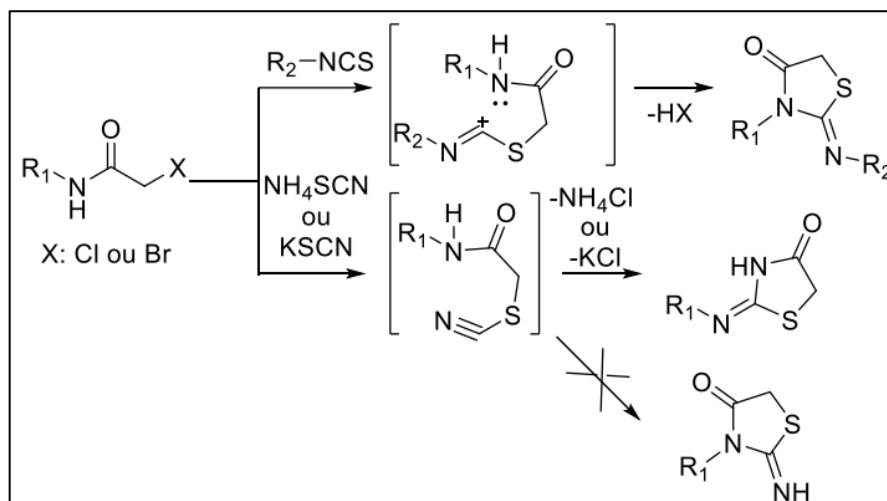
Há duas metodologias clássicas de síntese de IMTSD que são difundidas na literatura. As duas rotas sintéticas mais destacadas são as que envolvem a ciclização de tioureias com derivados de ácidos α -haloacéticos (**A**), e a outra, que envolve a ciclização de α -haloacetamidas com isotiocianatos ou tiocianatos (**B**) (TRIPATHI *et al.*, 2014).

Na rota **A** reage-se tioureias simétricas ou não simétricas com derivados de ácidos α -haloalcanos na presença ou não de uma base. A reação ocorre via intermediário que posteriormente cicliza em refluxo com solvente apropriado (Esquema 2) (CAI; WU; CHANG, 2016; ST. LAURENT *et al.*, 2004; YELLA; GHOSH; PATEL, 2008).



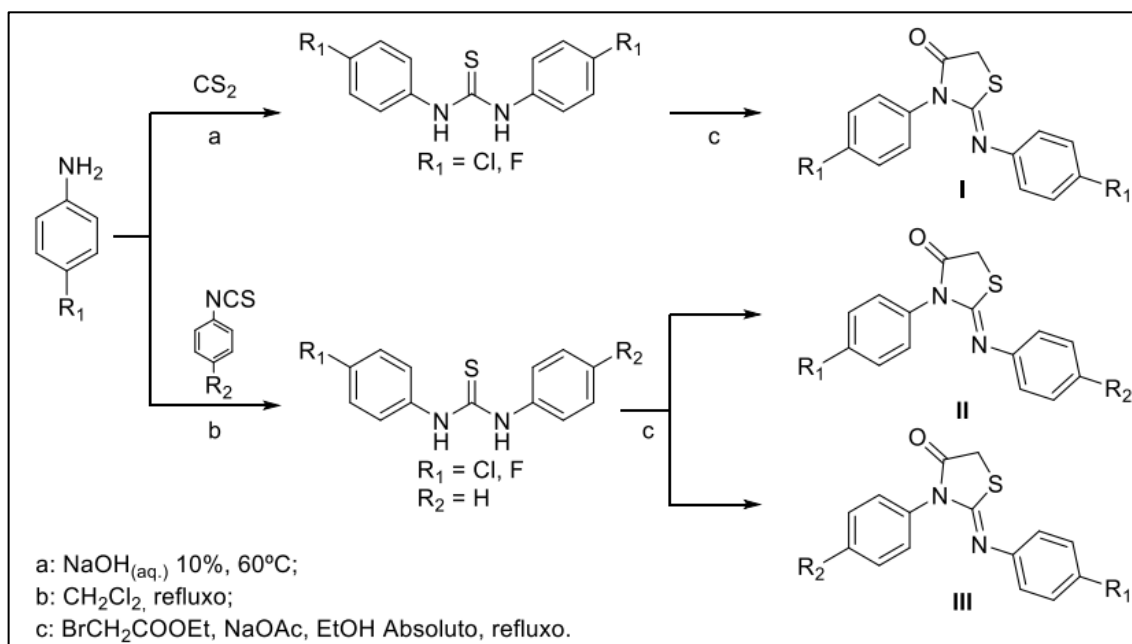
Esquema 2. Reação de formação de IMTSD por ciclização de tioureias.

Já na rota **B** reage-se α -haloacetamidas com isotiocianatos (MOGHADDAM; HOJABRI, 2007) e tiocianato de amônio ou de potássio para formar IMTSD via rearranjo, conforme esquematizado abaixo. Nesse caso, utilizando os tiocianatos ocorre um rearranjo para formar um NH de amida, na posição 3, e não um NH de imina na posição 2 (Esquema 3) (VICINI *et al.*, 2008).



Esquema 3. Reação de formação de IMTSD por ciclização de α -haloacetamidas.

Ainda na rota **A**, pode-se utilizar tanto tioureias simétricas ($R_1=R_2$), quanto não simétricas ($R_1 \neq R_2$), com isso pode-se determinar se o produto possuirá substituintes iguais ou diferentes. A obtenção de tioureias ocorre usualmente de duas maneiras: por uma reação entre uma amina e dissulfeto de carbono (tioureia exclusivamente simétrica), e a segunda, por reação entre uma amina e um isotiocianato (tioureia simétrica, se os substituintes tanto da amina, quanto do isotiocianato forem iguais, senão são não simétricas), conforme a síntese realizada por Cai e colaboradores (CAI; WU; CHANG, 2016) tomada como exemplo (Esquema 4).



Esquema 4. Reação de formação de tioureias simétricas e assimétricas juntamente com as respectivas IMTSD.

Ainda em relação a ciclização de tioureias, autores demonstraram a regioseletividade da formação dos produtos II ou III do Esquema 3, pois há a possibilidade de ataque dos dois nitrogênios do intermediário do Esquema 1 com a carbonila. Laurent e colaboradores (ST. LAURENT *et al.*, 2004), por exemplo, sugerem que o substituinte que possuir um heteroátomo protonado (via meio ácido) promove o ataque na carbonila do nitrogênio próximo ao heteroátomo, como representado na Figura 19.

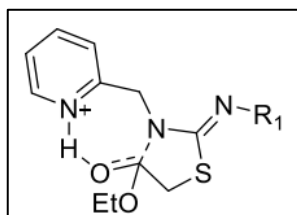
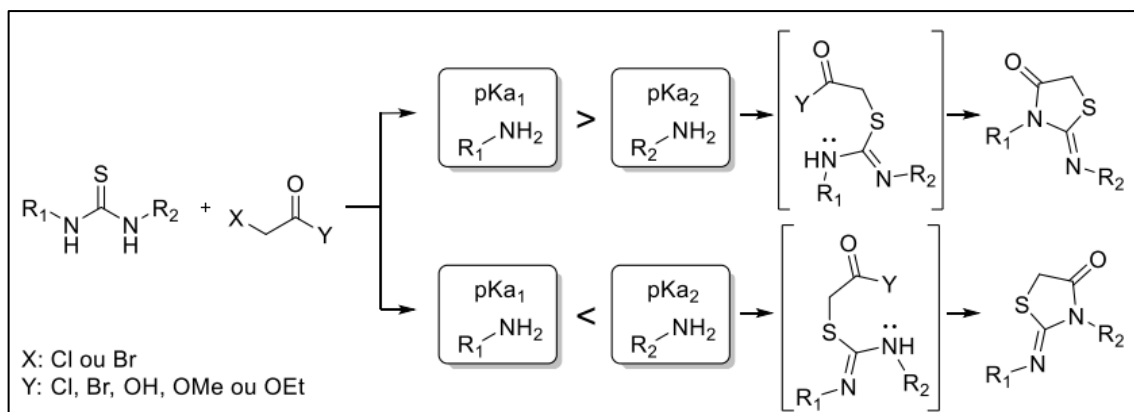


Figura 19. Ciclização seletiva de IMTSD via ligação de hidrogênio intramolecular.

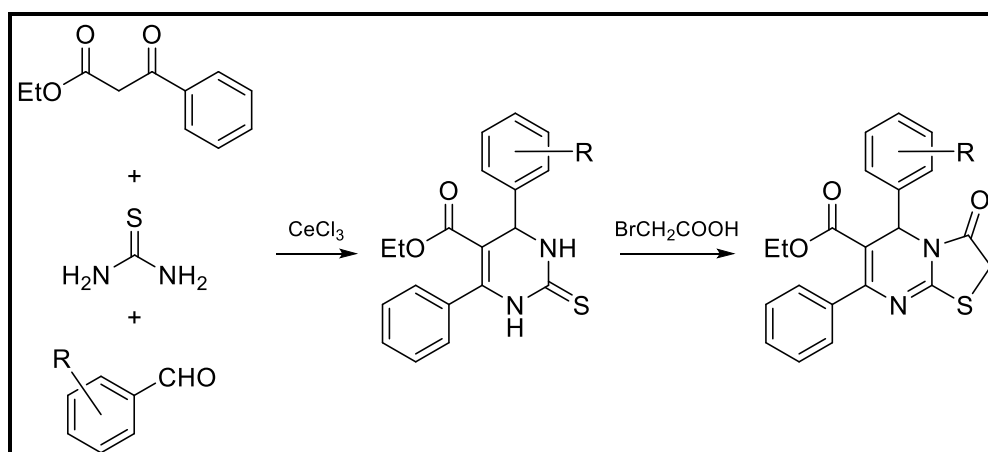
Por outro lado, Yella e colaboradores (YELLA; GHOSH; PATEL, 2008), sugerem que os pKa's das aminas precursoras da tioureia determinarão a regioseletividade, ou seja, a amina de menor pKa formará o substituinte imino, enquanto que a amina com maior pKa formará a porção amida do anel IMTSD, conforme o Esquema 5.



Esquema 5. Regioseletividade na síntese de IMTSD proveniente de tioureias assimétricas, segundo Yella e colaboradores.

Outra síntese interessante de IMTSD foi realizada por Zhao e colaboradores (ZHAO *et al.*, 2014), que por intermédio de uma reação multicomponente (reação de Biginelli) envolvendo benzaldeídos, o benzoilacetato de etila e tioureia foram produzidas diferentes dihidropirimidinas (DHPMs). Como as DHPMs apresentam uma tioureia semelhante as citadas na rota **A**, reagindo-as com derivados de ácidos

α -haloacéticos obtêm-se IMTZA cíclicas abrangendo ainda mais as substituições no anel (Esquema 6).



Esquema 6. Reação de formação de IMTZA via precursor de reação de Biginelli.

Portanto, a rota A e B são as principais formas de síntese de IMTZA e nas próximas seções serão abordados experimentos no intuito de sintetizar IMTZA's utilizando tioureias simétricas e assimétricas, juntamente com os estudos antiglioma e inibidor de MAO's dos produtos sintetizados.

4 RESULTADOS

Em virtude do exposto na literatura, há a necessidade de buscar novas alternativas terapêuticas para diversas enfermidades, como o caso de gliomas um dos cânceres com baixas perspectivas de sobrevivência e doenças neuropsiquiátricas ou neurodegenerativas que são objetos de estudos na inibição das MAOs. Além disso, o grupo de pesquisa do LaQuiABio vem estudando a síntese e atividades biológicas de diversas séries de 4-tiazolidinonas (DA SILVA *et al.*, 2016; DAS NEVES *et al.*, 2019; VASCONCELOS *et al.*, 2020; ZEHETMEYR *et al.*, 2018), contudo especificamente de IMTZDs esse trabalho é pioneiro do grupo. O planejamento das IMTZDs desse trabalho foi baseado em literatura de síntese de IMTZDs análogas e testadas em parceria com os grupos de pesquisa parceiros.

Os resultados dessa Tese estão apresentados na forma de dois manuscritos científicos submetidos a duas revistas distintas: **Artigo 1** – Apresenta a síntese e a caracterização da série dos 16 novos compostos **5a-p**, bem como os resultados da atividade antiglioma, estudo de morte celular e atividade antioxidante em células de rato; **Artigo 2** – Apresenta a síntese e caracterização do composto **7**, já publicado anteriormente, além disso, foi avaliado a atividade inibitória das MAOs, o perfil antioxidante e a toxicidade em modelo com rato.

Inicialmente, o objetivo geral do trabalho era realizar um estudo de relação estrutura e atividade envolvendo os produtos IMTZDs das duas rotas sintéticas originada pela 2-aminopiridina **1**, gerando os compostos **5a-p** e o composto **7** (Esquema 1). Diante da obtenção dos produtos foram submetidos aos estudos supracitados de acordo com as hipóteses de similaridade dos compostos **5a-p** com o trabalho anticâncer de Appalanaidu e colaboradores (APPALANAIDU *et al.*, 2016), já o composto **7**, pela considerável solubilidade em solventes polares e conformação estrutural semelhante a compostos de coordenação bidentados foi submetido a estudos antioxidantes e por conseguinte a inibição de MAOs.

Portanto, a síntese de novas IMTZDs por duas metodologias produzindo produtos com substituintes iguais e diferentes, que geraram dois artigos com atividades distintas, porém originários de um mesmo precursor, o composto **1** e o anel IMTZD.

As seções experimentais, resultados e discussões, além do referencial encontram-se no corpo dos manuscritos e representam a íntegra desse estudo. A apresentação dos manuscritos está formatada de acordo com os guias editoriais das revistas, não sofrendo alterações aqui nessa Tese.

4.1 MANUSCRITO 1

De: Medicinal Chemistry

Enviado: domingo, 16 de maio de 2021 06:34

Para: coanjunior@hotmail.com

Cc: mc@benthamsscience.net

Assunto: Manuscript Provisional Acceptance letter | BMS-MC-2020-196

Reference#: BMS-MC-2020-196

Submission Title: Synthesis and Biological Evaluation of Novel 2-imino-4-thiazolidinones as Potential Antitumor Agents for Glioblastoma

Dear Dr. José Coan Campos,

I am pleased to inform you that your article Reference No. BMS-MC-2020-196, entitled **"Synthesis and Biological Evaluation of Novel 2-imino-4-thiazolidinones as Potential Antitumor Agents for Glioblastoma"** has been provisionally approved for publication in **"Medicinal Chemistry"**.

You will now need to pay the processing fee, either via the online payment link in the invoice sent to you or, via a bank transfer (evidence of which would need to be sent to us), before your article is published.

All Research Articles are published as Open Access without any additional fee.

Please note that the final acceptance of your article is subject to a detailed scrutiny and approval of the following:

- a. The standard of English language in the articles should be suitable.
 - b. "IMRAD" Structure: Headings such as Introduction/background, Methods and Materials, Experimental, Result and Discussion are mandatory for research articles.
 - c. Abstract should be in the format of a STRUCTURED ABSTRACT, having explicit headings such as background, introduction, method, result and conclusion

 - d. References should be in the correct format. This will vary from journal to journal.
 - e. All references mentioned in the reference list should be cited in the text, and vice versa.
 - f. The quality of the figures in the articles should be as per Publisher\'s standard mentioned on the website.
 - g. Permission should have been obtained for use of copyright material from the appropriate sources (including the Internet) and submitted to us.
 - h. There should be no difference in the list of Authors in the revised manuscript, from what was submitted at the time of submission of the article. Please remember that the author list cannot be modified at a later stage.
 - i. If your study involves human or animal subjects, you should have obtained ethical approval. Please state whether Ethical Approval was given, by whom and the relevant Judgement\'s reference number.
- Ethical Committee Name:
 - Guidelines for Human or Animal:

Please ensure that all the above points have been properly taken care of to avoid delays in final acceptance and publication. For any further clarifications, please send your query to info@benthamscience.net

We wish to thank you for submission of the manuscript to "**Medicinal Chemistry**" and look forward to continued collaboration in the future.

With warm regards,

Editorial Office
Medicinal Chemistry
Bentham Science Publisher

Note: For complaints contact: complaint@benthamscience.net

To unsubscribe from MPS and stop receiving emails further. Please send an email to unsubscribe@bentham.manuscriptpoint.com.

Powered by [Bentham Manuscript Processing System](#)

RESEARCH ARTICLE

Synthesis and Biological Evaluation of Novel 2-imino-4-thiazolidinones as Potential Antitumor Agents for Glioblastoma

José Coan Campos^{*a}, Patrick Teixeira Campos^b, Nathalia Stark Pedra^c, Natália Pontes Bona^c, Mayara Sandrielly Soares^c, Priscila Oliveira Souza^d, Elizandra Braganhol^d, Wilson Cunico^a, Geonir Machado Siqueira^a,

^a Laboratório de Química Aplicada a Bioativos (LaQuiABio), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Capão do Leão, RS, Brazil; ^b Laboratório de Química Orgânica Sintética, Estrutural e Computacional (LaQuiOSEC), Instituto Federal Sul-rio-grandense, Campus Pelotas, Pelotas, RS, Brazil; ^c Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer (NEUROCAN), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Capão do Leão, RS, Brazil; ^d Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Sarmento Leite 245, Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract: Aims: The purpose of our study was to explore the molecular hybridization between 2-imino-4-thiazolidinone and pyridinic scaffolds and its potential antitumor activity.

Background: Glioblastoma is the most aggressive glioma tumor clinically diagnosed malignant and highly recurrent primary brain tumor type. The standard of treatment for a glioblastoma is surgery, followed by radiation and chemotherapy using temozolomide. However, the chemoresistance become the main barrier to treatment success. 2-imino-4-thiazolidinones are an important class of heterocyclic compounds that feature anticancer activity, however the antiglioblastoma activity yet underexplored.

Objective: To synthesize and characterize a series of novel 2-imino-4-thiazolidinones and evaluate their antiglioblastoma activity.

Method: The 2-imino-4-thiazolidinone (**5a-p**) were synthesized according to the literature with modifications. Compounds were identified and characterized using spectroscopic analysis and X-ray diffraction. The antitumor activity was analyzed by 3-(4,5-dimethyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay both in primary astrocyte and glioma (C6). Apoptosis and cell cycle phase were determined by flow cytometry analysis. The expression of caspase-3/7 was measured by luminescence assay. Oxidative stress parameters as: determination of reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD) activity, catalase (CAT) activity and total sulfhydryl content quantification were analyzed by colorimetric assays according to literature.

Results: Among sixteen synthesized compounds, three displayed potent antitumor activity against tested glioblastoma cell line showed IC₅₀ values well below the standard drug temozolomide. Therefore, compounds **5a**, **5l** and **5p** were evaluated cell cycle and death analysis, due potent toxicity (2.17±1.17, 6.24±0.59, 2.93±1.12 μM, respectively) in C6 cell line. The mechanism of action studies demonstrated that **5a** and **5l** induced apoptosis significantly once increase the percentage of cells in Sub-G1 phase with absence of necrosis. Consistent with these results, caspase-3/7 assay revealed that **5l** present pro-apoptotic activity due to the significant stimulation of caspases-3/7. Moreover, **5a**, **5l** and **5p** increased antioxidant defense and decrease reactive oxygen species (ROS) production.

Conclusion: The compounds were synthesized with good yield and three of these presented (**5a**, **5l** and **5p**) good cytotoxicity against C6 cell line. Both affected cell cycle distribution via arresting more C6 cell line at Sub-G1 phase promoting apoptosis. Furthermore, **5a**, **5l** and **5p** modulated redox status. These findings suggest that these compounds can be considered as promising lead molecules for further development of potential antitumor agents.

Keywords: 2-imino-4-thiazolidinone, glioblastoma, flow cytometry, apoptosis, caspase-3/7 assay, antioxidant.

ARTICLE HISTORY

Received:
Revised:
Accepted:

DOI:

1. INTRODUCTION

Glioblastoma (GBM) is the most aggressive glioma tumor clinically diagnosed malignant and highly recurrent primary brain tumor type, being a fast growing tumor that arises from multiple cell types with neural stem-cell-like properties. The majority symptoms of this disorder include intracranial pressure, headache and focal or progressive neurologic deficits [1]. The annual incidence of primary brain tumors in the United States between 2011-2015 was 23.0 per 100,000 individuals, with an incidence of 47.7% of glioblastomas in malignant tumors [2]

The current standard patient care relies on maximal surgical resection followed by radiotherapy and chemotherapy with temozolomide (TMZ) [3, 4]. However, the efficacy of these therapeutic strategies is limited, with chemoresistance being the main barrier to treatment success. During treatment, tumor cells gradually lose their sensitivity to chemotherapeutics, developing acquired chemoresistance, which eventually leads to tumor progression and recurrence [5].

Several sulfur-based compounds have been reported as promising antitumor agents [6]. Among them, thiazolidinones have shown considerable reduction cell proliferation against C6 rat glioma and others tumor cells [7–12]. Moreover, recent studies have shown that these compounds may possibly control cell proliferation through induction of apoptosis [13] and inhibition of cyclooxygenase and lipooxygenase, thus controlling cancer-related inflammation [14].

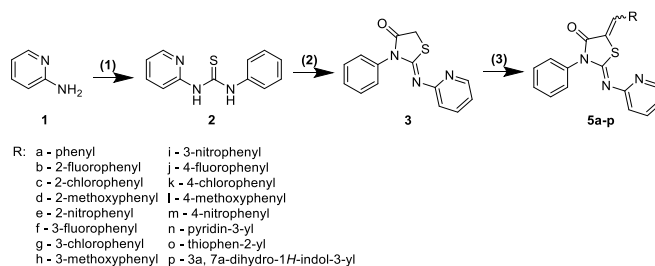
Similarly, pyridine-based derivatives have also shown to be of importance for cancer research in recent years [15, 16]. For instance, pyridine containing compounds showed a potent antitumor activity against three GBM cell lines (U87, U87-EGFRvIII and U251). In addition, the compounds presented inhibition of tubulin polymerisation and mitotic spindle formation, which leads to apoptosis of GBM cells [17].

In this study, we aimed to develop a novel antitumor agent to activate apoptosis-induced cell death in GBM cell line. Advancing with the studies on thiazolidinones from our research group [8, 12], we synthesized a series of small-molecules around a 2-imino-4-thiazolidinone and pyridine moiety using the molecular hybridization strategy. We investigated the cytotoxicity of synthesized compounds against glioblastoma (C6) cell line and research the mechanism of cell death induced by promising compounds.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. Chemistry

The synthesis of 2-imino-4-thiazolidinones derivatives was performed according to literature [18–20] with modifications (Scheme 1). See supplementary material for spectral data.



Scheme 1. Phenyl isothiocyanate, dichloromethane, rt, 4h (1); Chloroacetic acid, ethanol, reflux, 8h (2); Aromatic or heterocyclic aldehydes, acetic acid, sodium acetate, reflux, 24h (3).

2.1.1. Synthesis of 1-phenyl-3-(pyridine-2-yl)thiourea 2

Phenylisothiocyanate (51 mmol) was added dropwise to the solution of 2-amino pyridine (50 mmol) in dry dichloromethane (20 mL) and the mixture was refluxed for 4 h. After drying under vacuum, a white solid precipitate was filtered and recrystallized from ethanol to give the pure compound **2** (10.78 g, yield 94%) as a flaking crystal white solid.

2.1.2. Synthesis of (2Z)-2-(phenylimino)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one 3

To a stirred suspension of thiourea **2** (5 mmol) in absolute ethanol (20 mL) was added chloroacetic acid (10 mmol). The mixture was refluxed for 8 h and after being cooled to room temperature, the precipitate was collected by filtration, and washed with cold ethanol to give the crude product, which was recrystallized from ethanol to give compound **3** (0.7810 g, yield 58%) as a crystal white solid.

2.1.3. General procedure for the synthesis of compounds (5a-p)

A mixture of compound **3** (0.5 mmol), aromatic or heterocyclic aldehydes (1 mmol) and sodium acetate (5 mmol) was dissolved in glacial acetic acid (10 mL). The mixture was stirred in reflux for 24 h, solvent was removed under vacuum and the residue was washed with hot water and ethanol to give compounds **5a-p** as a powder, without any further purification.

2.2. Antitumor Activity

2.2.1. Cell Cultures

Rat glioma C6 cell line was obtained from American Type Cell Collection (USA). Cells were grown in culture flasks and maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, UK) at pH 7.4 containing HEPES 8.4 mM, NaHCO₃ 23.8 mM, fungizone 0.1%, penicillin/streptomycin 0.5 U/mL⁻¹ and supplemented with 10% of Fetal Bovine Serum (FBS).

2.2.2. Primary Astrocyte Cultures

Astrocyte cultures were prepared according to the protocol described by Da Frola et al. [21] Briefly, cortex of new born Wistar rats (1–3 days old) were removed and dissociated mechanically in Ca^{+2} and Mg^{+2} -free balanced salt solution (CMF) (pH 7.6) containing NaCl 137 mM, KCl 5.36 mM, Na_2HPO_4 0.27 mM, KH_2PO_4 1.10 mM and glucose 6.10 mM. Dissociated tissue was subjected to centrifugation at 1000 g for 10 min. Then, the pellet was suspended in DMEM (pH 7.6) supplemented with 10% of FBS. So, cells (density $\approx 3 \times 10^4$) were seeded in poly-L-lysine-coated 96-well plates. Cultures were allowed to grow to confluence by 15–20 days, and the media was replaced every 5 days. All procedures used in the present study followed the “Principles of Laboratory Animal Care” of the National Institutes of Health (NIH) and were approved by the Ethical Committee of UFPEL (CEEA 9219).

2.2.3. In vitro Cell Culture Treatment

Firstly, were prepared stock solution 1 mM of **5a-p** in dimethyl sulfoxide (DMSO) and then diluted in DMEM with 10% FBS up to obtain desire concentration in the wells. Glioma cell line C6 was seeded at 5×10^3 cells (96-well plates) for cytotoxicity experiments and allowed to grow for 24 h. Astrocyte cultures were prepared as described above. For initial screening, cell cultures were treated with **5a-p** at 50 μM for 24 and 48h. The treatments most significant were performed to calculate half-maximal inhibitory concentration IC_{50} at 1, 10, 25, 50 and 75 μM . Cells exposed to DMSO (final concentration of 0.05%) were considered control. All experiments were realized in triplicate.

2.2.4. Cell Viability Assay

Dehydrogenases-dependent 3-(4,5-dimethyl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction was used to estimate the viability of cell cultures according to the protocol described by Mossmann [22]. This method is based on the ability of viable cells to reduce MTT and form a blue formazan product. MTT solution was added to the incubation medium in the wells at a final concentration of 0.5 mg mL^{-1} . The cells were maintained for 90 min at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. The medium was then removed, and the precipitate material was eluted with DMSO. The optical density of each well was measured at 492 nm using a SpectraMAX M3 microplate reader (USA). Results were expressed as a percentage of control or as IC_{50} in μM .

2.2.5. Cell Cycle Analysis

The C6 cells were plated in 12-well plates ($5 \times 10^4/\text{well}$) to 70% confluence, and were treated with **5a**, **5l** and **5p** at IC_{50} value concentration for 48h. For cell cycle analysis, the medium and cells were harvested and centrifuged at 1200 rpm for 6 min. Subsequently, the supernatant was discarded, cells were washed with PBS 10 mM, centrifuged, and suspended in 200 μL lysis buffer [Tris-HCl 0.5 mM (pH 7.6); trisodium citrate 3.5 mM; N onidet-P40 0.1% (v/v); RNase 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; PI 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$]. After 15 min, data were collected (10,000 events/sample) using a flow cytometer BD

FACS Calibur Flow Cytometer (USA) and analysis were performed in the FLOWJO[®] software.

2.2.6. Mitotic Index

After 48h of treatment with compounds, glioma cells were washed in PBS, impermeabilized with ethanol (70%) for 10 min at $2-8^\circ\text{C}$ and incubated with PI (6.4 μM) for 20 min at room temperature. The condensed DNA was scored as a mitotic cell. Photomicrographs at 20x magnification were taken and results were expressed as a ratio of mitotic cells/total number cells.

2.2.7. Cell Death Analysis

Apoptotic or necrotic cells were quantified using an annexin V-FITC-propidium iodide (PI) double staining kit. The C6 cells were treated with **5a**, **5l** and **5p** at IC_{50} value concentration for 48h. At the end of the treatment, the cells were trypsinized and the medium and the cells were centrifuged at $400 \times g$ for 6 min. A total of 5×10^4 cells were centrifuged and suspended in a binding buffer containing FITC-conjugated annexin V and PI. The samples were incubated for 15 min in the dark prior to analysis by flow cytometry. Quantification of apoptotic or necrotic cells was assessed by dual-color flow cytometry (FACS Calibur) and the data were analysed with FLOWJO[®] software. Cells were classified as follows: live Q4 (Annexin-/ PI-), early apoptotic Q3 (Annexin+/ PI-), late apoptotic Q2 (Annexin+/ PI+) or necrotic Q1 (Annexin-/ PI+).

2.2.8. Propidium Iodide Assay

Rat glioma cells were treated with compounds for 48h and evaluated for necrosis by propidium iodide assay. Cells were incubated with PI (5 μM) for 1h at 37°C . PI fluorescence was excited at 515–560 nm using an inverted microscope Olympus BX-50 (Japan) fitted with a standard rhodamine filter. Images were captured using a digital camera connected to the microscope.

2.2.9. Caspase-3/7 Assay

The C6 cells were seeded in 96-well plates ($5 \times 10^3/\text{well}$) treated with **5a**, **5l** and **5p** at IC_{50} value concentration for 48h. After treatment, activation of caspase-3/7 was quantified by the Caspase-Glo 3/7 assay kit Promega Corporation (USA) following the manufacturer's instructions. Luminescence data were expressed as fold relative to control/untreated cells.

2.3. Oxidative Stress Parameters

2.3.1. Determination of Reactive Oxygen Species (ROS)

Intracellular generation of ROS was determined by DCFH assay as described by Dos Santos et al. [23]. This method is based on the oxidation of 2-(2-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) to dichlorofluorescein (DCFH) by intracellular esterases which is trapped within the cell. Thereby, DCF-DA reacts with ROS emitting fluorescence. In brief, following 48h of treatment, cultures were incubated with $1 \mu\text{M}$ DCFH-DA for 30min and fluorescence was measured at 488/525 nm in a

microplate reader SpectraMax M3. ROS production was reported as percentage of control.

2.3.2. Superoxide Dismutase (SOD) Activity

SOD activity was assayed as described by Misra and Fridovich [24]. This assay is based on the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation to adrenochrome. This reaction is intermediate by superoxide, which is scavenged by SOD. The absorbance was measured at 480 nm in a microplate reader SpectraMax M3 and the results were expressed as percentage of control.

2.3.3. Catalase (CAT) Activity

CAT activity was measured as described by Aebi [25]. This assay is based on the decomposition of 30mM hydrogen peroxide (H_2O_2) in 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) continuously monitored at 240 nm for 180 s at 37 °C. CAT activity was reported as percentage of control.

2.3.4. Total Sulfhydryl Content Quantification

Total sulfhydryl content was determined according to Aksenov and Markesbery [26]. This process is based on the reduction of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, whose reaction form an oxidized disulfide generating a yellow derivative (TNB). The reaction was started by the addition of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). The absorbance was measured at 412 nm in a microplate reader SpectraMax M3 and the results were expressed as percentage of control.

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism[®] 7 software. Data were expressed as mean $\pm$ standard error (S.E.M.) and were subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey *post-hoc* test for multiple comparisons. Differences between mean values were considered significant when $P < 0.05$. IC_{50} were expressed as mean $\pm$ standard error (S.E.M.) and obtained by nonlinear regression using dose-response inhibition from GraphPad Prism[®] 7.

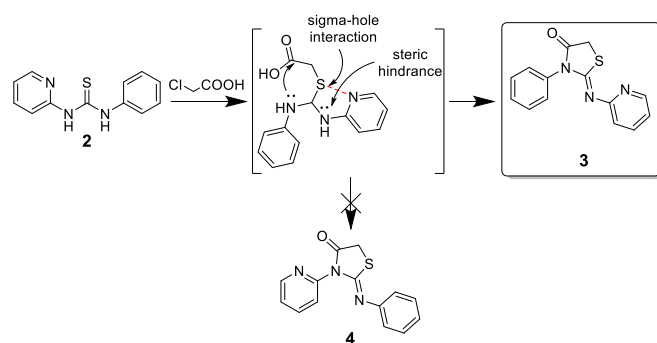
3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Chemistry

The synthetic route to obtain novel substituted-2-imino-4-thiazolidinone derivatives **5a-p** (Scheme 1) was achieved in three steps: (1) firstly it was synthesized the 1-phenyl-3-(pyridine-2-yl)thiourea **2**, with excellent yield (94%), reacting 2-aminopyridine with phenyl isothiocyanate according to literature [18]; (2) after, the mixture of thiourea **2** and chloroacetic acid were submitted to reflux for 8h gave the (Z)-2-(phenylimino)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one **3** with moderated yield (58%) [19], and lastly (3), the compounds **5a-p** were prepared by Knoevenagel reaction involving **3** with different aromatic or heterocyclic aldehydes in the presence of acetic acid and sodium acetate [19].

According to literature [20], the route (2) may to provide two possible regioisomeric compounds **3** and **4**, as illustrated in Scheme 2. Nevertheless, among α -halo esters or acids that

could be used in cyclization of thiourea, chloroacetic acid surprisingly furnished the product **3** that may have been occurred due to a sigma-hole interaction between S and N pyridinic (Scheme 2) causing steric hindrance in the cyclization to produce **4**.



Scheme 2. Selective cyclization by steric hindrance.

The 1H and ^{13}C NMR data did not help to identify the regioisomer once the signals can refer to both compounds **3** or **4**. Besides, the 2D-NMR did not show any cross peaks that identified the correct position of pyridyl and phenyl groups. On the other hand, **3** was confirmed by X-ray single crystal structure (Fig. 1A) and 1H - ^{15}N HMBC NMR, that present a long-range hydrogen to nitrogen connectivity signal (Cross Peak 1) between phenyl group and amide from thiazolidinone (Fig. 1B).

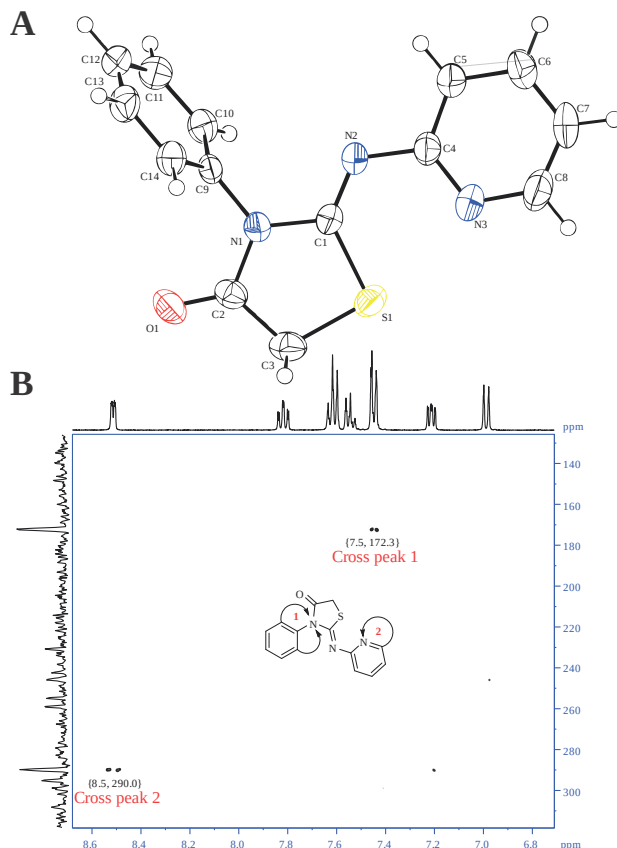


Fig. (1). Thermal ellipsoid plot (50% probability) (A) and 1H - ^{15}N HMBC NMR cross peaks (B) of **3**.

All spectral data (^1H and ^{13}C NMR) from **5a-p** showed characteristic signals. In the ^1H NMR spectra, stands out a singlet in the range of 7.76 – 8.24 ppm from vinyl hydrogen and a doublet in the range 8.42 – 8.59 ppm from α -hydrogen to *N*-pyridyl group. In the ^{13}C NMR spectra, stands out the carbonyl signals that appear in the range 165.0 – 166.6 ppm from thiazolidinone carbonyl. Still, the signals for aromatic carbons and hydrogens appeared in the characteristic aromatic regions in both NMR spectra.

3.2. Antitumor Activity

The synthesized 2-imino-thiazolidinones **5a-p** were evaluated for their antitumor activity against glioma cell (C6) and cytotoxicity in primary astrocyte by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. All compounds were screened for 24 and 48h at a final concentration of 50 μM and those that significantly decreased cell viability were subjected to the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) tests in micromolar concentration (μM). Among the analysis times, 48h of treatment showed significant results and IC_{50} of most promising compound are presented in Fig. (2A).

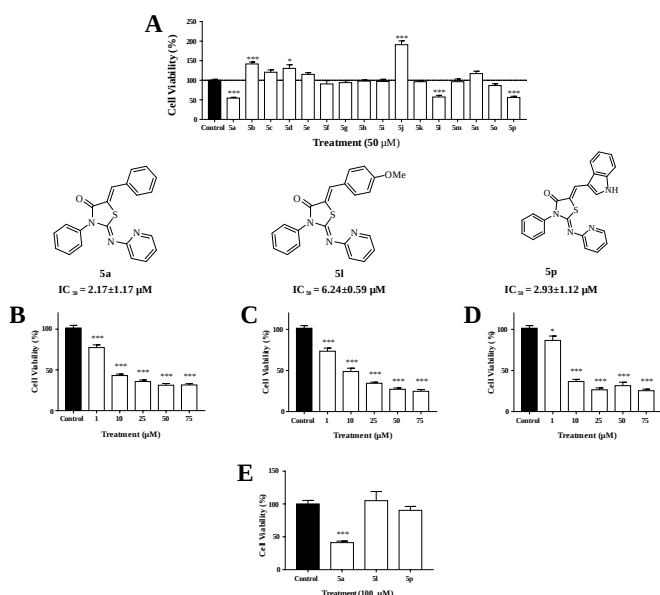


Fig. (2). Screening of 5a-p in C6 glioma cell at 50 μM for 48h (A). Cytotoxicity of compounds **5a** (B), **5l** (C) and **5p** (D) assessed in C6 glioma cell. Effect of **5a**, **5l** and **5p** on primary astrocyte culture rat (E). Values are mean $\pm$ SEM of three independent experiments performed in triplicate. * P < 0.05 and *** P < 0.001 (Tukey's test).

Based on screening results, **5a**, **5l** and **5p** displayed the most pronounced activity against C6 cell line. For the results, the presence of benzylidene (**5a** – IC_{50} = 2.17 $\pm$ 1.17 μM) and 4-methoxybenzylidene (**5l** – IC_{50} = 6.24 $\pm$ 0.59 μM) were decisive for toxicity, which allows highlighting these groups in future changes to the structures (Fig. 2B,C). According literature [27–29], indole ring system is a

versatile scaffold with pharmaceutical properties including antitumor activity, therefore the use of indole-3-carboxaldehyde in **5p** synthesis was promising through the excellent toxicity result with IC_{50} = 2.93 $\pm$ 1.12 μM (Fig. 2D). Considering the cell viability assay and IC_{50} values, compounds **5a**, **5l** and **5p** displayed excellent activity compare to TMZ glioblastoma drug standard (IC_{50} $\sim$ 560 μM) analysed by Huang [30] and other small molecules like 2,4-thiazolidinedione (IC_{50} of 28.51 μM and 54.26 μM) synthesized by Vasconcelos [8].

Then, the cell viability of rat primary astrocyte cultures against **5a**, **5l** and **5p** was evaluated at a concentration 100 μM for 48h. No significant differences were observed in the compounds **5l** and **5p** compared to control showing tumor selectivity, however **5a** presented a decrease of more than 50% in cell viability demonstrating possible cytotoxic behaviour and consequently undesirable tumor selectivity (Fig. 2E). Therefore, the promising compounds (**5a**, **5l** and **5p**) were submitted to cell cycle analysis to understand their growth inhibitory effect.

3.3. Cell Cycle Analysis

The majority antitumor compounds exert their growth inhibitory effect either by arresting the cell cycle or by inducing apoptosis or a combined effect of both cycle arrest and apoptosis. Moreover, regulation of the cycle and apoptosis is considered to be an effective approach in the development of cancer therapeutics [31–33]. The compounds **5a**, **5l** and **5p** significantly reduce the growth of C6 cells and change the cell morphology (Fig. 3A). Cell cycle assay shows a significant increase of Sub-G1 phase and subsequent decrease in G0/G1 and G2/M by **5a**, **5l** and **5p** in comparison to control C6 cells (Fig. 3B). Based on this, our results indicate that both compounds induced cell cycle arrest at the Sub-G1 phase interfering with the normal cell cycle distribution and may induce necrosis or apoptosis pathways. The mitotic index was also evaluated; however, no changes was presented compared to control (Fig. 3C). In Fig. (3D) illustrate cell population undergoing to mitosis, indicating that compounds effect is mediated by cell death induction.

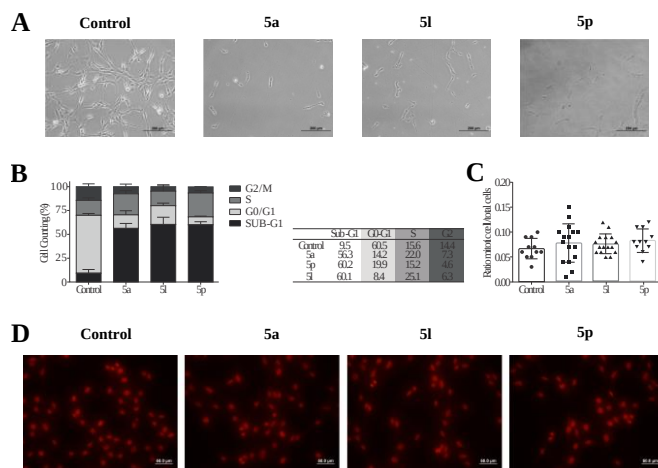


Fig. (3). Antiproliferative effect (A), Cell cycle analysis (B), mitotic index (C) and photomicrograph of cells in mitosis at 20x magnification (bar 50 μm) (D). Analyses performed in

C6 cell after treatment with compounds **5a**, **5l** and **5p** in comparison to control.

3.4. Cell Death Analysis

The cell death can be predetermined, programmed, and cleanly executed, as in the case of apoptosis, or it can be traumatic, inflammatory, and sudden as many types of necrosis exemplify [34, 35]. Apoptosis is an orderly cellular process that takes place in physiological and pathological conditions and plays an important role in tissue homeostasis. Disruption or inappropriate regulation of different apoptotic pathways results in the overgrowth of malignant cells [31–33].

Thus, it is necessary to consider inducing cellular apoptosis as an effective approach in cancer treatment. Initially, cell death by necrosis was ruled out, as shown in Fig. (4A) by non-marking of cells with PI after 48h of compounds treatment. Moreover, the annexin V-FITC and PI assay showed that compounds **5a**, **5l** and **5p** increased the percentage of the apoptotic cells (Fig. 4B,C), therefore confirms that the treatment with tested compounds inhibited cell proliferation by inducing cytotoxicity and apoptosis.

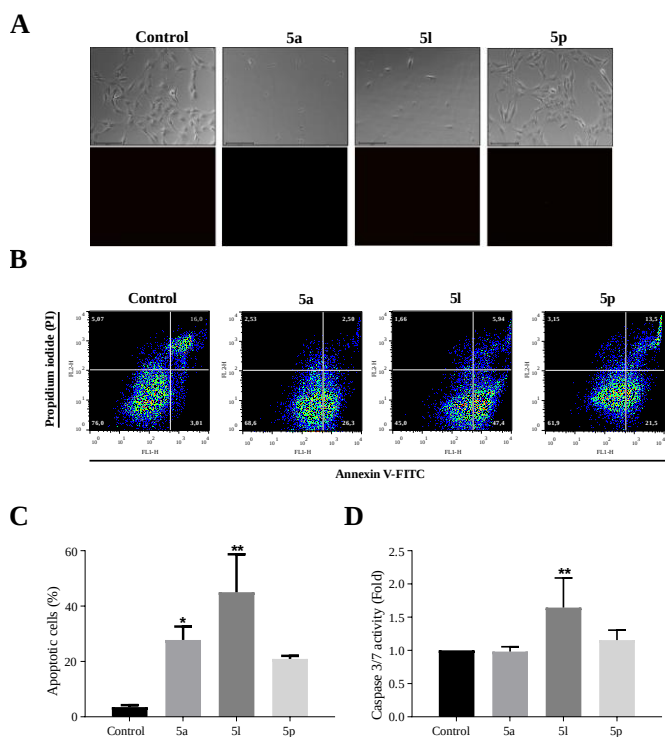


Fig. (4). Representative phase contrast and PI uptake microphotographs of C6 cells treated with compounds **5a**, **5l** and **5p** at 20x magnification (bar 125 μ m) (A). Flow cytometry analysis of cell death by annexin V-FITC and PI after treatment with compounds **5a**, **5l** and **5p** for 48h (B) and quantification of apoptotic cells (C). Caspase 3/7 activity after 48h of treatment with compounds (D). Values are mean $\pm$ SD of three independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ (Tukey's test).

In order to assess inducing apoptosis in a complementary way was performed the caspase-3/7 detection assay. Caspase-3/7 are a downstream cysteine protease in the final stage of apoptotic pathway. Overexpression and loss of expression of caspase-3/7 have been reported in diverse diseases and it can be used as diagnostic and therapeutic marker for GBM [36]. The caspase-3/7 activity in C6 cells treated by **5a**, **5l** and **5p** showed a significantly increased in **5l** compound, corroborating the activation of apoptotic machinery (Fig. 4D).

Although three compounds (**5a**, **5l** and **5p**) showed cytotoxicity in the C6 cells after 48h of treatment, the result of this analysis has demonstrated the apoptosis-inducing activity of **5l** that is a desirable cell death induction in cancer treatments.

3.5. Oxidative Stress

Different types of tumor cells have been shown to produce elevated levels of reactive oxygen species (ROS) compared to their normal cells [37]. Increased levels of ROS are pro-tumorigenic and the search of therapies that scavenges excessive ROS may be potentially effective against cancer [38]. Due to the high levels of ROS, cancer cells also stimulate the first line defense antioxidant system, such superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), to eliminate ROS [39, 40]. In addition, sulfhydryl-containing are known to be the most important and essential endogenous antioxidant buffers, which interact with almost all physiological oxidants. Therefore, these molecules were recognized as interesting targets in the chemoprevention of cancer [41].

The compounds **5a**, **5l** and **5p** significantly decreased ROS levels compared to control treatment, as concentration increased from 1 to 75 μ M (Fig. 5A). In contrast, **5a**, **5l** and **5p** significantly increased sulfhydryl content, from the 1 and 25 μ M (Fig. 5D), respectively. Moreover, all tested compounds increased the antioxidant enzymes SOD and CAT, sometimes from the 1 μ M, sometimes from the 10 or 25 μ M depending compound, as shown in the Fig. (5B,C).

Our data showed that **5a**, **5l** and **5p** reduce ROS production and increase thiol content and antioxidant enzymes activities, indicating that both exerts potent antioxidant effects on C6 cell line. Even if GBM is characterized by high quantities of ROS into the cells, tests compounds demonstrate being able to act on the modulation of oxidative stress parameters, both by antioxidant activity and by non-inhibition of antioxidant enzymes.

Furthermore, current results suggest that combination of 4-thiazolidinone with pyridyl, phenyl and benzindolyl moieties to produce new hybrid compounds (**5a**, **5l** and **5p**) with antioxidant effect, due to highly conjugated double bond system that is capable of absorbing electrons and forming adducts with ROS [42].

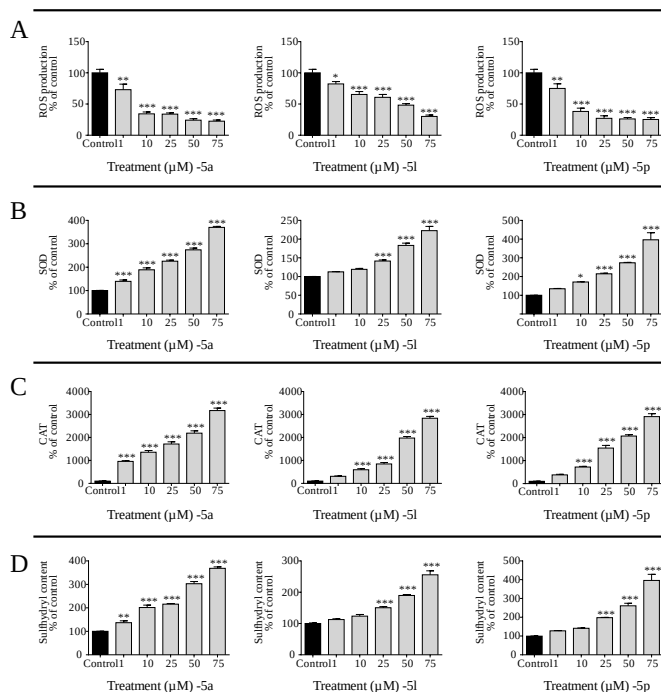


Fig. (5). Analysis of oxidative stress parameters in C6 glioma cells exposed to compounds **5a**, **5l** and **5p**. (A) ROS production analysis and (B) SOD, (C) CAT, Sulphydryl content activities (D). Values are mean $\pm$ SEM of three independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Tukey's test).

CONCLUSION

In this study, a series of regioselective 2-imino-4-thiazolidinone derivatives was synthesized and evaluated for their cytotoxic activity C6 tumor cells. From sixteen synthesized compounds, three displayed potential cytotoxic activity. The compounds **5a**, **5l** and **5p** showed promising antitumor activity compared to standard drug TMZ, inhibiting the proliferation of glioma cells at lower concentration, and were submitted to further biological assessments in C6 cell line. The results revealed that these compounds increase cell population in Sub-G1 phase at cell cycle, besides they induced apoptosis through the stimulation of caspases-3/7. Lastly, **5a**, **5l** and **5p** exhibited antioxidant activity suppressing ROS production and increasing antioxidant enzymes activities. These findings suggest that these compounds can be considered as promising lead molecules for further development of potential antitumor agents.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

All procedures used in the present study followed the "Principles of Laboratory Animal Care" of the National Institutes of Health (NIH) and were approved by the Ethical Committee of UFPel (CEEA 9219).

FUNDING

This research was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS/CNPq-PRONEX-Proc. N° 16/2551-0000477-3). This study was financed in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Finance code 001. W. C. and E. B. are recipient of the CNPq fellowship.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the NUQUIMHE X-ray team (Department of Chemistry – UFSM), especially Geórgia Zimmer, for the kindly collection and refinement of the data.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is available on the publisher's web site along with the publisher article.

REFERENCES

- [1] Davis, M. E. B. T. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin. J. Oncol. Nurs.*, **2016**, 20 (5), 1–8. <https://doi.org/10.1188/16.CJON.S1.2-8>.
- [2] Ostrom, Q. T.; Gittleman, H.; Truitt, G.; Boscia, A.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J. S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro. Oncol.*, **2018**, 20 (suppl_4), iv1–iv86. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy131>.
- [3] Cantanhede, I. G.; De Oliveira, J. R. M. PDGF Family Expression in Glioblastoma Multiforme: Data Compilation from Ivy Glioblastoma Atlas Project Database. *Sci. Rep.*, **2017**, 7 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15045-w>.
- [4] Lim, M.; Xia, Y.; Bettgowda, C.; Weller, M. Current State of Immunotherapy for Glioblastoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **2018**, 15 (7), 422–442. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0003-5>.
- [5] Lin, J.; Zuo, J.; Cui, Y.; Song, C. A.; Wu, X.; Feng, h. Uaiz. I.; Li, J.; Li, S. U.; Xu, Q.; Wei, W.; et al. Characterizing the Molecular Mechanisms of Acquired Temozolomide Resistance in the U251 Glioblastoma Cell Line by Protein Microarray. *Oncol. Rep.*, **2018**, 39 (5), 2333–2341. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6322>.
- [6] Sharma, P. C.; Bansal, K. K.; Sharma, A.; Sharma, D.; Deep, A. Thiazole-Containing Compounds as Therapeutic Targets for Cancer Therapy. *Eur. J.*

- Med. Chem.*, **2020**, *188*, 112016.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.112016>.
- [7] Avdieiev, S.; Gera, L.; Havrylyuk, D.; Hodges, R. S.; Lesyk, R.; Ribrag, V.; Vassetzky, Y.; Kavsan, V. Bradykinin Antagonists and Thiazolidinone Derivatives as New Potential Anti-Cancer Compounds. *Bioorganic Med. Chem.*, **2014**, *22* (15), 3815–3823.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.06.046>.
- [8] Vasconcelos, A. de; Boeira, A. J. Z.; Drawanz, B. B.; Pedra, N. S.; Bona, N. P.; Cunico*, F. M. S. and W. 2,4-Thiazolidinedione as Precursor to the Synthesis of Compounds with Antiglioma Activities in C6 and GL261 Cells. *Medicinal Chemistry*. 2020, pp 1–10.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/1573406416666200403075826>.
- [9] Appalanaidu, K.; Kotcherlakota, R.; Dadmal, T. L.; Bollu, V. S.; Kumbhare, R. M.; Patra, C. R. Synthesis and Biological Evaluation of Novel 2-Imino-4-Thiazolidinone Derivatives as Potent Anti-Cancer Agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2016**, *26* (21), 5361–5368.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.08.013>.
- [10] Dofe, V. S.; Sarkate, A. P.; Azad, R.; Gill, C. H. Green Synthesis and Inhibitory Effect of Novel Quinoline Based Thiazolidinones on the Growth of MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line by G2/M Cell Cycle Arrest. *Res. Chem. Intermed.*, **2018**, *44* (2). <https://doi.org/10.1007/s11164-017-3157-3>.
- [11] da Silveira, E. F.; Ferreira, L. M.; Gehrcke, M.; Cruz, L.; Pedra, N. S.; Ramos, P. T.; Bona, N. P.; Soares, M. S. P.; Rodrigues, R.; Spanevello, R. M.; et al. 2-(2-Methoxyphenyl)-3-((Piperidin-1-Yl)Ethyl)Thiazolidin-4-One-Loaded Polymeric Nanocapsules: In Vitro Antiglioma Activity and In Vivo Toxicity Evaluation. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **2019**, *39* (6), 783–797.
<https://doi.org/10.1007/s10571-019-00678-4>.
- [12] da Silva, D. S.; da Silva, C. E. H.; Soares, M. S. P.; Azambuja, J. H.; de Carvalho, T. R.; Zimmer, G. C.; Frizzo, C. P.; Braganhol, E.; Spanevello, R. M.; Cunico, W. Thiazolidin-4-Ones from 4-(Methylthio)Benzaldehyde and 4-(Methylsulfonyl)Benzaldehyde: Synthesis, Antiglioma Activity and Cytotoxicity. *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, *124*, 574–582.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.057>.
- [13] Wan, Y.; Wu, S.; Xiao, G.; Liu, T.; Hou, X.; Chen, C.; Guan, P.; Yang, X.; Fang, H. Design, Synthesis and Preliminary Bioactivity Studies of 2-Thioxo-4-Thiazolidinone Derivatives as Bcl-2 Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.*, **2015**, *23* (9), 1994–2003.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.024>.
- [14] Omar, Y. M.; Abdu-Allah, H. H. M.; Abdel-Moty, S. G. Synthesis, Biological Evaluation and Docking Study of 1,3,4-Thiadiazole-Thiazolidinone Hybrids as Anti-Inflammatory Agents with Dual Inhibition of COX-2 and 15-LOX. *Bioorg. Chem.*, **2018**, *80* (July), 461–471.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.06.036>.
- [15] Azzam, R. A.; Mohareb, R. M.; Helal, M. H.; Eisa, K. K. Cytotoxicity, Tyrosine Kinase Inhibition of Novel Pyran, Pyridine, Thiophene, and Imidazole Derivatives. *J. Heterocycl. Chem.*, **2020**, *57* (8), 3037–3055. <https://doi.org/10.1002/jhet.4010>.
- [16] Kokkiligadda, S. B.; Musunuri, S.; Maiti, B.; Rao, M. V. B.; Sridhar, G. Synthesis and Anticancer Activity of 1,3,4-Oxadiazole-Oxazolo[4,5-b]Pyridine Derivatives. *Russ. J. Gen. Chem.*, **2020**, *90* (7), 1331–1335.
<https://doi.org/10.1134/S107036322007021X>.
- [17] Phoa, A. F.; Browne, S.; Gurgis, F. M. S.; Åkerfeldt, M. C.; Döbber, A.; Renn, C.; Peifer, C.; Stringer, B. W.; Day, B. W.; Wong, C.; et al. Pharmacology of Novel Small-Molecule Tubulin Inhibitors in Glioblastoma Cells with Enhanced EGFR Signalling. *Biochem. Pharmacol.*, **2015**, *98* (4), 587–601.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.10.014>.
- [18] Khan, K. M.; Naz, F.; Taha, M.; Khan, A.; Perveen, S.; Choudhary, M. I.; Voelter, W. Synthesis and in Vitro Urease Inhibitory Activity of N,N'-Disubstituted Thioureas. *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, *74*, 314–323.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.01.001>.
- [19] Chawla, P.; Kalra, S.; Kumar, R.; Singh, R.; Saraf, S. K. Novel 2-(Substituted Phenyl Imino)-5-Benzylidene-4-Thiazolidinones as Possible Non-Ulcerogenic Tri-Action Drug Candidates: Synthesis, Characterization, Biological Evaluation And Docking Studies. *Med. Chem. Res.*, **2019**, *28* (3), 340–359. <https://doi.org/10.1007/s00044-018-02288-z>.
- [20] St. Laurent, D. R.; Gao, Q.; Wu, D.; Serrano-Wu, M. H. Regioselective Synthesis of 3-(Heteroaryl)-Iminothiazolidin-4-Ones. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45* (9), 1907–1910.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.01.001>.
- [21] Da Frota, M. L. C.; Braganhol, E.; Canedo, A. D.; Klamt, F.; Apel, M. A.; Mothes, B.; Lerner, C.;

- Battastini, A. M. O.; Henriques, A. T.; Moreira, J. C. F. Brazilian Marine Sponge Polymastia Janeirensis Induces Apoptotic Cell Death in Human U138MG Glioma Cell Line, but Not in a Normal Cell Culture. *Invest. New Drugs*, **2009**, 27 (1), 13–20. <https://doi.org/10.1007/s10637-008-9134-3>.
- [22] Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods*, **1983**, 65 (1), 55–63. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [23] dos Santos, L. M.; da Silva, T. M.; Azambuja, J. H.; Ramos, P. T.; Oliveira, P. S.; da Silveira, E. F.; Pedra, N. S.; Galdino, K.; do Couto, C. A. T.; Soares, M. S. P.; et al. Methionine and Methionine Sulfoxide Treatment Induces M1/Classical Macrophage Polarization and Modulates Oxidative Stress and Purinergic Signaling Parameters. *Mol. Cell. Biochem.*, **2017**, 424 (1–2), 69–78. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2843-6>.
- [24] Misra, H. P.; Fridovich, I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.*, **1972**, 247 (10), 3170–3175.
- [25] Aebi, H. B. T.-M. in E. [13] Catalase in Vitro. In *Oxygen Radicals in Biological Systems*; Academic Press, 1984; Vol. 105, pp 121–126. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- [26] Aksenov, M. Y.; Markesbery, W. R. Changes in Thiol Content and Expression of Glutathione Redox System Genes in the Hippocampus and Cerebellum in Alzheimer's Disease. *Neurosci. Lett.*, **2001**, 302 (2–3), 141–145. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01636-6).
- [27] Amin, S. A.; Adhikari, N.; Jha, T.; Gayen, S. Exploring Structural Requirements of Unconventional Knoevenagel-Type Indole Derivatives as Anticancer Agents through Comparative QSAR Modeling Approaches. *Can. J. Chem.*, **2016**, 94 (7), 637–644. <https://doi.org/10.1139/cjc-2016-0050>.
- [28] Mphahlele, M. J.; Makhafa, T. J.; Mmonwa, M. M. In Vitro Cytotoxicity of Novel 2,5,7-Tricarbo-Substituted Indoles Derived from 2-Amino-5-Bromo-3-Iodoacetophenone. *Bioorganic Med. Chem.*, **2016**, 24 (19), 4576–4586. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.07.056>.
- [29] Chadha, N.; Silakari, O. Indoles as Therapeutics of Interest in Medicinal Chemistry: Bird's Eye View. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 134, 159–184. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.003>.
- [30] Huang, X.-J.; Li, C.-T.; Zhang, W.-P.; Lu, Y.-B.; Fang, S.-H.; Wei, E.-Q. Dihydroartemisinin Potentiates the Cytotoxic Effect of Temozolomide in Rat C6 Glioma Cells. *Pharmacology*, **2008**, 82 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1159/000125673>.
- [31] Ghosh, C.; Nandi, A.; Basu, S. Supramolecular Self-Assembly of Triazine-Based Small Molecules: Targeting the Endoplasmic Reticulum in Cancer Cells. *Nanoscale*, **2019**, 11 (7), 3292–3299. <https://doi.org/10.1039/c8nr08682f>.
- [32] Mobaraki, R. N.; Karimi, M.; Alikarami, F.; Farhadi, E.; Amini, A.; Bashash, D.; Paridar, M.; Kokhaei, P.; Rezvani, M. R.; Kazemi, A.; et al. RITA Induces Apoptosis in P53-Null K562 Leukemia Cells by Inhibiting STAT5, Akt, and NF-KB Signaling Pathways. *Anticancer. Drugs*, **2018**, 29 (9), 847–853. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000651>.
- [33] Patil, S.; Ghosh, D.; Radhakrishna, M.; Basu, S. Mitochondrial Impairment by Cyanine-Based Small Molecules Induces Apoptosis in Cancer Cells. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2020**, 11 (1), 23–28. <https://doi.org/10.1021/acsmmedchemlett.9b00304>.
- [34] Nirmala, J. G.; Lopus, M. Cell Death Mechanisms in Eukaryotes. *Cell Biol. Toxicol.*, **2020**, 36 (2), 145–164. <https://doi.org/10.1007/s10565-019-09496-2>.
- [35] Proskuryakov, S. Y.; Konoplyannikov, A. G.; Gabai, V. L. Necrosis: A Specific Form of Programmed Cell Death? *Exp. Cell Res.*, **2003**, 283 (1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(02\)00027-7](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(02)00027-7).
- [36] Persad, R.; Liu, C.; Wu, T. T.; Houlihan, P. S.; Hamilton, S. R.; Diehl, A. M.; Rashid, A. Overexpression of Caspase-3 Hepatocellular Carcinomas. *Mod. Pathol.*, **2004**, 17 (7), 861–867. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800146>.
- [37] Panieri, E.; Santoro, M. M. Ros Homeostasis and Metabolism: A Dangerous Liason in Cancer Cells. *Cell Death Dis.*, **2016**, 7 (6), e2253-12. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.105>.
- [38] Gorrini, C.; Harris, I. S.; Mak, T. W. Modulation of Oxidative Stress as an Anticancer Strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2013**, 12 (12), 931–947. <https://doi.org/10.1038/nrd4002>.
- [39] Scherz-Shouval, R.; Elazar, Z. ROS, Mitochondria and the Regulation of Autophagy. *Trends Cell Biol.*, **2007**, 17 (9), 422–427.

<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.07.009>.

- [40] Ighodaro, O. M.; Akinloye, O. A. First Line Defence Antioxidants-Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPX): Their Fundamental Role in the Entire Antioxidant Defence Grid. *Alexandria J. Med.*, **2018**, 54 (4), 287–293.
<https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.
- [41] Huber, W. W.; Parzefall, W. Thiols and the Chemoprevention of Cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2007**, 7 (4), 404–409.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.05.005>.
- [42] Bonner, M. Y.; Arbiser, J. L. The Antioxidant Paradox: What Are Antioxidants and How Should They Be Used in a Therapeutic Context for Cancer. *Future Med. Chem.*, **2014**, 6 (12), 1413–1422.
<https://doi.org/10.4155/fmc.14.86>.

Supplementary Material

Synthesis and Biological Evaluation of Novel 2-imino-4-thiazolidinones as Potential Antitumor Agents for Glioblastoma

José Coan Campos^{*a}, Patrick Teixeira Campos^b, Nathalia Stark Pedra^c, Natália Pontes Bona^c, Mayara Sandrielly Soares^c, Priscila Oliveira Souza^d, Elizandra Braganhol^d, Wilson Cunico^a, Geonir Machado Siqueira^a,

^a Laboratório de Química Aplicada a Bioativos (LaQuiABio), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Capão do Leão, RS, Brazil; ^b Laboratório de Química Orgânica Sintética, Estrutural e Computacional (LaQuiOSEC), Instituto Federal Sul-rio-grandense, Campus Pelotas, Pelotas, RS, Brazil; ^c Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer (Neurocan), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Capão do Leão, RS, Brazil; ^d Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Sarmiento Leite 245, Porto Alegre, RS, Brazil.

Table of Contents	Table/Figure	Page
Experimental Chemical protocol	-	2-4
Crystal data	Table 1S	5
CG-MS spectrum	Fig. 1S	6
¹ H and ¹³ C NMR spectra	Fig. 2S – 18S	7 – 23

Experimental Chemical protocol

General

Reagents and solvents used were obtained from commercial suppliers without further purification. The progress of reactions was monitored by Thin Layer Chromatography (TLC, using silica gel 60F₂₅₄ aluminium sheets from Merck, Germany; visualization by ultraviolet light 254 nm). GC–MS analysis was performed on a GC 2010-plus GC–MS-QP2010SE System AOC-20i – auto injector from Shimadzu, Japan. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded using a Bruker DRX 400 (¹H at 400 MHz and ¹³C at 100 MHz), a Bruker AVANCE 500 (¹H at 500 MHz and ¹³C at 125 MHz) and a Bruker AVANCE III 600 (¹H at 600 MHz, ¹³C at 150 MHz and ¹⁵N at 60 MHz) in deuterated chloroform (CDCl₃) or deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-d₆) containing trimethylsilane (TMS) as in internal standard. Single-crystal X-ray diffraction was recorded in a Bruker APEX – III diffractometer using Cu K α radiation (λ = 1.54184 Å). The structure refinement was performed using the crystallographic software package WinGX-2018 from the SHELXS-2018 and SHELXL-2018 software. The crystal data is available on the supplementary material section.

Physics properties and spectral data for compounds 3

(2Z)-2-(phenylimino)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one 3

Bright white crystal (0.7810 g, 58%), Mp 255-257 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.43 (ddd, J = 4.9, 1.9, 0.8 Hz, 1H), 7.61 (ddd, J = 8.0, 7.4, 1.9 Hz, 1H), 7.52 – 7.48 (m, 2H), 7.45 – 7.41 (m, 1H), 7.36 – 7.32 (m, 2H), 7.01 (ddd, J = 7.3, 4.9, 1.0 Hz, 1H), 6.98 (dt, J = 8.1, 0.9 Hz, 1H), 3.91 (s, 2H) ppm; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 171.9, 158.4, 158.3, 146.5, 138.0, 135.5, 129.2, 128.8, 128.3, 121.1, 120.0, 33.5 ppm; EIMS (70 eV) m/z (relative intensity %): 269 [M]⁺ (64), 227 (27), 201 (42), 169 (52), 104 (36), 78 (100), 51 (42).

Physics properties and spectral data for compounds 5a-p

(2Z)-5-(benzylidene)-2-(phenylimino)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one 5a

Yellow powder (0.1144 g, 64%), Mp 253-255 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.52 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.68 – 7.60 (m, 3H), 7.55 – 7.38 (m, 8H), 7.07 – 7.01 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 166.3, 158.0, 153.2, 147.0, 138.0, 135.6, 134.3, 132.5, 130.5, 129.8, 129.1, 128.7, 128.4, 124.2, 121.6, 120.2 ppm.

(2Z)-5-(2-fluorobenzylidene)-2-(phenylimino)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one 5b

Yellow powder (0.1370 g, 73%), Mp 252-254 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.51 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.76 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.63 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.58 – 7.49 (m, 2H), 7.49 – 7.34 (m, 4H), 7.29 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.19 – 7.10 (m, 1H), 7.08 – 6.96 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 165.0, 161.5 (d, ¹ J_{C-F} = 254.4 Hz), 157.8, 147.0, 138.0, 135.5, 131.5 (d, ³ J_{C-F} = 8.6 Hz), 129.7, 129.1, 128.7, 128.4, 126.4, 124.6 (d, ⁴ J_{C-F} = 3.3 Hz), 124.3 (d, ³ J_{C-F} = 6.4 Hz), 122.7 (d, ² J_{C-F} = 12.2 Hz), 121.7, 120.3, 116.1 (d, ² J_{C-F} = 21.7 Hz) ppm.

(2Z)-5-(2-chlorobenzylidene)-2-(phenylimino)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one 5c

Yellow powder (0.1587 g, 81%), Mp 218-221 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.48 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.74 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.67 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.56 – 7.50 (m, 2H), 7.49 – 7.42 (m, 4H), 7.39 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.32 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.10 – 7.02 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 165.6, 157.5, 153.5, 146.3, 138.8, 135.8, 135.3, 132.7, 130.7, 130.4, 129.6, 129.1, 129.0, 128.8, 128.4, 127.2, 126.8, 121.5, 120.3 ppm.

(2Z)-5-(2-methoxybenzylidene)-2-(phenylimino)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one 5d

Yellow powder (0.1744 g, 90%), Mp 248-250 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.50 (br s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.71 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.56 – 7.49 (m, 2H), 7.48 – 7.41 (m, 3H), 7.38 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.13 – 7m.03 (m, 3H), 6.94 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H) ppm; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 166.2, 158.6, 157.6, 154.9, 145.9, 139.3, 135.3, 131.7, 129.7, 129.1, 128.8, 128.7, 128.4, 123.4, 123.0, 121.1, 120.9, 120.1, 111.2, 55.7 ppm.

(2Z)-5-(2-nitrobenzylidene)-2-(phenylimino)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one 5e

Yellow powder (0.1730 g, 86%), Mp 223-226 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.42 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 8.21 – 8.10 (m, 2H), 7.85 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.68 – 7.52 (m, 4H), 7.51 – 7.40 (m, 3H), 7.09 – 9.98 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 165.1, 157.4, 152.4, 148.1, 146.7, 138.1, 135.1, 133.9, 130.2, 130.1, 130.0, 129.3, 129.2, 128.9, 128.3, 128.2, 125.4, 121.9, 120.4 ppm.

(2Z)-5-(3-fluorobenzylidene)-2-(phenylimino)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one 5f

Yellow powder (0.1089 g, 58%), Mp 245-248 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.54 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.65 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.58 – 7.52 (m, 2H), 7.50 – 7.41 (m, 5H), 7.36 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 7.15 – 7.04 (m, 3H) ppm; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 166.1, 162.9 (d, ¹*J*_{C-F} = 247.1 Hz), 157.5, 152.6, 146.9, 138.1, 136.2 (d, ³*J*_{C-F} = 7.9 Hz), 135.3, 130.9 (d, ⁴*J*_{C-F} = 2.8 Hz), 130.6 (d, ³*J*_{C-F} = 8.3 Hz), 129.2, 128.8, 128.3, 126.3 (d, ⁴*J*_{C-F} = 3.0 Hz), 125.7, 121.7, 120.4, 116.7 (d, ²*J*_{C-F} = 21.8 Hz, 2C) ppm.

(2Z)-5-(3-chlorobenzylidene)-2-(phenylimino)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one 5g

Yellow powder (0.1274 g, 65%), Mp 246-248 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.55 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.66 (td, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.59 – 7.52 (m, 3H), 7.51 – 7.37 (m, 5H), 7.11 – 7.05 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 166.1, 157.5, 152.6, 146.9, 138.1, 135.9, 135.3, 135.1, 130.7, 130.3, 130.2, 129.7, 129.1, 128.8, 128.3, 128.2, 125.9, 121.7, 120.4 ppm.

(2Z)-5-(3-methoxybenzylidene)-2-(phenylimino)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one 5h

Yellow powder (0.1279 g, 66%), Mp 217-219 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.51 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.70 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.57 – 7.50 (m, 2H), 7.49 – 7.42 (m, 3H), 7.39 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.12 – 7.03 (m, 2H), 6.96 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H) ppm; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 166.1, 160.1, 157.5, 154.1, 146.1, 139.0, 135.4, 135.3, 132.8, 130.1, 129.2, 128.8, 128.4, 124.0, 122.8, 121.3, 120.3, 116.0, 115.7, 55.4 ppm.

(2Z)-5-(3-nitrobenzylidene)-2-(phenylimino)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one 5i

Yellow powder (0.1509 g, 75%), Mp 246-248 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ 8.52 (m, 2H), 8.28 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.86 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H), 7.80 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.60 – 7.54 (m, 2H), 7.53 – 7.46 (m, 3H), 7.23 – 7.19 (m, 1H), 7.03 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H) ppm; ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆): δ 165.8, 157.5, 152.2, 151.2, 149.7, 146.9, 138.1, 136.8, 135.4, 130.6, 129.2, 128.8, 128.3, 128.1, 127.4, 124.0, 121.8, 120.5 ppm.

(2Z)-5-(4-fluorobenzylidene)-2-(phenylimino)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one 5j

Yellow powder (0.1352 g, 72%), Mp 272-274 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.52 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.69 – 7.58 (m, 7H), 7.57 – 7.48 (m, 5H), 7.44 (dd, *J* = 22.6, 6.9 Hz, 6H), 7.18 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 7.04 (d, *J* = 7.4 Hz, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 166.3, 163.3 (d, ¹*J*_{C-F} = 252.9 Hz), 157.6, 152.9, 146.8, 138.1, 135.3, 132.5 (d, ³*J*_{C-F} = 8.6 Hz), 131.3, 130.4 (d, ⁴*J*_{C-F} = 3.3 Hz), 129.5, 129.2, 128.8, 128.3, 127.3, 123.7, 121.7, 120.3, 116.3 (d, ²*J*_{C-F} = 21.9 Hz) ppm.

(2Z)-5-(4-chlorobenzylidene)-2-(phenylimino)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one 5k

Yellow powder (0.1509 g, 77%), Mp 256-257 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.52 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.67 – 7.60 (m, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.55 – 7.49 (m, 2H), 7.49 – 7.43 (m, 3H), 7.42 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.09 – 6.98 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 166.2, 157.6, 152.7, 146.9, 138.1, 135.8, 135.3, 132.6, 131.6, 131.0, 129.4, 129.2, 128.8, 128.3, 124.8, 121.7, 120.4 ppm.

(2Z)-5-(4-methoxybenzylidene)-2-(phenylimino)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one 5l

Yellow powder (0.1627 g, 84%), Mp 242-244 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.52 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.66 – 7.56 (m, 3H), 7.55 – 7.48 (m, 2H), 7.47 – 7.37 (m, 3H), 7.08 – 6.94 (m, 4H), 3.87 (s, 3H) ppm; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 166.6, 161.1, 158.2, 153.4, 147.0, 137.9, 135.8, 132.4, 129.1, 128.6, 128.5, 127.1, 121.5, 121.3, 120.0, 114.8, 55.5 ppm.

(2Z)-5-(4-nitrobenzylidene)-2-(phenylimino)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one 5m

Red powder (0.1831 g, 91%), Mp 264-267 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.54 (s, 1H), 8.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.83 (s, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.57 – 7.52 (m, 2H), 7.51 – 7.45 (m, 1H), 7.42 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.11 – 7.05 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 165.7, 157.4, 151.8, 147.8, 146.9, 140.5, 138.2, 135.3, 130.8, 129.4, 129.2, 129.0, 128.9, 128.3, 124.3, 121.9, 120.7 ppm.

(2Z)-2-(phenylimino)-3-(pyridin-2-yl)-5-(pyridin-3-ylmethylene)thiazolidin-4-one 5n

White powder (0.1631 g, 91%), Mp 248-250 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.92 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.59 – 7.50 (m, 2H), 7.49 – 7.37 (m, 4H), 7.15 – 6.97 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 166.2, 157.6, 152.7, 146.9, 138.1, 135.8, 135.3, 132.6, 131.6, 131.0, 129.4, 129.2, 128.8, 128.3, 124.8, 121.7, 120.4 ppm.

(2Z)-2-(phenylimino)-3-(pyridin-2-yl)-5-(thiophen-2-ylmethylene)thiazolidin-4-one 5o

Brown powder (0.1127 g, 62%), Mp 235-236 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.55 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.68 – 7.61 (m, 2H), 7.54 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.50 – 7.40 (m, 4H), 7.2 (t, *J* = 4.3 Hz, 1H), 7.10 – 7.03 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 166.1, 157.6, 152.8, 146.8, 138.4, 138.1, 135.4, 132.6, 131.1, 129.1, 128.7, 128.4, 128.3, 125.0, 122.0, 121.6, 120.2 ppm.

(2Z)-5-((3a,7a-dihydro-1H-indol-3-yl)methylene)-2-(phenylimino)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one 5p

Yellow powder (0.1645 g, 83%), Mp 275-277 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 12.11 (s, 1H), 8.59 (dd, *J* = 5.2, 1.9 Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.91 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.77 (td, *J* = 7.7, 2.0 Hz, 1H), 7.60 – 7.53 (m, 3H), 7.52 – 7.46 (m, 3H), 7.27 (td, *J* = 7.2, 1.2 Hz, 1H), 7.24 – 7.15 (m, 2H), 7.00 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H) ppm; ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ 166.5, 157.3, 153.1, 147.0, 138.6, 136.2, 136.0, 129.0, 128.8, 128.7, 128.5, 126.9, 124.0, 123.0, 121.02, 120.97, 120.2, 118.4, 116.7, 112.4, 110.9 ppm.

Table 1S. Data collection and structure refinement for compound 3.

Compound	3
Crystal data	
Chemical formula	C ₁₄ H ₁₁ N ₃ OS
CCDC number	1562762
Mr	269.32
Crystal system, space group	Monoclinic, P c
Temperatura (K)	293(2)
Wavelength (λ)(Å)	1.54184
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å ²)	9.1155(6); 5.5672(4); 12.4250(6)
α , β , γ (°)	90; 91.258(4); 90
<i>V</i> (Å ³)	630.39(7)
<i>Z</i>	2
<i>F</i> (000)	280
<i>D_x</i> (Mg.m ⁻³)	1.419
Radiation type	Cu K α
μ (mm ⁻¹)	2.240
Crystal size (mm)	0.216 x 0.192 x 0.132
Data collection	
Diffractometer	Bruker APEX – III
Absorption correction (Coppens, P., 1970)	Gaussian
<i>T</i> _{min} , <i>T</i> _{max}	0.7531 e 0.891
Reflections collected, unique	4651; 1868
<i>R</i> _{int}	0.0167
θ_{max} (°)	68.185
Refinement	
<i>R</i> [<i>F</i> ² > 2 σ (<i>F</i> ²)], <i>wR</i> (<i>F</i> ²), <i>S</i>	0.0276; 0.0759; 1.063
N°. of reflections	1868
N°. of parameters	172
$\Delta\rho_{max}$, $\Delta\rho_{min}$ (e.Å ⁻³)	0.374 e -0.292

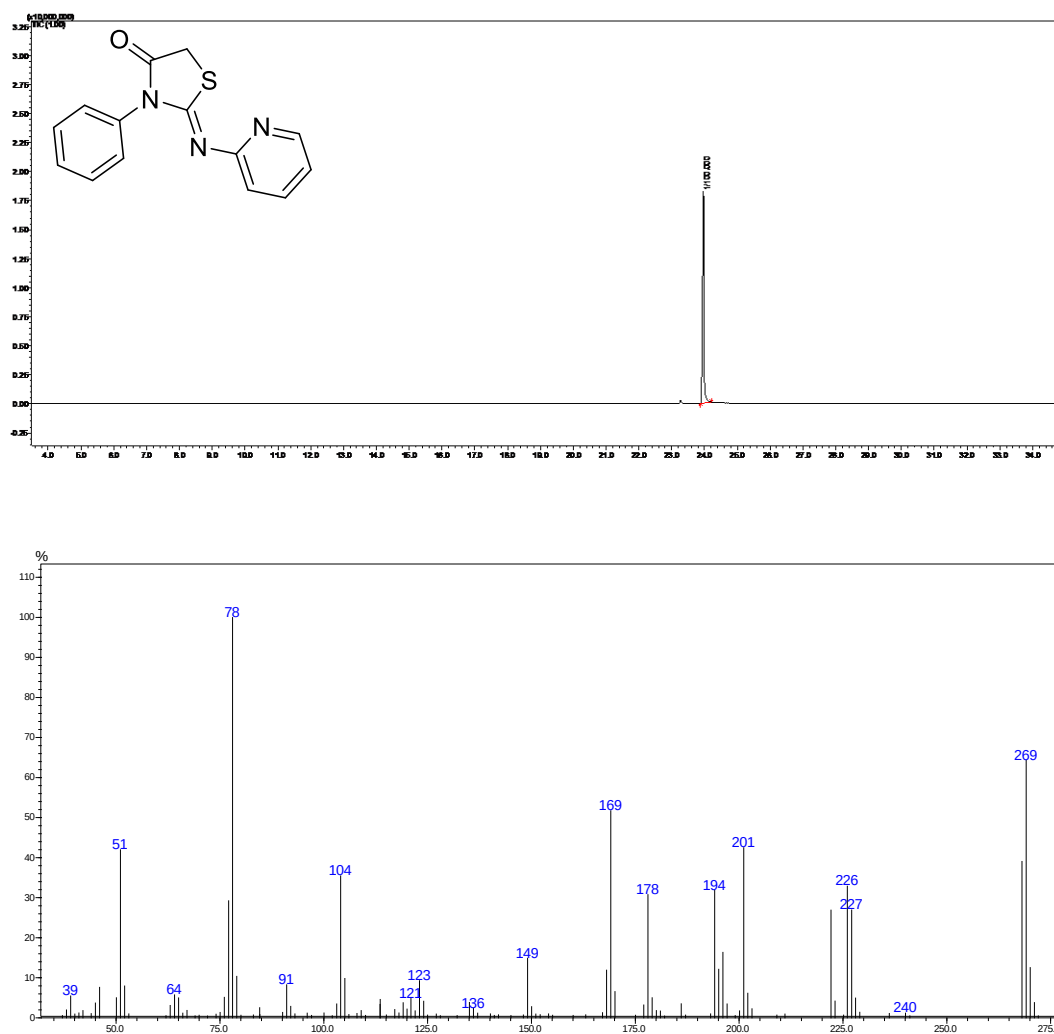


Fig. 1S CG-MS of 2-imino-thiazolidin-4-one 3.

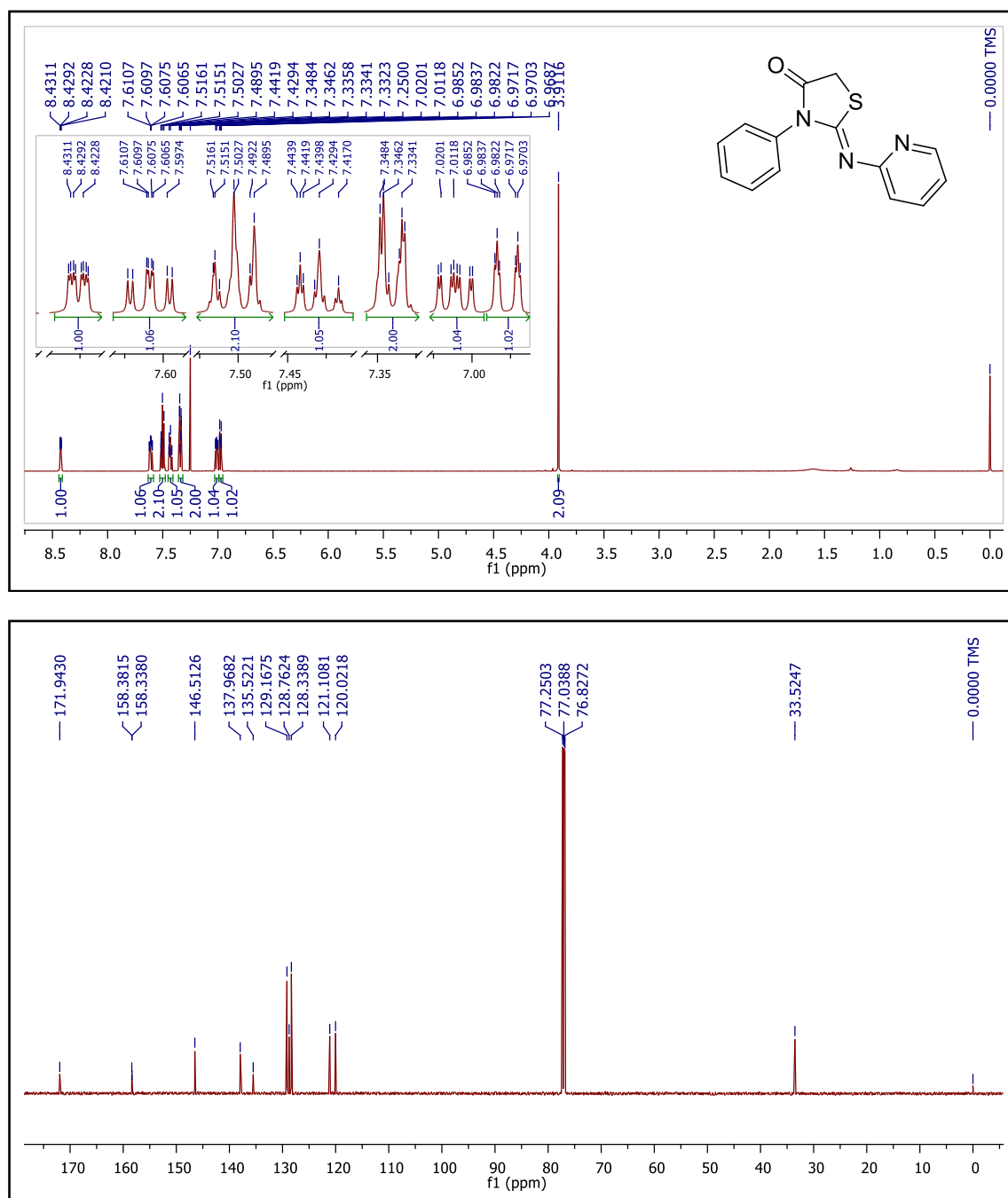
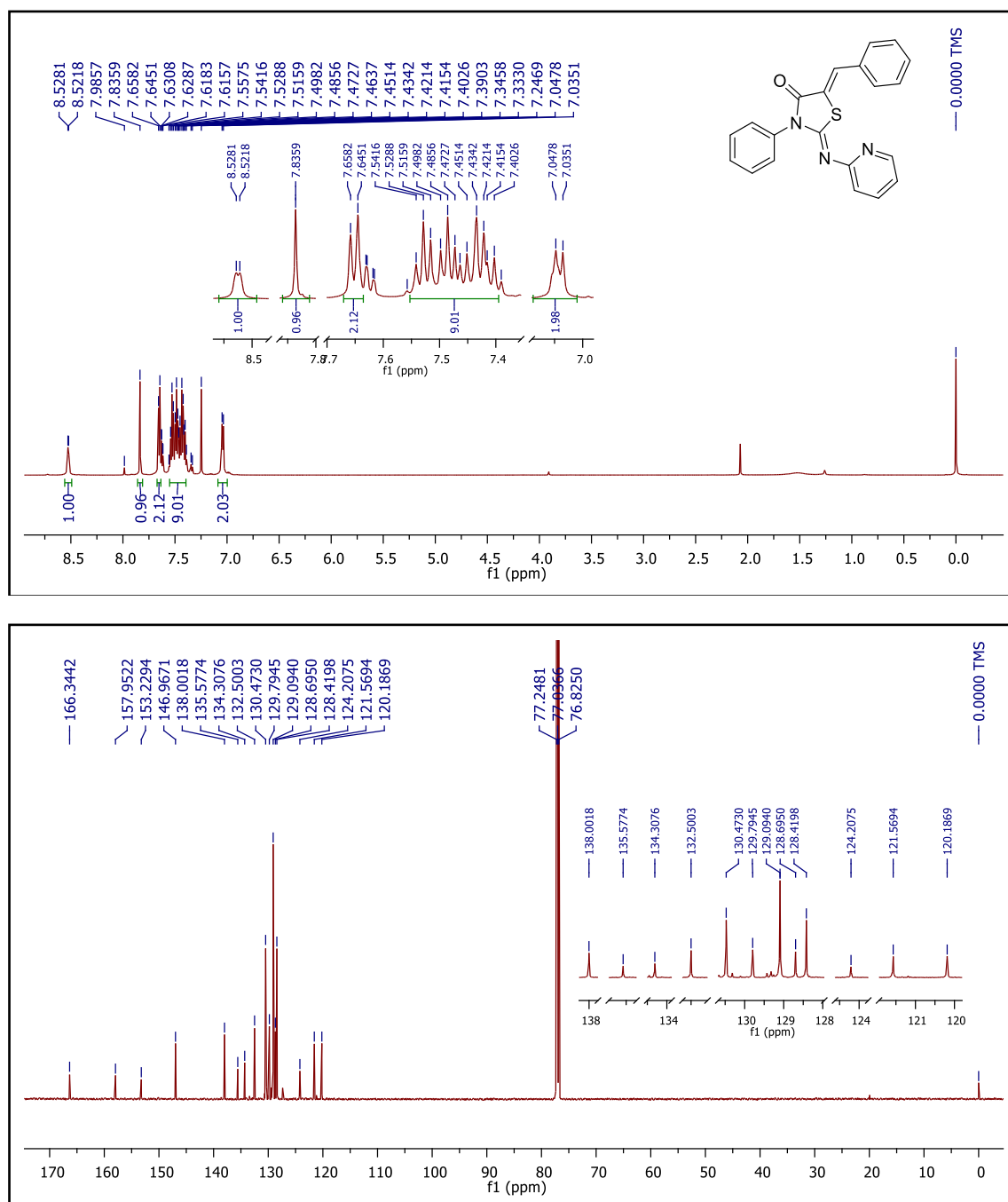


Fig. 2S ^1H (600 MHz, CDCl_3) and ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) NMR spectra of 2-imino-thiazolidin-4-one **3**.

Fig. 3S ^1H (600 MHz, CDCl_3) and ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) NMR spectra of 2-imino-thiazolidin-4-one **5a**

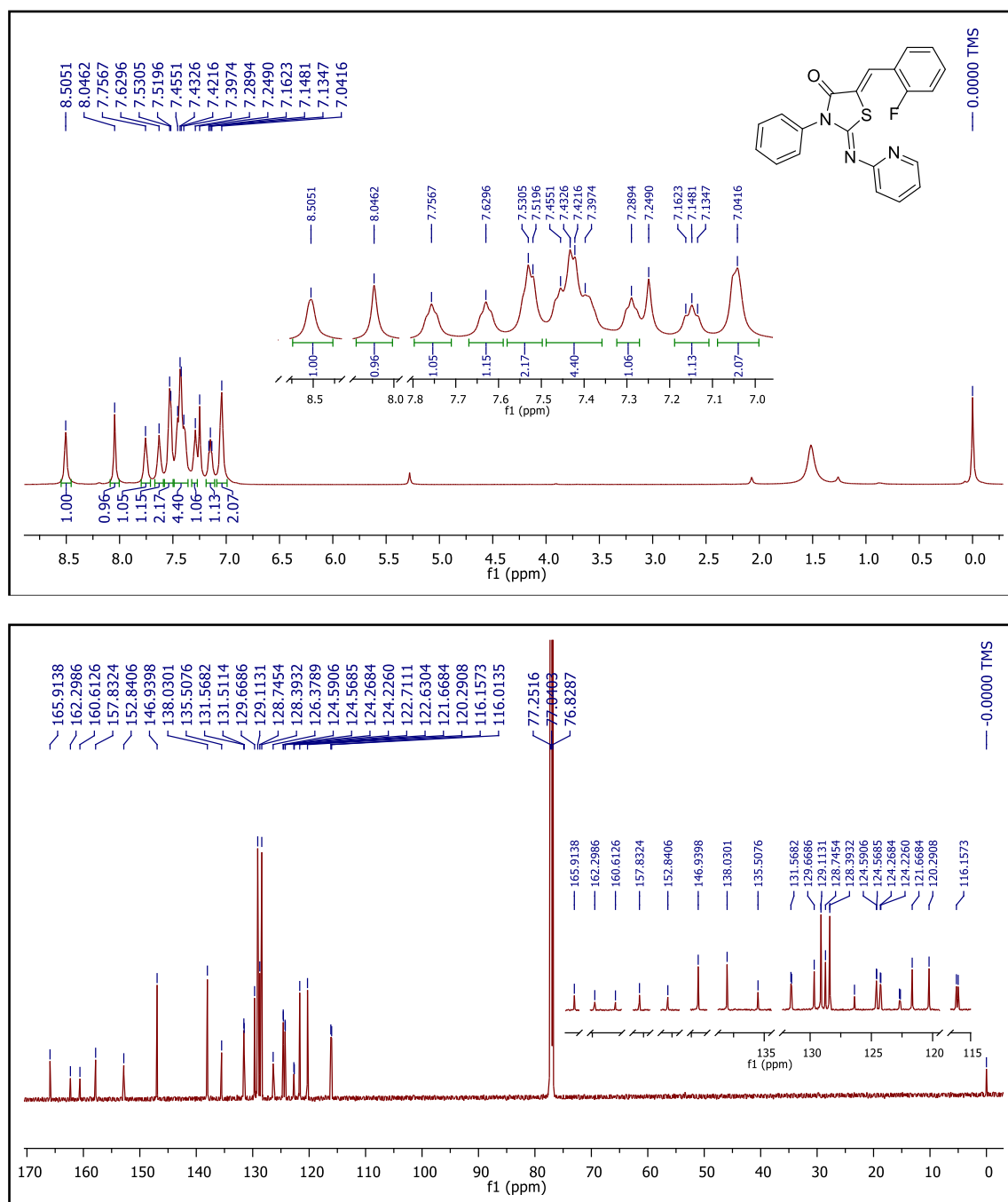
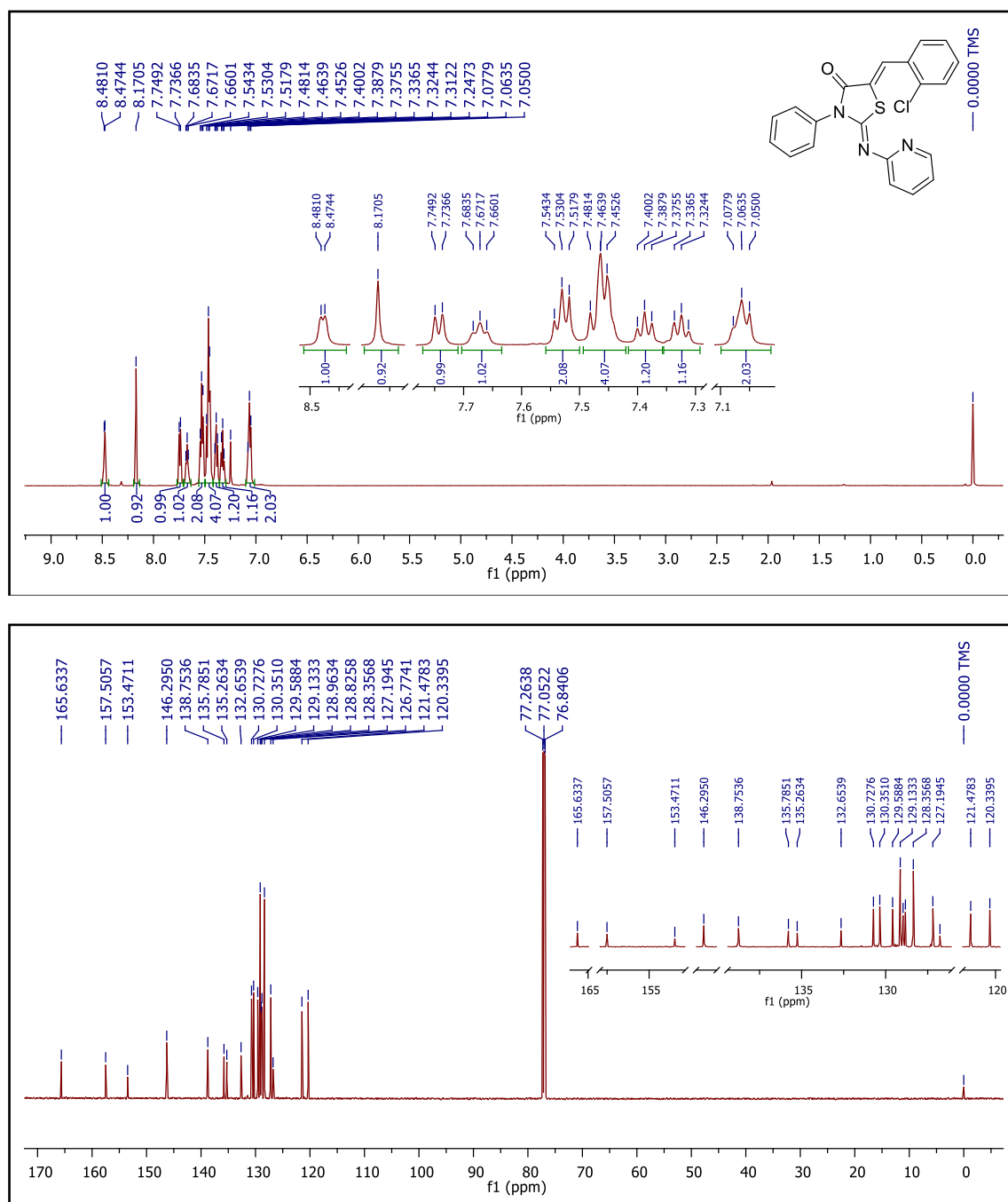


Fig. 4S ^1H (600 MHz, CDCl_3) and ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) NMR spectra of 2-imino-thiazolidin-4-one **5b**.

Fig. 5S ¹H (600 MHz, CDCl₃) and ¹³C (150 MHz, CDCl₃) NMR spectra of 2-imino-thiazolidin-4-one 5c.

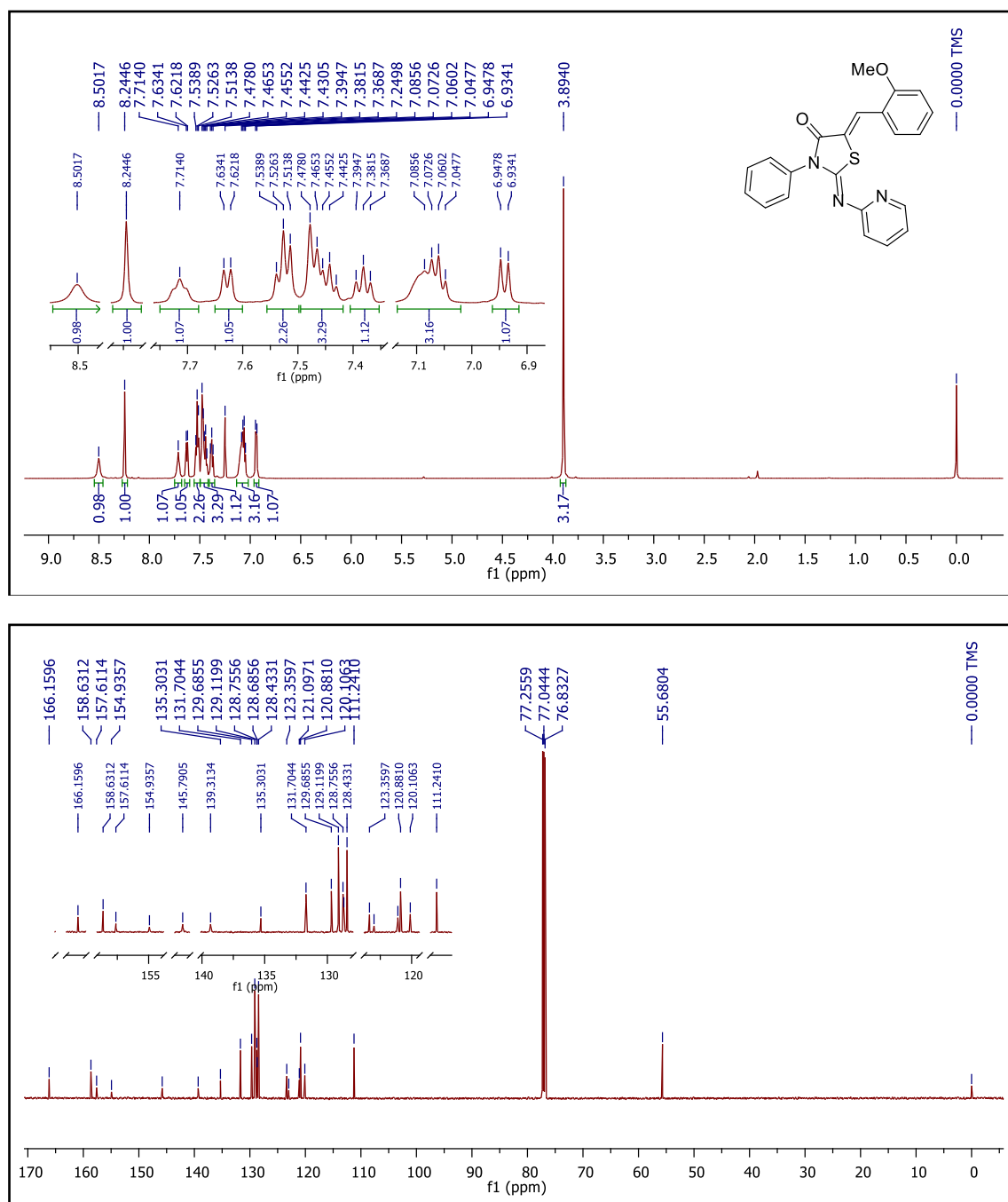


Fig. 6S ^1H (600 MHz, CDCl_3) and ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) NMR spectra of 2-imino-thiazolidin-4-one **5d**.

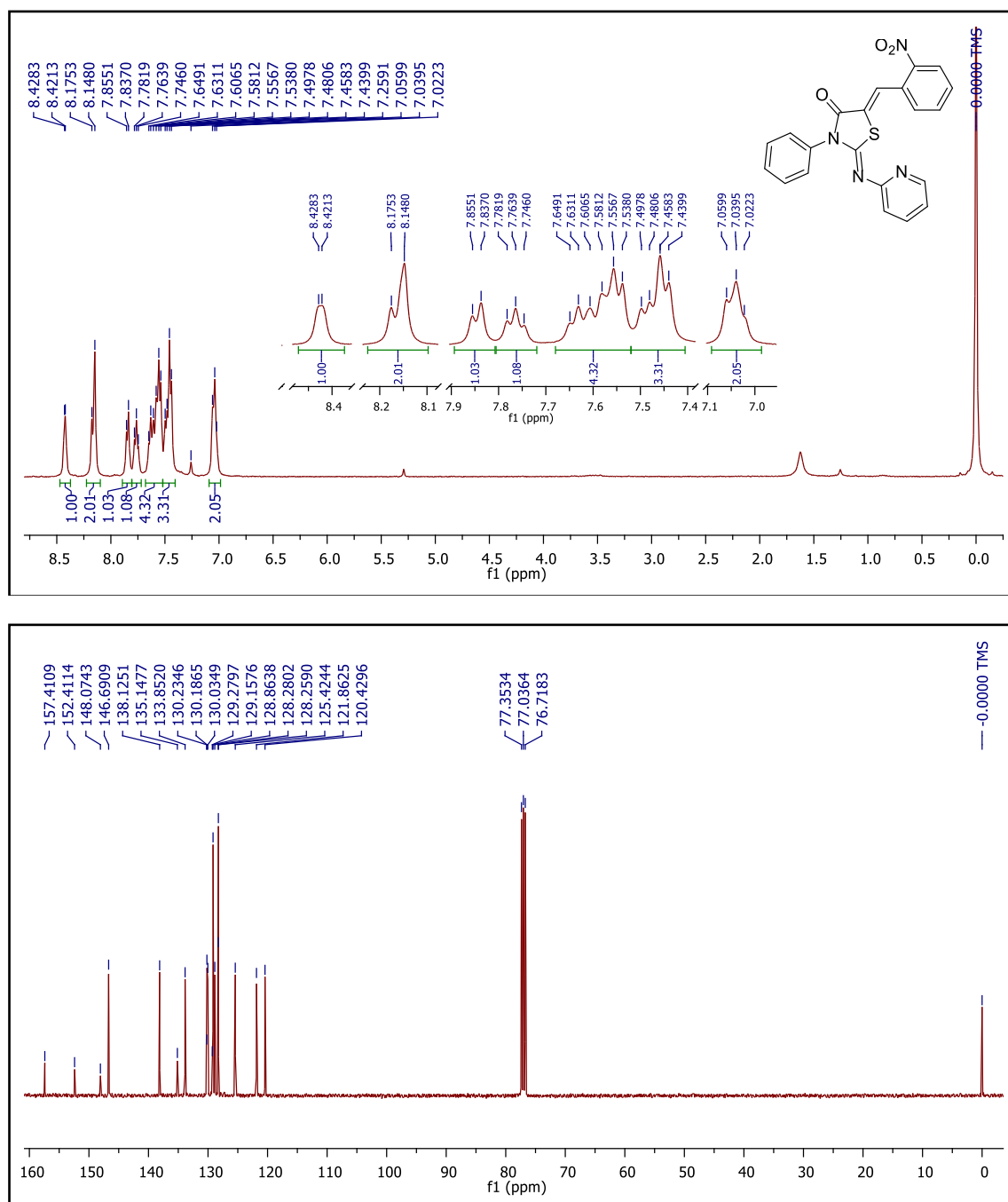


Fig. 7S ¹H (400 MHz, CDCl₃) and ¹³C (100 MHz, CDCl₃) NMR spectra of 2-imino-thiazolidin-4-one 5e.

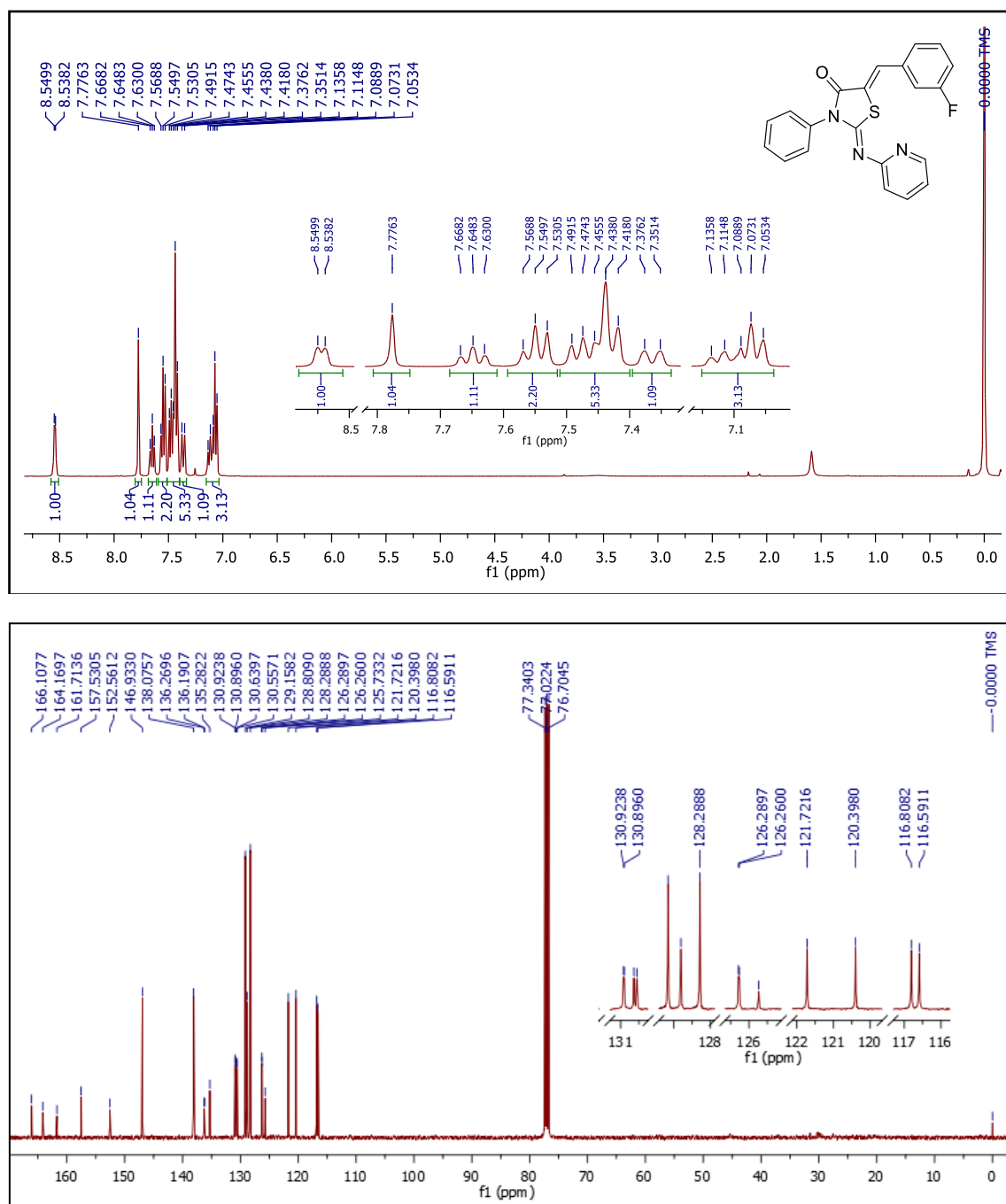


Fig. 8S ¹H (400 MHz, CDCl₃) and ¹³C (100 MHz, CDCl₃) NMR spectra of 2-imino-thiazolidin-4-one **5f**.

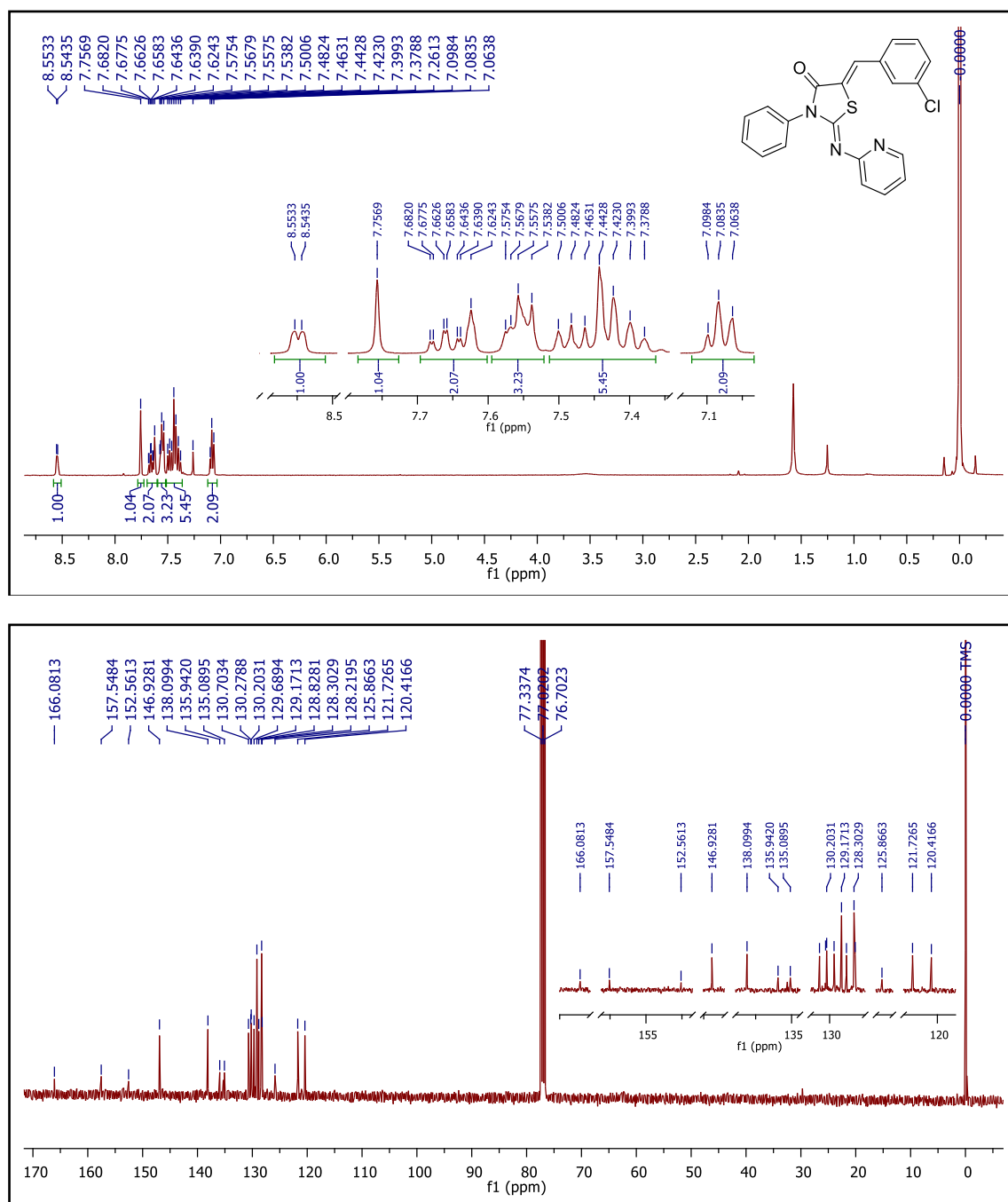
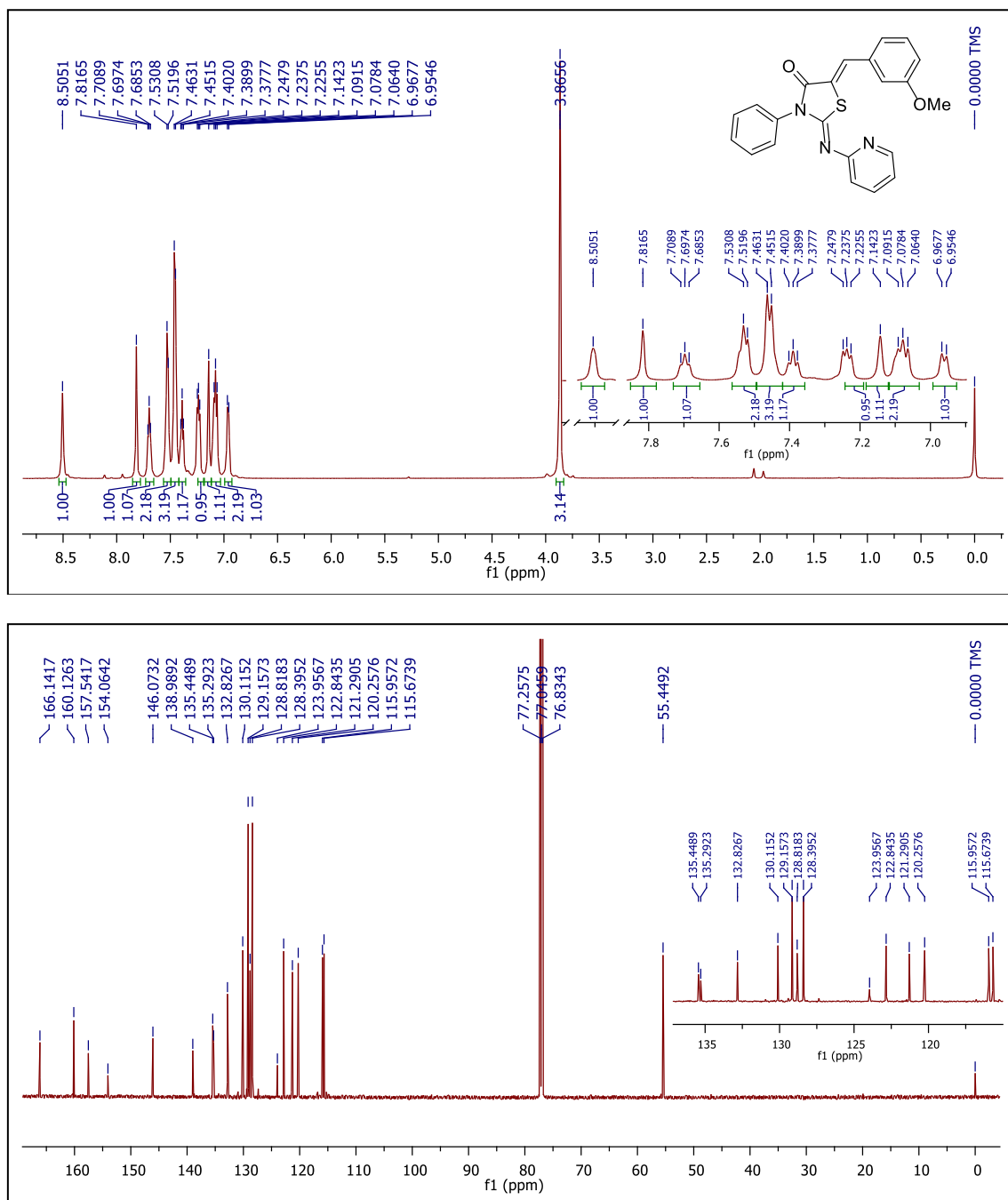


Fig. 9S ^1H (400 MHz, CDCl_3) and ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) NMR spectra of 2-imino-thiazolidin-4-one **5g**.

Fig. 10S ^1H (600 MHz, CDCl_3) and ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) NMR spectra of 2-imino-thiazolidin-4-one **5h**.

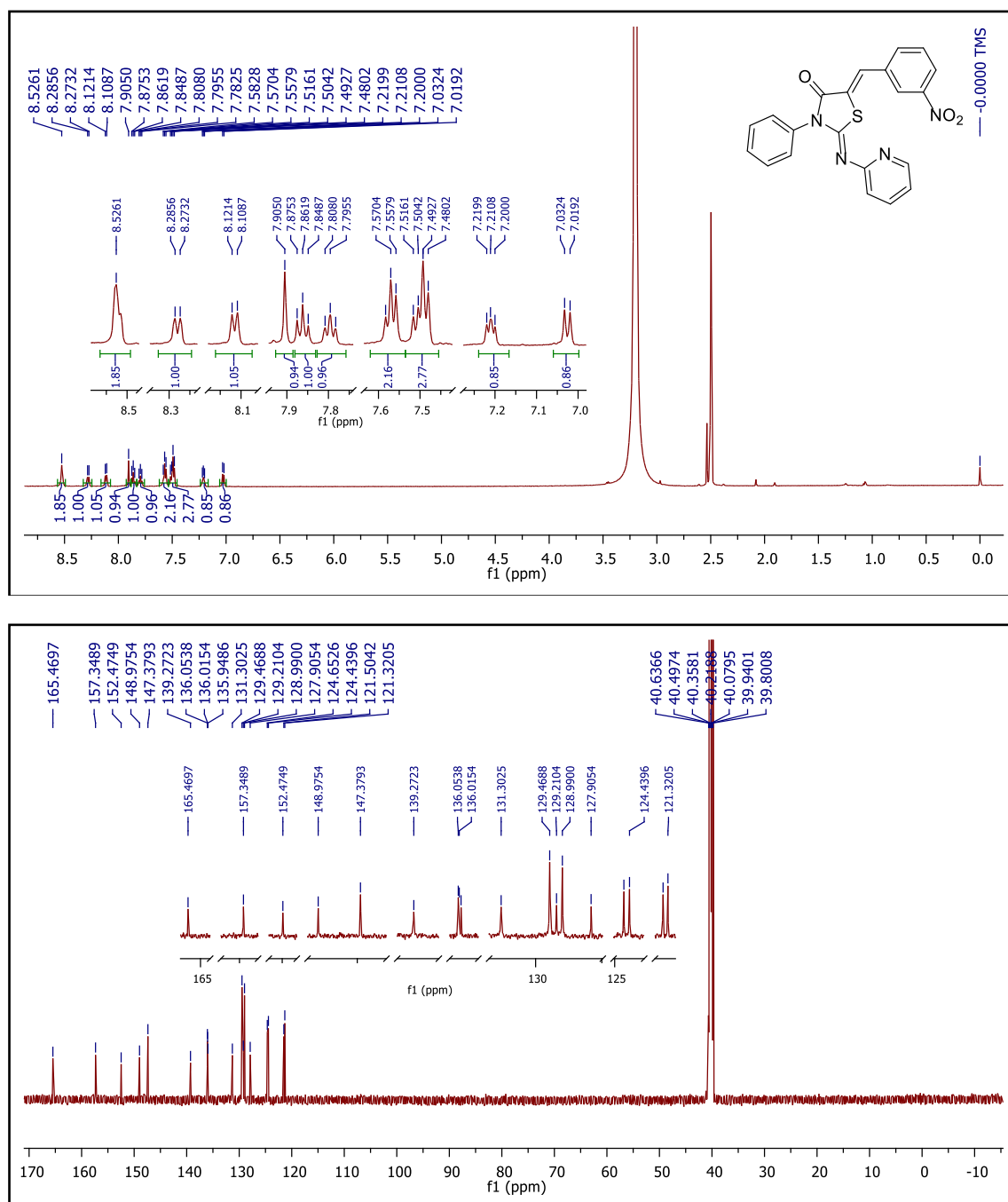


Fig. 11S ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) and ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6) NMR spectra of 2-imino-thiazolidin-4-one **5i**.

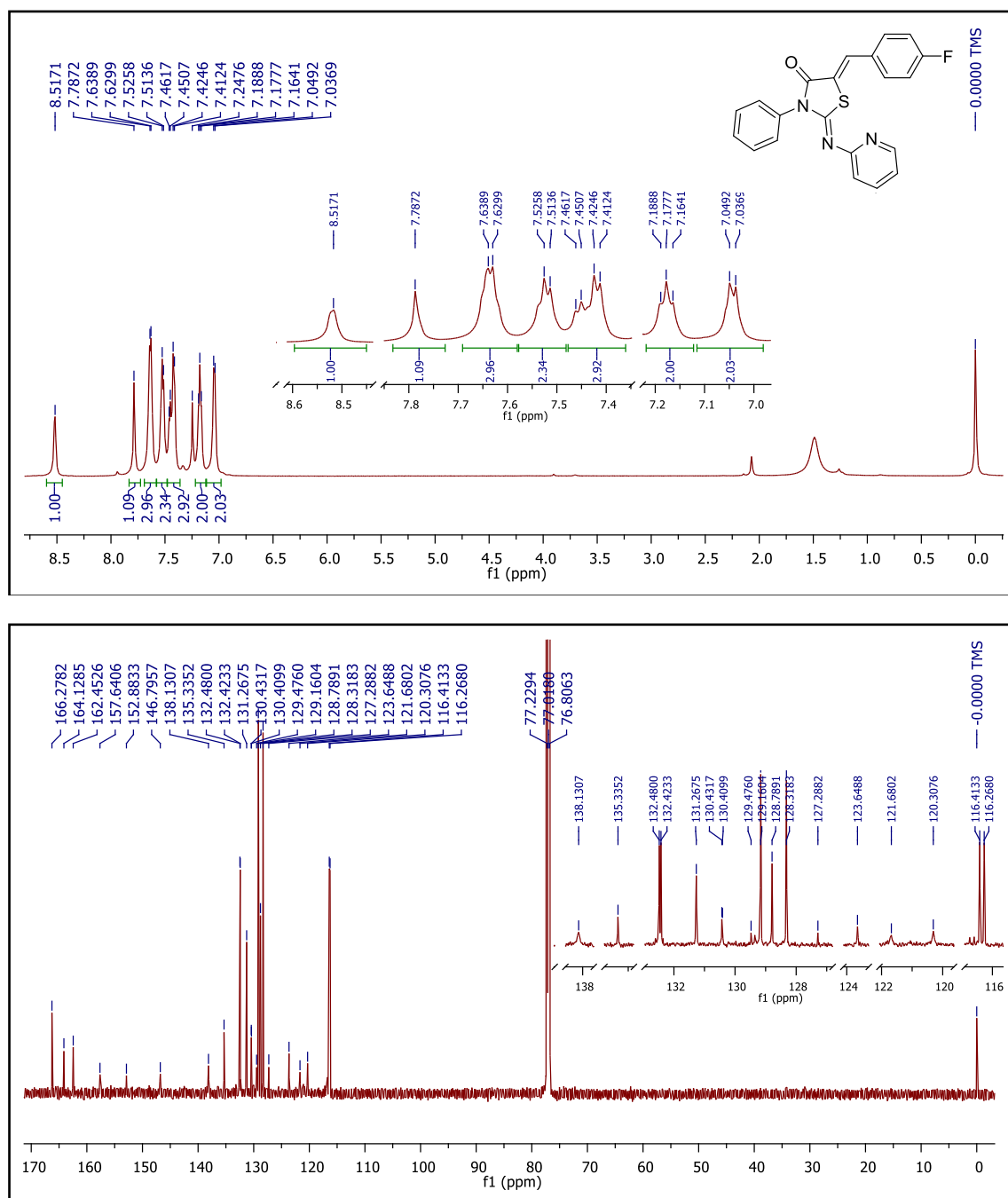


Fig. 12S ^1H (600 MHz, CDCl_3) and ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) NMR spectra of 2-imino-thiazolidin-4-one **5j**.

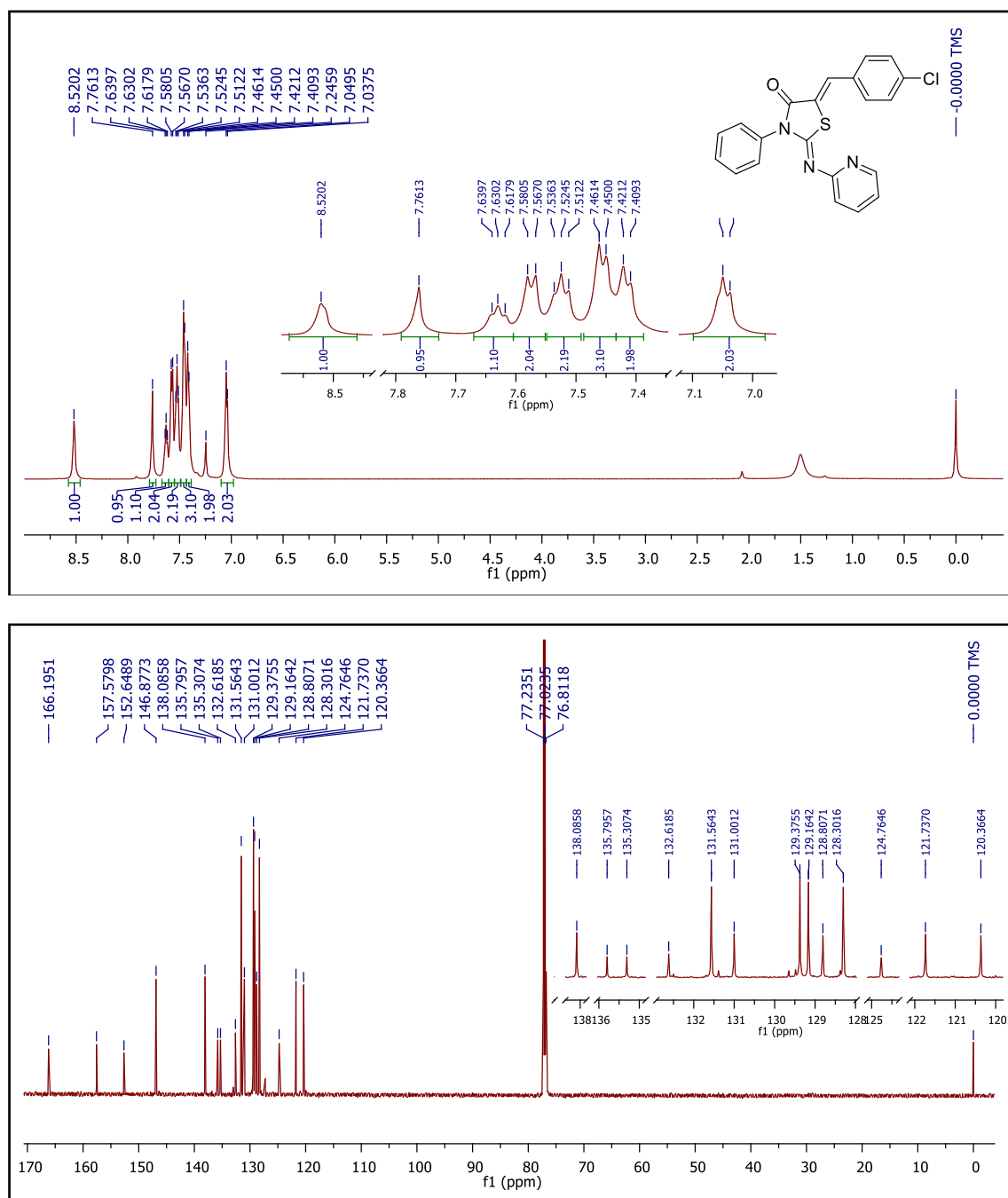


Fig. 13S ^1H (600 MHz, CDCl_3) and ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) NMR spectra of 2-imino-thiazolidin-4-one **5k**.

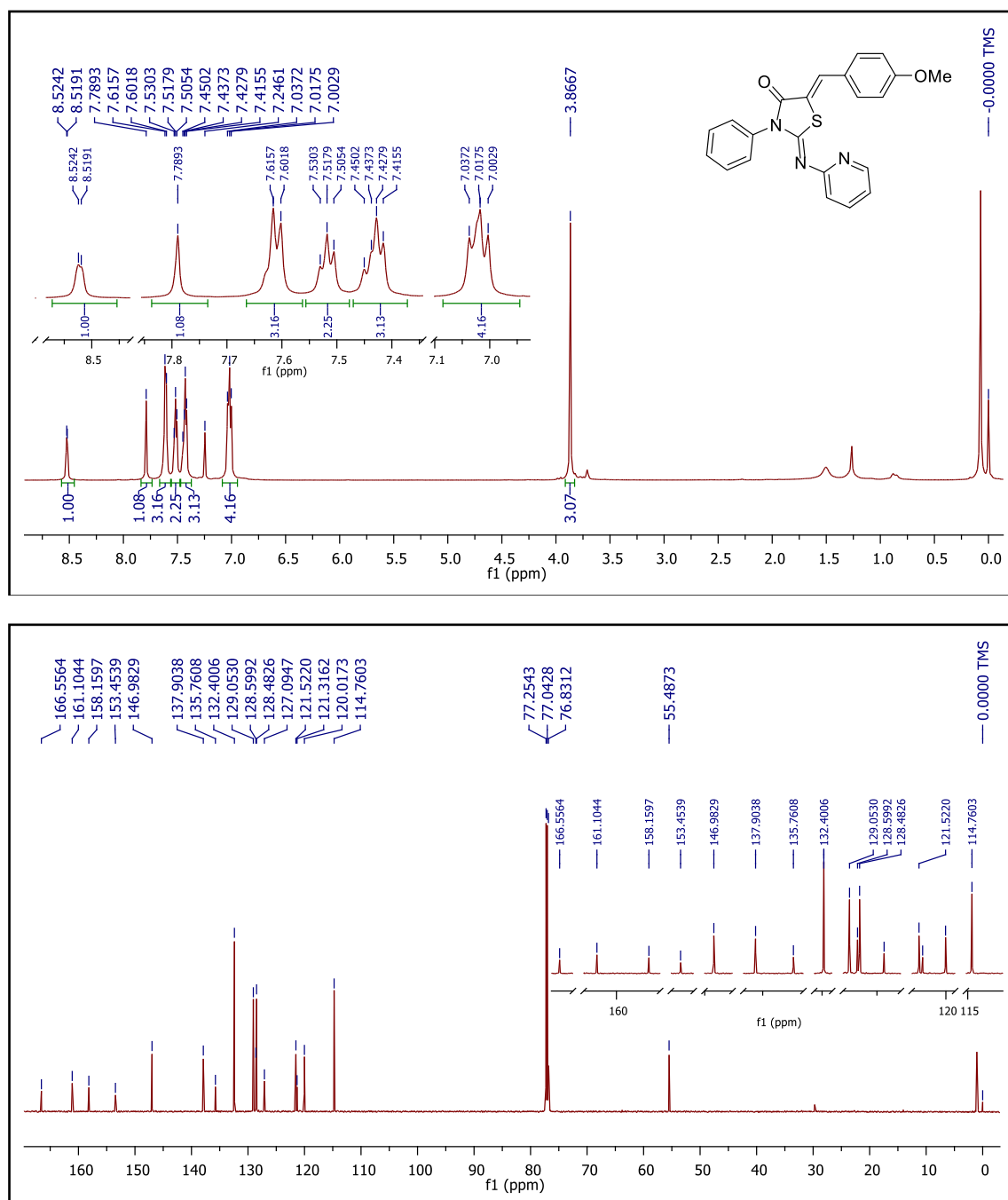


Fig. 14S ^1H (600 MHz, CDCl_3) and ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) NMR spectra of 2-imino-thiazolidin-4-one **5l**.

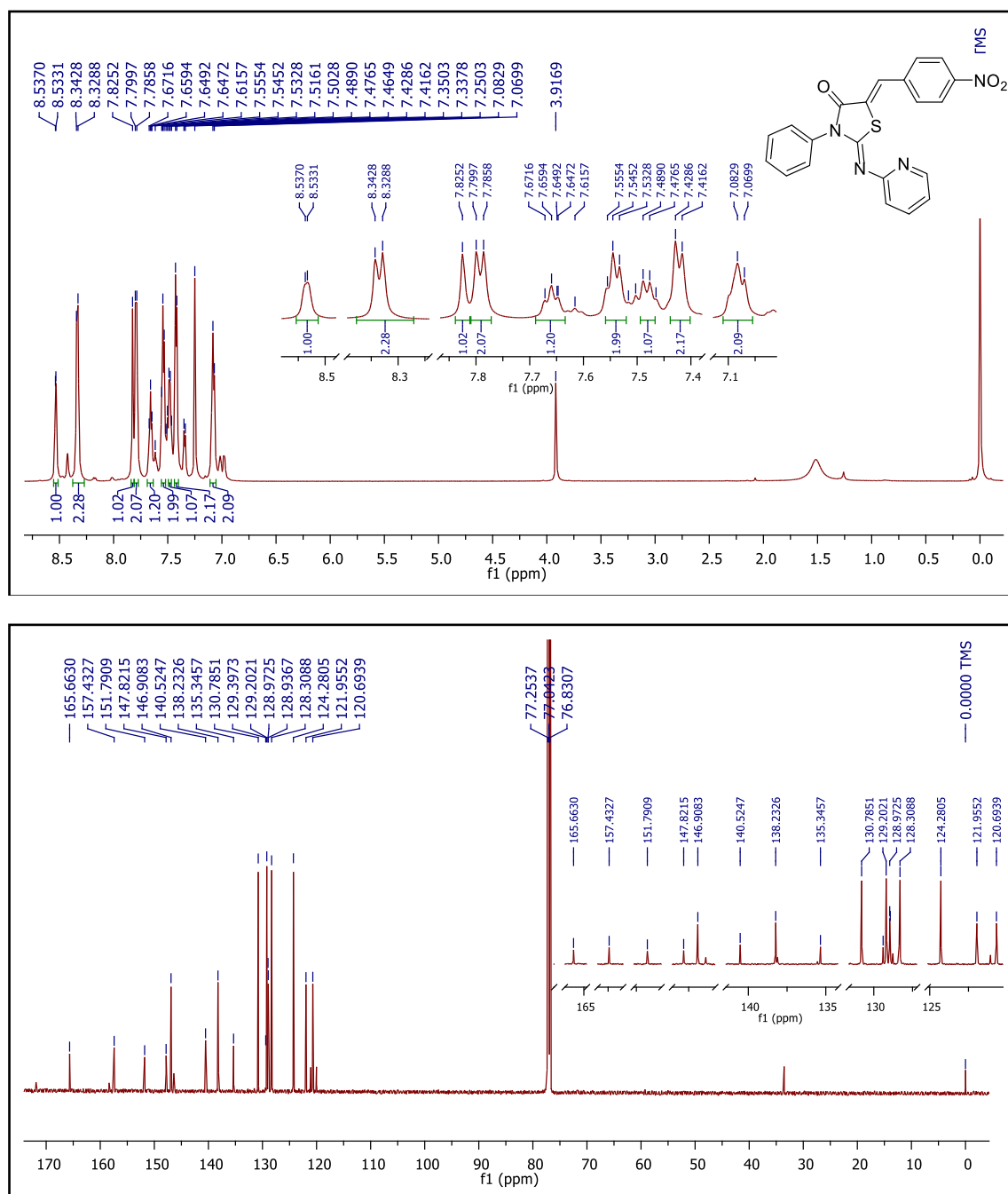


Fig. 15S ¹H (600 MHz, CDCl₃) and ¹³C (150 MHz, CDCl₃) NMR spectra of 2-imino-thiazolidin-4-one **5m**.

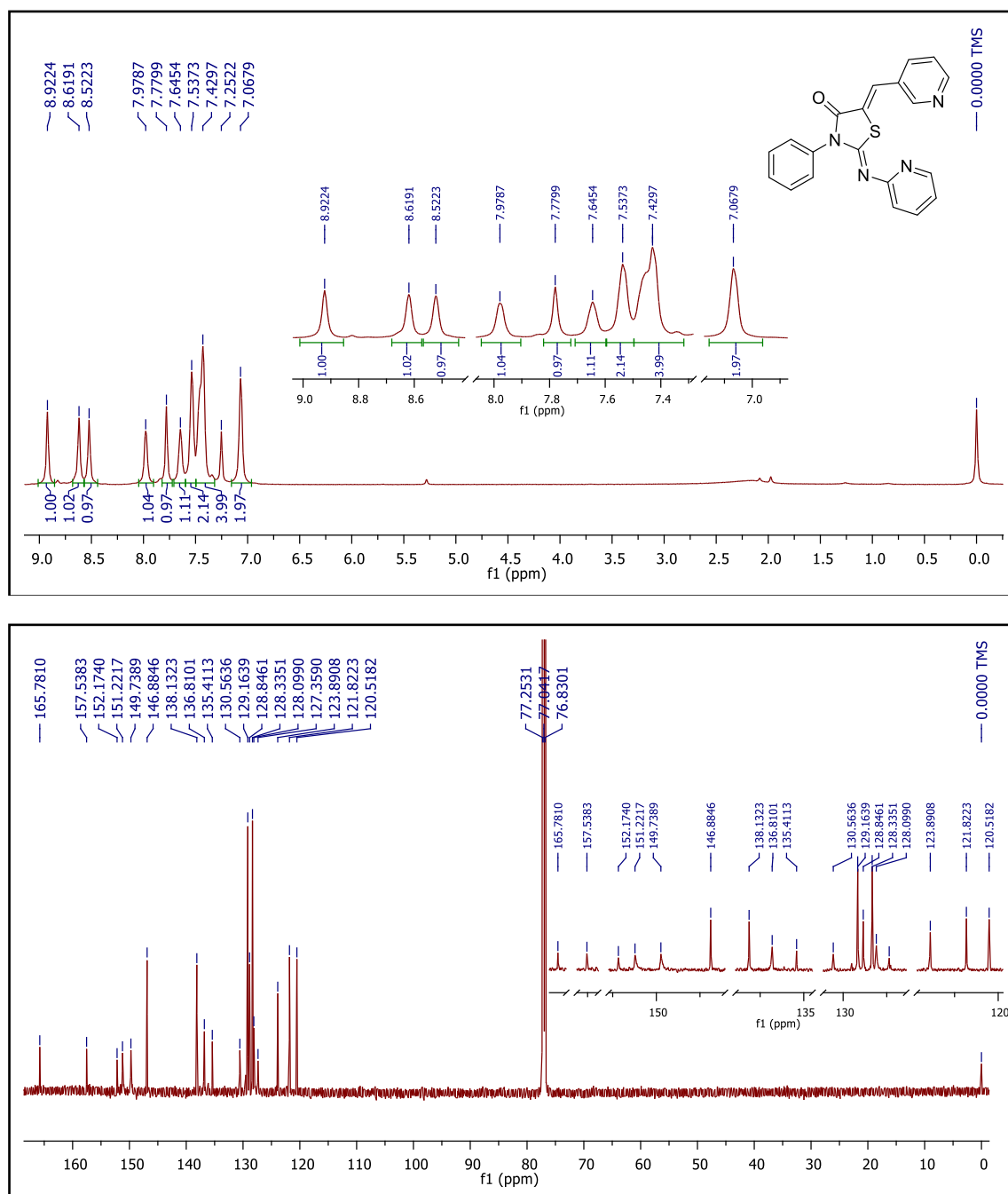
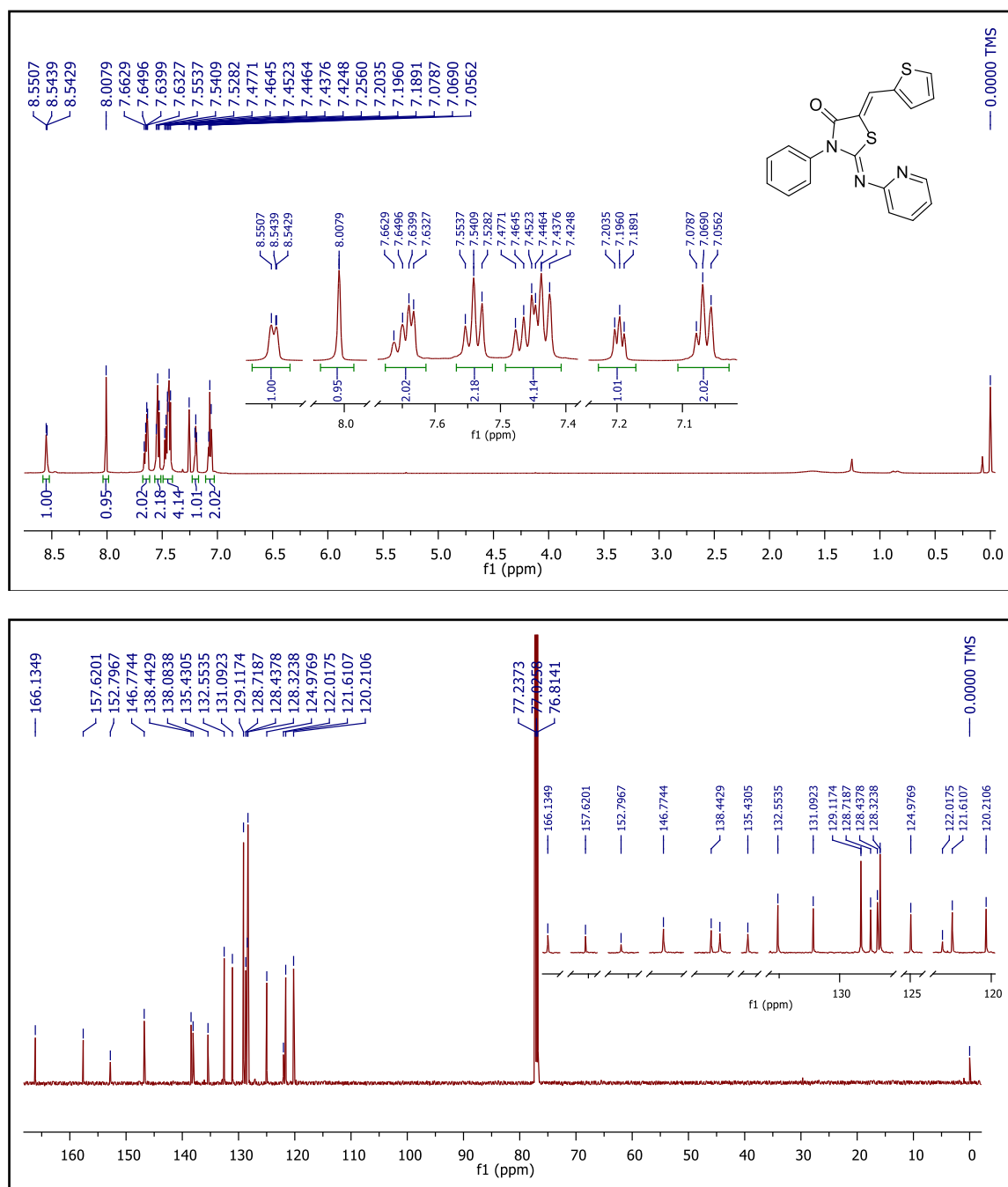
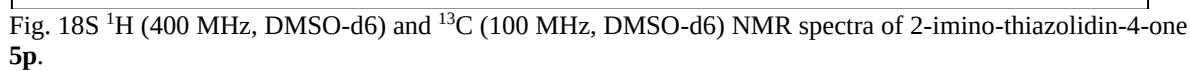


Fig. 16S ^1H (600 MHz, CDCl_3) and ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) NMR spectra of 2-imino-thiazolidin-4-one **5n**.

Fig. 17S ^1H (600 MHz, CDCl_3) and ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) NMR spectra of 2-imino-thiazolidin-4-one **50**.



4.2 MANUSCRITO 2

De: Hari K. Bhat

Enviado:terça-feira, 18 de maio de 2021 03:03

Para: luizrobertocarraro@hotmail.com; amaliaalvs@gmail.com; taisteixeira.r@gmail.com; coanjunior@gmail.com; siqueiragm@gmail.com; wjcunico@yahoo.com.br; cabruning@yahoo.com.br; cbortolatto@gmail.com

Assunto: Journal of Biochemical and Molecular Toxicology - Decision on Manuscript ID JBT-20-352.R2

18-May-2021

Dear Dr Bortolatto,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "3-(pyridin-2-yl)-2-(pyridin-2-ylimino)thiazolidin-4-one as a novel inhibitor of cerebral MAO-B activity with antioxidant properties and low toxicity potential" in its current form for publication in the Journal of Biochemical and Molecular Toxicology. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the bottom of this letter.

Please note although the manuscript is accepted the files will now be checked to ensure that everything is ready for publication, and you may be contacted if final versions of files for publication are required.

Your article cannot be published until the publisher has received the appropriate signed license agreement. Within the next few days, the corresponding author will receive an email from Wiley's Author Services system which will ask them to log in and will present them with the appropriate license for completion.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Professor Hari K. Bhat Ph.D.

Editor in Chief, Journal of Biochemical and Molecular Toxicology

bhath@umkc.edu

P.S. – You can help your research get the attention it deserves! Wiley Editing Services offers professional video abstract and infographic creation to help you promote your research at www.wileyauthors.com/eo/promotion. And, check out Wiley's free Promotion Guide for best-practice recommendations for promoting your work at www.wileyauthors.com/eo/guide.

Reviewer(s) Comments to Authors

Reviewing: 1

Comments to the Author

The author went through another round of revisions as required, the quality of the manuscript has been improved, therefore I agree to accept the manuscript.

Reviewing: 2

Comments to the Author

Authors have addressed the queries raised by reviewer. This revision has improved the quality and may be considered for its acceptance.

3-(pyridin-2-yl)-2-(pyridin-2-ylimino)thiazolidin-4-one as a novel inhibitor of cerebral MAO-B activity with antioxidant properties and low toxicity potential

Running title: PPIT, an antioxidant and MAO-B inhibitor compound

Luiz Roberto Carraro Junior^a, Amália Gonçalves Alves^a, Taís da Silva Teixeira Rech^a, José Coan Campos Júnior^b, Geonir Machado Siqueira^b, Wilson Cunico^b, César Augusto Brüning^{a*}, Cristiani Folharini Bortolatto^{a*}

^aPrograma de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção (PPGBBio), Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM), Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção (PPGBBio), Laboratório de Química Aplicada a Bioativos (LaQuiABio), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

***Address for correspondence**

Cristiani Folharini Bortolatto - Post-Graduation Program in Biochemistry and Bioprospecting (PPGBBio), Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences (CCQFA), Federal University of Pelotas (UFPel), Capão do Leão Campus, Pelotas, RS, 96010-900, Brazil. Phone: 55-53-32757355. Electronic address: cbortolatto@gmail.com

César Augusto Brüning - Post-Graduation Program in Biochemistry and Bioprospecting (PPGBBio), Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences (CCQFA), Federal University of Pelotas (UFPel), Capão do Leão Campus, Pelotas, RS, 96010-900, Brazil. Phone: 55-53-32757355. Electronic address: cabruning@yahoo.com.br

Abstract

Some brain diseases are associated with oxidative stress and altered monoamine oxidase (MAO) activity. The objective of this study was to evaluate the antioxidant and neuroprotective actions of a synthetic molecule containing a thiazolidinone nucleus, the compound 3-(pyridin-2-yl)-2-(pyridine-2-ylimino) thiazolidin-4-one (PPIT), as well as toxicity parameters in Swiss mice. Five *in vitro* assays were carried out in order to verify the antioxidant capacity of the compound: protein carbonylation (PC), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil (DPPH), ferric ion (Fe^{3+}) reducing antioxidant power (FRAP) and superoxide dismutase (SOD)-like activity. The results showed that PPIT reduced the brain levels of PC. Although no SOD mimetic activity was observed, the compound acted as a free radical scavenger (ABTS and DPPH) and exhibited reducing activity in the FRAP assay. In addition, the effects of PPIT on the activity of brain MAO isoforms (MAO-A and B) were investigated *in vitro*. Our data pointed to an inhibition of the MAO-B isoform by PPIT with no effect on MAO-A activity. Lastly, an acute oral toxicity test was conducted. No changes in food intake, body weight, and biochemical markers of kidney and liver damage were detected in mice treated with a high dose of PPIT. In conclusion, the present study demonstrated that PPIT exhibits antioxidant activity and selectively inhibits the MAO-B isoform without causing apparent toxicity. These findings suggest PPIT as a potential therapeutic candidate to be tested in preclinical models of brain diseases involving perturbations of MAO-B activity and redox status.

Keywords: Thiazolidinones; PPIT; Oxidative stress; Brain; Monoamine oxidase.

1. Introduction

It is known that an extended life expectancy around the world has increased the prevalence of several diseases including the neuropsychiatric disorders of aging. Neuropsychiatric diseases are characterized by progressive degeneration and death of neurons due to many factors, including genetic, environmental, and metabolism factors.^[1] The development of neuropsychiatric diseases has been long associated with oxidative stress (OS), which happens when an excessive formation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) overcome the biological antioxidant mechanisms.

ROS and RNS result from the redox process of cells.^[2] The development of neurological disorders is especially associated with oxidative damage, due to the brain susceptibility to high oxygen consumption and low antioxidant defense.^[3] The process of mitochondrial production of H_2O_2 is the role played by enzymes that are present in the mitochondrial membrane, such as monoamine oxidases (MAO), which uses O_2 as an electron acceptor and forms H_2O_2 as a product. Research has shown these enzymes are used as sources of mitochondrial ROS, which are related to oxidative stress.^[4, 5]

MAO are enzymes that require flavin adenine dinucleotide (FAD) to execute their function properly. These enzymes are located on the outside of the mitochondrial membrane and have the function of deaminating biogenic amines. The enzyme has two forms with more than 70% homogeneity, and these two forms can be differentiated by their substrates, which are mainly amines or neurotransmitters. The MAO-A shows an affinity for noradrenaline (NA) and serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT), while MAO-B shows an affinity for benzylamine and beta-phenylethylamine (PEA), the amines dopamine (DA) and tyramine show similar affinity for each enzyme form.^[6] These enzymes are closely related to a fundamental

physiological role in the regulation of the nervous system and the development of neuropsychiatric disorders.^[7]

MAO-B has been implicated in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) and other neurodegenerative disorders.^[8] Dementia due to AD is described by a loss of cognitive function, loss of memory, difficulties in organizing or reasoning that interfere with daily activities.^[9] AD is characterized mainly by the accumulation of plaques containing amyloid β ($A\beta$) peptides and intraneuronal neurofibrillary tangles containing tau in the brain.^[10] Existing therapies for involution of the disease are effective, but still have serious side effects when administered with other medications and with interactions with certain foods.^[11] In addition, MAO-B inhibitors improve the DA deficient state and may have neuroprotective properties in patients with Parkinson's disease (PD),^[12] a neurodegenerative disorder that affects predominately dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc) causing motor disturbances.

Compounds with a 2-imino-thiazolidin-4-one scaffold have attracted much attention over the years, due to wide broad-spectrum pharmacological properties such as anti-microbial,^[13] anti-malarial,^[14] anti-HIV,^[15] anti-inflammatory,^[16] antioxidant,^[17] and MAO-A and MAO-B inhibitory activities.^[18] Besides, compounds containing a pyridyl structure are well known to possess a wide range of biological and pharmacological activities.^[19-21] Therefore, 3-(pyridin-2-yl)-2-(pyridine-2-ylimino)thiazolidin-4-one (PPIT) was designed by a molecular hybridization strategy linking the 2-imino-thiazolidin-4-one and the pyridine scaffolds. This study investigated the antioxidant action of PPIT as well as its potential to inhibit the cerebral activity of MAO isoforms *in vitro*. Additionally, the oral acute toxicity of PPIT was evaluated in mice.

2. Materials and methods

2.1 Animals

Male and female Swiss mice (25-35 g, 45-day-old) were used. They were obtained from a local breeding colony (Central Biotherium of the Federal University of Pelotas, UFPel). Animals were kept in a separate animal room, in controlled conditions with a constant temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and a 12h light/dark cycle (with the light turned on at 6:00 a.m.) with free access to water and food. The studies were performed following protocols approved by the Ethical Committee on Animal experimentation of the UFPel, Brazil (51340-2019), affiliated to the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and according to the National Institutes of Health Guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

2.2 Reagents

PPIT (Fig.1) was synthesized using a molecular hybridization strategy linking 2-imino-thiazolidin-4-one and pyridine scaffold according to the general procedure described by Isikgor, et al.^[22] Dimethyl sulfoxide (DMSO), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH), 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 1,2,3-benzenetriol (pyrogallol), sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4), potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4), potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), methanol (CH_3OH), 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol hydrochloride (Tris-HCl), potassium chloride (KCl), potassium phosphate buffer (TFK), sodium phosphate buffer, ascorbic acid (AA), isoflurane, pargyline, clorgilline, quinuramine, sodium hydroxide (NaOH), hydrochloric acid (HCl), dinitrophenyl hydrazine (DNPH), sodium nitroprusside (SNP), sodium acetate (CH_3COONa), triazine and iron chloride (FeCl_3) were purchased from Sigma-Aldrich (Merck) or from other standard commercial suppliers. Determination of

the range of PPIT concentrations was based on the previous group experience, *i.e.*, those concentrations usually employed in our research laboratory.

2.2.1 3-(pyridin-2-yl)-2-(pyridine-2-ylimino)thiazolidin-4-one (PPIT) characterization

C₁₃H₁₀N₄OS; Yield: 0.59 g (44%); mp: 208–210 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.71 (dd, *J* = 2.2, 5.0 Hz, 1H, H-31), 8.43 (dd, *J* = 2.2, 5.2 Hz, 1H, H-21), 7.92 (td, *J* = 1.9, 7.7 Hz, 1H, H-33), 7.61 (td, *J* = 2.0, 7.7 Hz, 1H, H-23), 7.44–7.42 (m, 1H, H-32), 7.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-34), 7.05–7.00 (m, 1H, H-22), 6.96 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-24), 3.95 (s, 2H, H-5) ppm; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 171.8 (C-4), 158.6, 157.8, 150.0, 148.9, 145.9, 138.7, 138.7, 124.4, 124.2, 121.1, 120.2, 34.0 (C-5) ppm; EIMS (70 eV) *m/z* (relative intensity %): 270 [M]⁺ (13), 228 (94), 197 (13), 170 (20), 134 (22), 78 (100), 51 (35).

2.3 Protein carbonylation assay

This *in vitro* experiment was modified from Levine, et al.,^[23] which consists of causing oxidative damage in the proteins of the tissue to be analyzed to determine if the compound can reverse the damage caused. The mice were euthanized with inhaled isoflurane and their brains were removed and stored in a freezer kept at -80 °C until the time of preparing the homogenate. Brain homogenates were prepared with 50 mM pH 7.4 Tris-HCl buffer, 1:10 (weight/volume), and subsequently diluted 1:8. In different test tubes, the compound was added to be tested at 200 and 500 μM. Then the homogenate was added to all tubes and afterwards SNP, used as an inductor. Take immediately to the incubation at 37°C for 2 hours. After this period, the HCl 2 M was added to the blank tubes and DNPH solution to the tested ones, letting it to stand for 1 hour in the dark and stirring every 15 minutes, to facilitate the reaction. Then, 500 μl of denaturation buffer, 1.5 ml of ethanol, 1.5 ml of hexane were added to all tubes, and then they were shaken for 40 seconds. Next, tubes

were centrifuged for 15 minutes, the supernatant was carefully removed. The pellet formed in the tube was washed twice with 1ml of ethanol/ethyl acetate solution (1:1). Allow drying for 2 minutes, resuspended the pellet with 1 ml of denaturing buffer, and read on a spectrophotometer (model V-M5, Shanghai Metash Instruments Co. Ltd., China) at 370 nm. Each experiment was repeated four times and performed in duplicate. The results were expressed as nmol carbonyl/g of tissue.

2.4 ABTS radical scavenger activity

Adapted from Re, et al.,^[24] this *in vitro* experiment consists of evaluating the possibility of reducing the oxidized form of the synthetic radical ABTS (42 μ M). The compound PPIT to be tested (1-100 μ M) or AA (positive control) was added in distinct test tubes. Then, the synthetic radical was added in all tubes and incubated in the absence of light at 25°C for 30 minutes. The absorbance reading was performed on the spectrophotometer at 734 nm. Each experiment was repeated three times and performed in duplicate. The results were calculated as the percentage of scavenged radical using the blank tube reading value as 100% and were expressed as a percentage of the blank.

2.5 DPPH radical scavenger activity

This *in vitro* assay was modified from Sharma and Bhat,^[25] to verify the ability to reduce the oxidized form of the DPPH synthetic radical (50 μ M). In different tubes, it was added AA as a positive control or the compound PPIT to be evaluated, both at concentrations ranging from 1 to 100 μ M. Then, the synthetic radical solution was pipetted into all tubes and the solution incubated for 30 minutes in the dark at 25°C. The reduction in absorbance was read at 517 nm in a spectrophotometer. Each experiment was repeated three times and performed in duplicate. The results were calculated as the percentage of scavenged radical using the blank tube reading value as 100% and were expressed as a percentage of the blank.

2.6 Ferric ion (Fe^{3+}) reducing antioxidant power (FRAP)

This assay, based on Yoshino and Murakami,^[26] measures the compound's ability to reduce the ion $[\text{Fe}^{3+}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ to $[\text{Fe}^{2+}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$. When this occurs, in the presence of triazine, there is the formation of a colored complex, enabling reading on a spectrophotometer. The FRAP reagent was prepared by mixing 38 mM anhydrous sodium acetate in distilled water (pH 3.8), 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in distilled water, and 10 mM TPTZ in 40 mM HCl in proportions of 10:1:1. This reagent was freshly prepared before each experiment. The compound PPIT (50-500 μM) and AA (25 μM , a positive control) were incubated with FRAP solution at 37°C in the dark for 40 minutes. Each experiment was repeated three times and performed in duplicate. The absorbance was read at 593 nm.

2.7 Superoxide anion radical-scavenging activity (SOD-like activity)

This protocol was based on Marklund and Marklund,^[27] whose objective is to measure the antioxidant activity of the compound, through its ability to inhibit the pyrogallol self-oxidation which is catalyzed by the superoxide radical.

PPIT (25-500 μM) or AA (10-200 μM , a positive control) was added in tubes containing tris-HCl buffer (pH 8.5). Except for the blank, pyrogallol was added on all tubes. The absorbance of the solution was measured kinetically, at the same time that pyrogallol was added to the mixture, at 420 nm for 2 minutes, observing its absorbance values every 15 seconds. Each experiment was repeated three times and performed in duplicate.

2.8 Cerebral Monoamine Oxidase (MAO) activity

Brain tissue was prepared as described by Soto-Otero, et al.,^[28] to obtain a fraction rich in mitochondria. The brain of the mice was prepared in the homogenization buffer in a proportion of 1:4 (weight/volume) and subjected to

centrifugation ($900\times g$). The supernatant was centrifuged again ($12,50\times g$), and the pellet formed was resuspended with a homogenization buffer. A new fraction was centrifuged ($12,500\times g$) and resuspended in the assay buffer, forming a fraction rich in mitochondria to be used in the experiment.

MAO activity was determined as described by Krajl ^[29] with some modifications of Matsumoto et al.^[30] The oxidation of a substrate (quinuramine) by the isoforms MAO-A and MAO-B results in the formation of 4-hydroxyquinoline, a fluorescent product. Enzymatic inhibition is determined by reducing the fluorescence. Initially, the samples were incubated at 37°C for five minutes with either pargyline, a MAO-B selective inhibitor, or clorgyline, a MAO-A selective inhibitor.^[31] After this process, the compound PPIT was added and there was an incubation for ten minutes at 37°C. The compound PPIT was diluted in DMSO and used at concentrations of 10-500 μM . The control tube received DMSO.

After compound incubation, the substrate quinuramine was added and incubated for thirty minutes at 37°C. After, the reaction was stopped with 10% trichloroacetic acid and subsequently centrifuged for five minutes at $16,000\times g$ at 4 °C. The supernatant was removed and 1 M sodium hydroxide was added, after which the samples were read on a fluorimeter with the excitation parameters corresponding to 315 nm and 380 nm emission. Each experiment was repeated four times and performed in duplicate. The results were calculated as the percentage of MAO inhibition by a direct rule of three considering the tube reading value without the inhibitor as 100% enzyme activity. Results were expressed as nmol of 4-OH quinoline/mg protein/minute.

2.9 Oral acute toxicity assessment

The evaluation of toxicity after a single oral administration of PPIT was performed in female Swiss mice, following protocol 423 of the Organization for Economic Cooperation and Development.^[32] In this experiment, PPIT was administered at a dose of 300 mg/kg by intragastric route (i.g.). Control animals received canola oil (vehicle, 10 ml/kg). The animals were monitored during the 14 days, with food control, where they were periodically weighed and evaluated for behavioral changes, such as lethargy, piloerection, and diarrhea, to define whether the administration of a high dose PPIT would be able to change these parameters. After 14 days, the animals were subjected to the open field test (OFT), according to Walsh and Cummins,^[33] to assess whether there were any locomotor changes, and then euthanized with isoflurane. Heparinized blood was collected by cardiac puncture.

Blood samples were centrifuged for 10 minutes at 700x *g* and the plasma obtained was used to determine the activity of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and levels of urea which were performed in duplicate. ALT and AST measurements were performed using a Labtest kit. The urea levels were evaluated using a Bioclin kit.

2.10 Statistical Analyses

All experiments are presented as the mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.). The statistical analyses were performed in GraphPad Prism v.8.0.2 software. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls *post hoc* test or unpaired t-test was employed when appropriated. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. The IC₅₀ value was calculated only when more than 50 % of inhibition was reached.

3. Results

3.1 Protein carbonylation assay

Statistical analysis demonstrated significant effects on protein carbonylation content [$F_{(3,12)}=12.30$; $p=0.0006$]. SNP increased the levels of protein carbonylation in brain homogenate when compared with the control group. PPIT at a concentration of 500 μM was effective in reducing the amount of carbonylated protein in cerebral tissue as compared with SNP group (Fig. 2).

3.2 ABTS radical-scavenging activity

The compound PPIT significantly demonstrated ABTS radical-scavenging activity at concentrations greater than or equal to 5 μM [$F_{(6,14)}=250$; $p<0.0001$] (Fig. 3A). The positive control AA showed significant effects at the same concentrations [$F_{(6,14)}=95.09$; $p<0.0001$] (Fig. 3B).

3.3 DPPH radical-scavenging activity

The compound PPIT demonstrated DPPH radical-scavenging activity at concentrations greater than or equal to 25 μM [$F_{(6,14)}=46.82$; $p<0.0001$] (Fig. 3C). AA, a positive control, showed DPPH radical-scavenging activity at the same concentrations [$F_{(6,14)}=22.10$; $p<0.0001$] (Fig. 3D).

3.4 Ferric reducing ability

The reduction capacity of the iron ion is related to the antioxidant capacity of a substance in the FRAP assay. The compound PPIT was effective in reducing the ion at concentrations greater than or equal to 200 μM [$F_{(4,15)}=38.78$; $p<0.0001$] (Fig. 4). The positive control AA (25 μM) was able to reduce the iron ion [$t=12.99$ $df=6$; $p<0.0001$].

3.5 Superoxide anion radical-scavenging activity (SOD-like activity)

This assay evaluates the antioxidant effect of the compound through inhibition of pyrogallol autoxidation and it was observed that PPIT did not inhibit the pyrogallol autoxidation at all tested concentrations [$F_{(6,14)}=0.1279$; $p>0.10$] (Fig. 5A). On the other hand, the positive control AA inhibited pyrogallol autoxidation at a concentration of 200 μM [$F_{(6,14)}= 2.14$; $p<0.0001$] (Fig. 5B).

3.6 Cerebral MAO activity

This test was carried out to investigate the ability of the PPIT to inhibit the isoforms of the cerebral MAO enzyme (MAO-A and MAO-B). The compound, in none of the tested concentrations, was efficient in inhibiting the activity of the MAO-A isoform (Fig. 6A). On the other hand, PPIT was able to inhibit the activity of the MAO-B isoform in concentrations equal to or greater than 200 μM [$F_{(5,15)}=9.29$; $p=0.0006$] (Fig. 6B).

3.7 Acute oral toxicity assessment

We can observe that there was no variation in the food intake between PPIT-treated animals and control group (Fig. 7A). The body weight of the animals also remained without significant variations between the groups (Fig. 7B). In the OFT, performed just before euthanasia, the animals did not exhibit any locomotor impairments (Fig. 7C and D). The activity of the AST and ALT enzymes, as well as the levels of urea present in the plasma of mice, are shown in Fig. 7E, F, and G, respectively. With the results obtained, we can notice that a high dose of the compound did not alter the activity of any of the analyzed enzymes as well as the levels of urea.

4. Discussion

Neurodegenerative disorders such as AD and PD normally involve neurotoxic aggregation of certain proteins in the brain which is related to ROS production, oxidative stress,^[34] excitotoxic events, and alterations of membrane permeability.^[35] Multi-target neuroprotective drugs based on antioxidant efficacy and MAO-B activity inhibition have been studied for these conditions.^[36] In the present study, we demonstrated, for the first time, the antioxidant effect of PPIT using the ABTS, DPPH, FRAP, and PC assays. We also demonstrated its ability to inhibit the cerebral activity of the MAO-B isoform. Moreover, the results revealed PPIT did not cause systemic toxicity in mice.

Antioxidants are substances that can prevent or slow damage to cells caused by free radicals. Here, to detecting the possible antioxidant effects of PPIT, a battery of *in vitro* assays was employed. Currently, methods directed to the antioxidant evaluation are mainly based on spectrophotometric determinations using hydrogen atom transfer (HAT) and single electron transfer (SET) mechanisms such as ABTS, DPPH, and FRAP,^[37] assays. The ABTS radical is a protonated and stable free radical that is frequently used to estimate the total antioxidant capacity of several substances. ^[19, 38] Our results demonstrated that PPIT presented scavenger activity of ABTS radicals at concentrations equal to or greater than 5 μ M. It is important to note results with PPIT exhibited statistical levels of significance similar to the positive control (ascorbic acid). Thus, a sequestering activity of radicals could represent one of the mechanisms by which PPIT exerts its antioxidant action. In these sense, PPIT is a pyridine derivative and, in consequence, the nitrogen atom, present in each of the pyridine rings that exist in its molecular structure, seems to be important for the proton radical scavenging activity.^[20]

In addition to ABTS, DPPH is a simple test for antioxidant screening that dispenses with the use of biological tissue. In comparison with the radicals present in nature, DPPH is highly stable and has a low cost, which makes it viable for practical and analytical applications.^[39] In this study, PPIT elicited DPPH scavenger activity at concentrations equal to or greater than 25 μ M suggesting this compound is capable of donating hydrogen to a free radical by removing its free electron.^[19] Although statistical significance have been reached for PPIT and ascorbic acid when tested at the same concentrations, PPIT presented a poorer radical scavenging activity. Different effects of PPIT on DPPH and ABTS assays can be due to the different chemical structures of these two synthetic radicals. Moreover, it could be explained by their structure having, at the same time, free-electron pairs from the pyridinic clusters and long resonance chain capable of losing an electron and stabilizing itself. Luchese, et al.^[19] and Peglow, et al.,^[20] evidenced similar behavior in antioxidant compounds with pyridinic groups.

PPIT was also tested by FRAP assay which measures the ability of the compound to reduce the Fe^{3+} to Fe^{2+} .^[40] PPIT exhibited ferric reducing antioxidant power, although in higher concentrations than those observed for the ABTS and DPPH assays. In fact, reports demonstrate that reducing ability can be strongly related to antioxidant activity.^[41] This result reinforces the hypothesis of antioxidant potential PPIT as a result of electron transfer. Fe^{3+} can react with peroxides to form radicals.^[42] Some areas of the brain have high levels of iron and are very susceptible to Fenton reactions. ^[43] In this regard, the ferric-reducing ability of PPIT could possibly represent a neuroprotective strategy against Fenton chemistry in the brain.

The effectiveness of PPIT act as a superoxide radical (O_2^-) scavenger was also investigated *in vitro*. SOD is an antioxidant enzyme that catalyzes the dismutation of O_2^- into O_2 and H_2O_2 , and the final product of this process, H_2O_2 , is less reactive and

prevents the generation of highly reactive $\text{OH}^\bullet$ radicals.^[44, 45] The ability of PPIT to inhibit pyrogallol self-oxidation catalyzed by the O_2^- was measured by a non-enzymatic test named SOD-like activity assay which simulates a reaction similar to that predominant in cells. However, our data showed that the compound has no antioxidant activity mediated by a SOD mimetic mechanism, *i.e.*, O_2^- scavenger activity is not the mechanism PPIT works by. Among some limitations of the present study is the lack of tests for detecting the $\text{OH}^\bullet$ and H_2O_2 scavenging activities of PPIT, a perspective for future studies. Besides, although ABTS, DDPH and FRAP do not provide a complete elucidation of the PPIT antioxidant activity, they are initial trials and guide us for the continuation of the study.

Additionally, we sought to know whether PPIT could protect the brain tissue against the SNP-induced oxidative damage given that the oxidative stress in biological systems is a complex process. It has been reported that impaired protein function, manifested as an increase in protein carbonyl, plays a crucial role in aging.^[46] Protein carbonylation is recognized as an absolute marker of oxidative stress and related to several human disorders.^[47] Carbonyl groups are inserted into proteins by an oxidative (direct) or non-oxidative mechanism (indirect).^[48] By directly inserting these groups into proteins, the reaction with DNPH^[23] was employed to assess the antioxidant effect of PPIT *in vitro*. Our results demonstrated a neuroprotective action of PPIT against the generation of cerebral carbonylated proteins which can be related to its radical scavenger and reducing activities. Unfortunately, the testing of a wider range of concentrations was hampered by the low solubility of PPIT in the different tests, which did not allow us to access the IC_{50} values.

MAO is a mitochondrial enzyme responsible for the oxidative deamination of exogenous amines and neurotransmitters in mammalian tissues. The isoforms, called MAO-A and MAO-B, catalyze these reactions by reducing the FAD cofactor.^[49] The action of MAO-A inhibitors characterizes a clinical antidepressant action, while the action of MAO-B inhibitors characterizes the antiparkinsonian action.^[50] Some neurodegenerative diseases are related to the increased expression of the MAO-B isoform,^[34] justifying the importance of studies with compounds that have the characteristic of inhibiting it. Our study showed that PPIT did not have the capacity to inhibit the MAO-A isoform. However, PPIT had a significant effectiveness as a MAO-B inhibitor. More studies on the structure of PPIT is needed to clarify if its MAO-B inhibitory potential can be optimized.

MAO isoforms have been the focus of several studies as a treatment for the main depressive disorders, anxiety, and neurodegenerative diseases, such as PD and AD.^[51] When properly functioning, MAO deamination generates H_2O_2 , ammonium cation (NH_4^+), and aldehydes as by-products. The generation of H_2O_2 is known to be directly related to the production of ROS, which can lead to cell death and apoptosis. Therefore, the increase in the expression of the MAO enzyme is related to its toxicity to the organism and can be prevented by the action of specific inhibitors.^[52] In this way, the inhibitory effects of PPIT on MAO-B activity could play indirect antioxidative and neuroprotective effects. Thus, we suggest PPIT as a potential candidate to be tested in animal models of neurodegenerative diseases involving cerebral oxidative stress and monoamine dysfunctions.

Considering that this is the first study directed toward studying the biological activities of PPIT, its toxicology is an important point to be investigated. Our data also demonstrate that mice exposed to a high dose of the compound presented their renal and hepatic functions preserved given that AST and ALT activities and urea levels

remained unaltered. The high dose of the PPIT also did not alter the locomotor ability of the animals, nor did it cause a decrease in body weight or loss of appetite that are some of the signals observed for the toxicity of chemicals. Together, this set of findings suggests low toxicity of PPIT.

In conclusion, our study demonstrated that the PPIT compound has antioxidant and reducing activity according to the ABTS, DPPH, FRAP, and PC tests. It can also selectively inhibit the MAO-B isoform of mouse brain tissue *in vitro*. Based on these data and the apparent absence of toxicity of this compound, the present results encourage future pre-clinical studies to evaluate its possible neuropharmacological activity.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROAP-Finance code 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant numbers 438384/2018-0 and 420386/2018-1) for the financial support. A.G.A. is the beneficiary of a FAPERGS fellowship, T.S.T.R. is the beneficiary of a CAPES fellowship and W.C. is recipient of CNPq fellowship.

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

1. Madhu, S.U., et al., *A systematic review on mechanism of neurodegeneration*. IP Indian Journal of Neurosciences, 2020. **6**: p. 6-13.
2. Nieto, C.I., et al., *Evaluation of the Antioxidant and Neuroprotectant Activities of New Asymmetrical 1,3-Diketones*. Molecules, 2018. **23**(8).
3. Kumar, H., et al., *The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's Disease: convergence and parallelism*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(8): p. 10478-504.
4. Edmondson, D.E., *Hydrogen peroxide produced by mitochondrial monoamine oxidase catalysis: biological implications*. Curr Pharm Des, 2014. **20**(2): p. 155-60.
5. Pizzinat, N., et al., *Reactive oxygen species production by monoamine oxidases in intact cells*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1999. **359**(5): p. 428-31.
6. Finberg, J.P. and J.M. Rabey, *Inhibitors of MAO-A and MAO-B in Psychiatry and Neurology*. Front Pharmacol, 2016. **7**: p. 340.
7. Drozak, J. and M. Kozlowski, *[Monoamine oxidase as a target for drug action]*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2006. **60**: p. 498-515.
8. Borroni, E., et al., *Sembragiline: A Novel, Selective Monoamine Oxidase Type B Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease*. J Pharmacol Exp Ther, 2017. **362**(3): p. 413-423.
9. Tarawneh, R. and D.M. Holtzman, *The clinical problem of symptomatic Alzheimer disease and mild cognitive impairment*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(5): p. a006148.
10. Wang, S., et al., *Is Beta-Amyloid Accumulation a Cause or Consequence of Alzheimer's Disease?* J Alzheimers Parkinsonism Dement, 2016. **1**(2).
11. Riederer, P. and G. Laux, *MAO-inhibitors in Parkinson's Disease*. Exp Neurobiol, 2011. **20**(1): p. 1-17.
12. Dezsai, L. and L. Vecsei, *Monoamine Oxidase B Inhibitors in Parkinson's Disease*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2017. **16**(4): p. 425-439.
13. Metwally, N.H., et al., *Design, synthesis, DNA assessment and molecular docking study of novel 2-(pyridin-2-ylimino)thiazolidin-4-one derivatives as potent antifungal agents*. Bioorg Chem, 2019. **84**: p. 456-467.
14. De Monte, C., et al., *Bioactive compounds of Crocus sativus L. and their semi-synthetic derivatives as promising anti-Helicobacter pylori, anti-malarial and anti-leishmanial agents*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2015. **30**(6): p. 1027-33.
15. Rida, S.M., et al., *Synthesis of some novel substituted purine derivatives as potential anticancer, anti-HIV-1 and antimicrobial agents*. Arch Pharm (Weinheim), 2007. **340**(4): p. 185-94.
16. Ali, Y., et al., *Molecular modeling and synthesis of some new 2-imino-4-thiazolidinone derivatives with promising TNF- α inhibitory activity*. New J. Chem, 2015.
17. Secci, D., et al., *Novel 1,3-thiazolidin-4-one derivatives as promising anti-Candida agents endowed with anti-oxidant and chelating properties*. Eur J Med Chem, 2016. **117**: p. 144-56.
18. Abbas, N., et al., *Symmetrical aryl linked bis-iminothiazolidinones as new chemical entities for the inhibition of monoamine oxidases: Synthesis, in vitro biological evaluation and molecular modelling analysis*. Bioorg Chem, 2017. **70**: p. 17-26.
19. Luchese, C., et al., *2,2'-dipyridyl diselenide is a better antioxidant than other disubstituted diaryl diselenides*. Mol Cell Biochem, 2012. **367**(1-2): p. 153-63.
20. Peglow, T.J., et al., *Preparation of bis(2-pyridyl) diselenide derivatives: Synthesis of selenazolo[5,4-b]pyridines and unsymmetrical diorganyl selenides, and evaluation of antioxidant and anticholinesterasic activities*. Tetrahedron Letters, 2017. **58**: p. 3734-3738.
21. Wichitnithad, W., et al., *Time-dependent slowly-reversible inhibition of monoamine oxidase A by N-substituted 1,2,3,6-tetrahydropyridines*. Bioorg Med Chem, 2011. **19**(24): p. 7482-92.
22. Isikgor, S.H., S. Erol, and I. Dogan, *Axially chiral pyridine compounds: synthesis, chiral separations and determination of protonation dependent barriers to hindered rotation*. Tetrahedron: Asymmetry, 2014: p. 449-456.

23. Levine, R.L., et al., *Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins*. Methods Enzymol, 1990. **186**: p. 464-78.
24. Re, R., et al., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radic Biol Med, 1999. **26**(9-10): p. 1231-7.
25. Sharma, O.P. and T.K. Bhat, *DPPH antioxidant assay revisited*. Food Chemistry, 2009. **113**: p. 1202-1205.
26. Yoshino, M. and K. Murakami, *Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization*. Anal Biochem, 1998. **257**(1): p. 40-4.
27. Marklund, S. and G. Marklund, *Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase*. Eur J Biochem, 1974. **47**(3): p. 469-74.
28. Soto-Otero, R., et al., *Inhibition of brain monoamine oxidase activity by the generation of hydroxyl radicals: potential implications in relation to oxidative stress*. Life Sci, 2001. **69**(8): p. 879-89.
29. Krajil, M., *A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase*. Biochem Pharmacol, 1965. **14**(11): p. 1684-6.
30. Matsumoto, T., et al., *3-(p-hydroxyphenyl)propionic acid as a new fluorogenic reagent for amine oxidase assays*. Anal Biochem, 1984. **138**(1): p. 133-6.
31. Murphy, D.L., et al., *Selectivity of clorgyline and pargyline as inhibitors of monoamine oxidases A and B in vivo in man*. Psychopharmacology (Berl), 1979. **62**(2): p. 129-32.
32. OECD, O.f.E.C.a.D., *OECD guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method Test No. 423*. 2001: p. 1-14.
33. Walsh, R.N. and R.A. Cummins, *The Open-Field Test: a critical review*. Psychol Bull, 1976. **83**(3): p. 482-504.
34. Li, J., et al., *Oxidative stress and neurodegenerative disorders*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(12): p. 24438-75.
35. Salim, S., *Oxidative Stress and the Central Nervous System*. J Pharmacol Exp Ther, 2017. **360**(1): p. 201-205.
36. Gulcan, H.O. and I.E. Orhan, *The Main Targets Involved in Neuroprotection for the Treatment of Alzheimer's Disease and Parkinson Disease*. Curr Pharm Des, 2020. **26**(4): p. 509-516.
37. Sirivibulkovit, K., S. Nouanthavong, and Y. Sameenoi, *Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis*. Anal Sci, 2018. **34**(7): p. 795-800.
38. Dong, J.W., et al., *Re-evaluation of ABTS*+ Assay for Total Antioxidant Capacity of Natural Products*. Nat Prod Commun, 2015. **10**(12): p. 2169-72.
39. Yeo, J. and F. Shahidi, *Critical Re-Evaluation of DPPH assay: Presence of Pigments Affects the Results*. J Agric Food Chem, 2019. **67**(26): p. 7526-7529.
40. Benzie, I.F. and J.J. Strain, *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay*. Anal Biochem, 1996. **239**(1): p. 70-6.
41. Nobre, P.C., et al., *Organochalcogen compounds from glycerol: synthesis of new antioxidants*. Bioorg Med Chem, 2014. **22**(21): p. 6242-9.
42. Victoria, F.N., et al., *Antioxidant and antidepressant-like activities of semi-synthetic alpha-phenylseleno citronella*. Eur J Pharmacol, 2014. **742**: p. 131-8.
43. Gerlach, M., et al., *Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases?* J Neurochem, 1994. **63**(3): p. 793-807.
44. Bresciani, G., I.B. da Cruz, and J. Gonzalez-Gallego, *Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation*. Adv Clin Chem, 2015. **68**: p. 87-130.
45. Lim, S.I., et al., *Antioxidant Activity and Ginsenoside Pattern of Fermented White Ginseng*. Journal of Ginseng Research 2010. **34**: p. 168-174.
46. Cabiscol, E., J. Tamarit, and J. Ros, *Protein carbonylation: proteomics, specificity and relevance to aging*. Mass Spectrom Rev, 2014. **33**(1): p. 21-48.
47. Fedorova, M., R.C. Bollineni, and R. Hoffmann, *Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies*. Mass Spectrom Rev, 2014. **33**(2): p. 79-97.

48. Hecker, M. and A.H. Wagner, *Role of protein carbonylation in diabetes*. J Inherit Metab Dis, 2018. **41**(1): p. 29-38.
49. Sampaio, T.B., et al., *4-Organoseleno-Isoquinolines Selectively and Reversibly Inhibit the Cerebral Monoamine Oxidase B Activity*. J Mol Neurosci, 2016. **59**(1): p. 135-45.
50. Finberg, J.P., *Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release*. Pharmacol Ther, 2014. **143**(2): p. 133-52.
51. Carradori, S., et al., *Selective MAO-B inhibitors: a lesson from natural products*. Mol Divers, 2014. **18**(1): p. 219-43.
52. Edmondson, D.E. and C. Binda, *Monoamine Oxidases*. Subcell Biochem, 2018. **87**: p. 117-139.

Figures with Legends

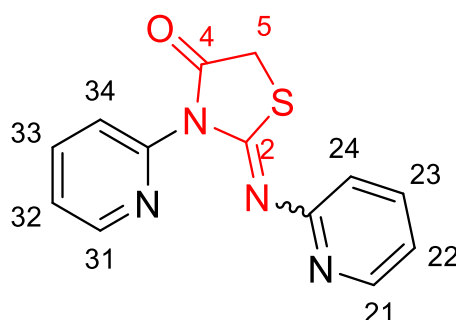


Fig 1. Chemical structure of 3-(pyridin-2-yl)-2-(pyridine-2-ylimino)thiazolidin-4-one (PPIT).

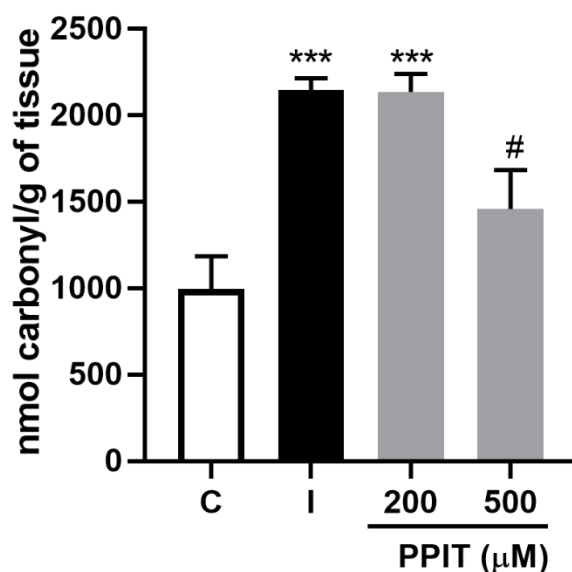


Fig 2. Effect of the PPIT on the protein carbonylation assay. The data represent the mean $\pm$ S.E.M. of four independent experiments performed in duplicate. (***) $p < 0.0001$ compared to control (C) and (#) $p < 0.05$ compared with the induced (I) group. One-way ANOVA/Newman-Keuls.

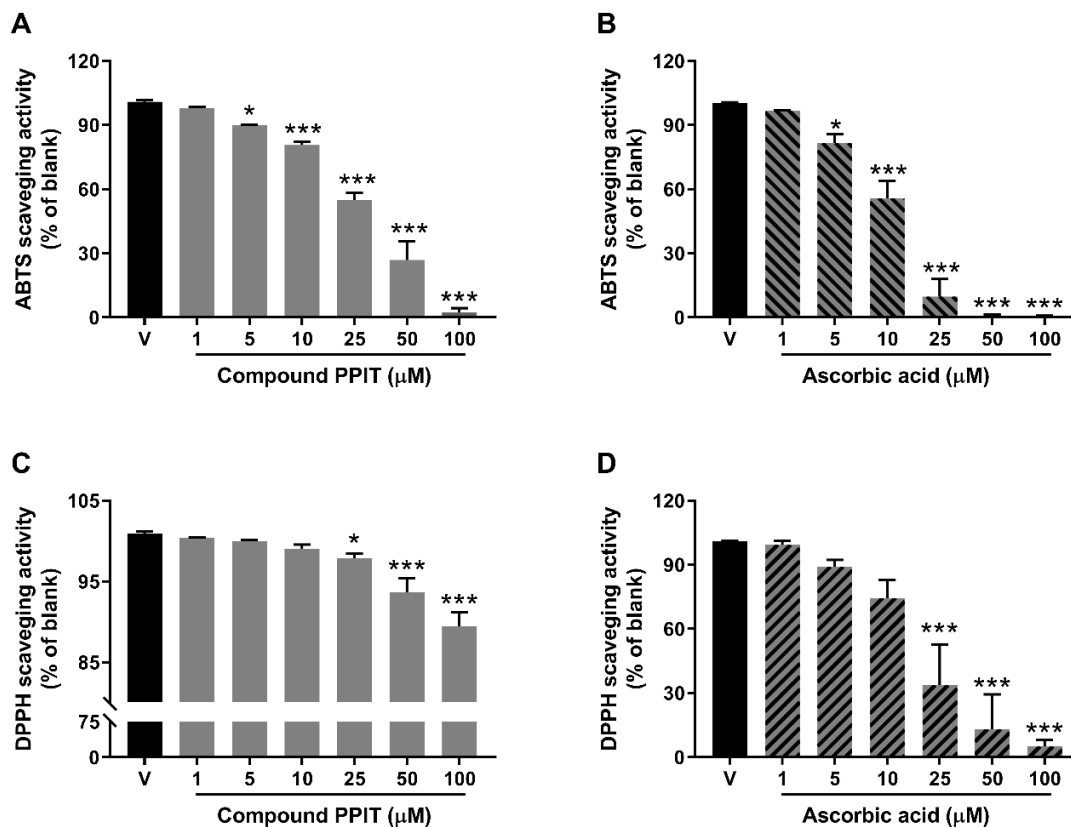


Fig 3. Effect of the PPIT on ABTS (A) and DPPH (C) radical capture assays. Ascorbic acid (AA) was used as a positive control (B and D). The data represent the mean $\pm$ S.E.M. from three independent experiments performed in duplicate. Results are expressed as percentage of control. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.001$ and (***) $p < 0.0001$ when compared with the vehicle (V) group. One-way ANOVA/Newman-Keuls.

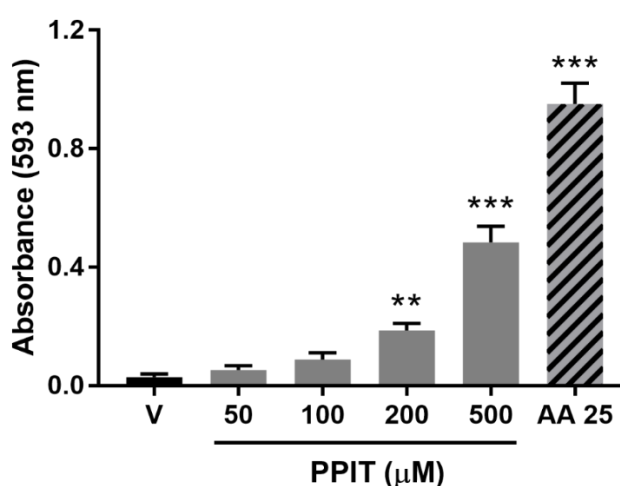


Fig 4. Effect of the PPIT on the FRAP assay. Ascorbic acid (AA) was used as a positive control. The data represent the mean $\pm$ S.E.M. from three independent experiments performed in duplicate. (**) $p < 0.001$ and (***) $p < 0.0001$ when compared with the vehicle (V). One-way ANOVA/Newman-Keuls for PPIT or unpaired-t test for AA.

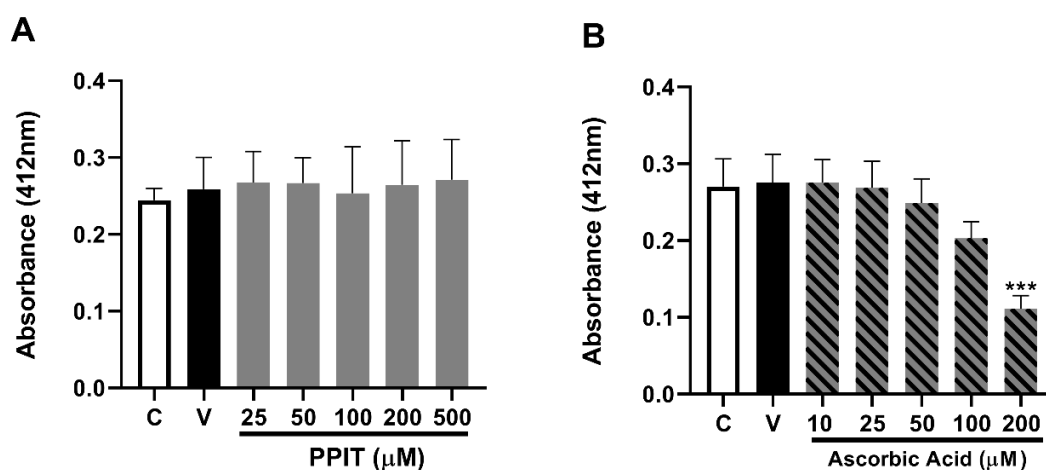


Fig 5. Effect of the PPIT on the SOD-like assay. Ascorbic acid (AA) was used as a positive control. The data represent the mean $\pm$ S.E.M. from three independent experiments performed in duplicate. (***) $p < 0.0001$ when compared with the vehicle (V) group. One-way ANOVA/Newman-Keuls.

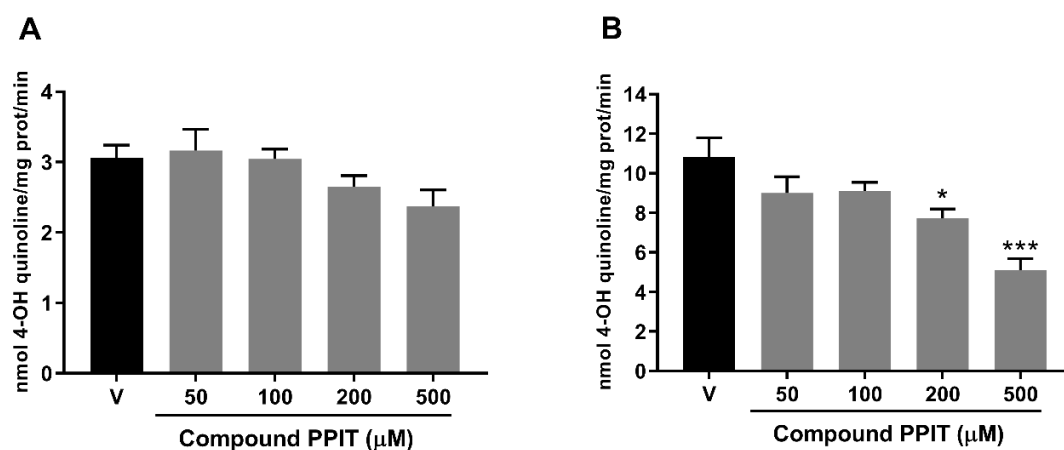


Fig 6. Effect of the PPIT on the cerebral activity of MAO-A (A) and MAO-B (B) isoforms. The data represent the mean $\pm$ S.E.M. of four independent experiments performed in duplicate. (*) $p < 0.05$ and (***) $p < 0.0001$ compared with the vehicle (V) group. One-way ANOVA/Newman-Keuls.

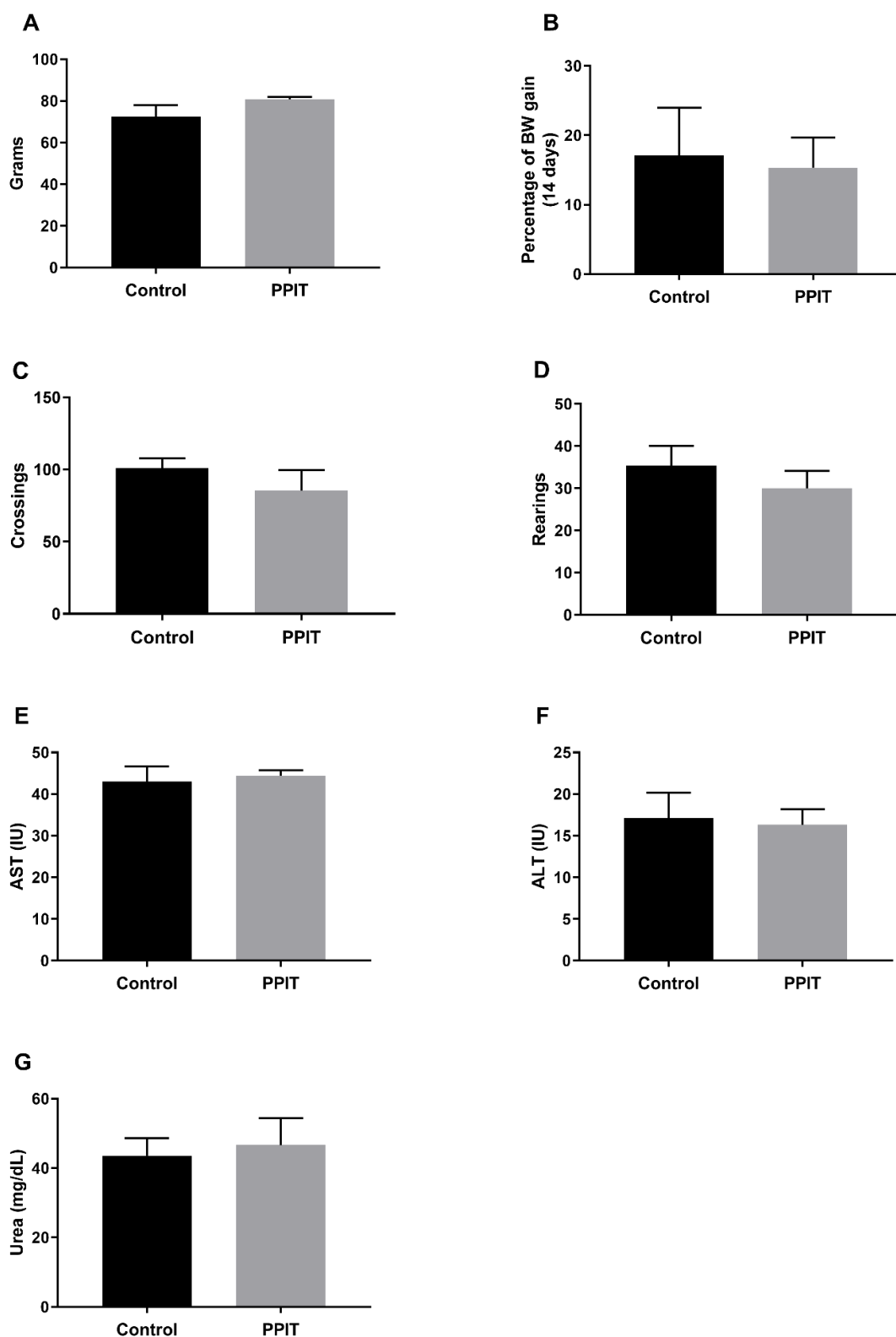


Fig 7. Effect of PPIT treatment (300 mg/kg, i.g.) on parameters of systemic toxicity in female mice. Amount of food ingested (A) and percentage of weight variation (B) during 14 days. Locomotor (C) and exploratory (D) activity in OFT. Plasma AST (E) and ALT (F) activities and urea levels (G). Unpaired-t test was used to compare the columns of each experiment individually

Supplementary Material

3-(pyridin-2-yl)-2-(pyridin-2-ylimino)thiazolidin-4-one as a novel inhibitor of cerebral MAO-B activity with antioxidant properties and low toxicity potential

Running title: PPIT, an antioxidant and MAO-B inhibitor compound

Luiz Roberto Carraro Junior^a, Amália Gonçalves Alves^a, Taís da Silva Teixeira Rech^a, José Coan Campos Júnior^b, Geonir Machado Siqueira^b, Wilson Cunico^b, César Augusto Brüning^{a*}, Cristiani Folharini Bortolatto^{a*}

^aPrograma de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção (PPGBBio), Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM), Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção (PPGBBio), Laboratório de Química Aplicada a Bioativos (LaQuiABio), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

Table of Contents	Table/Figure	Page
Chromatogram and Mass Spectra	Fig. 1	2
¹ H and ¹³ C NMR spectra	Fig. 2	3

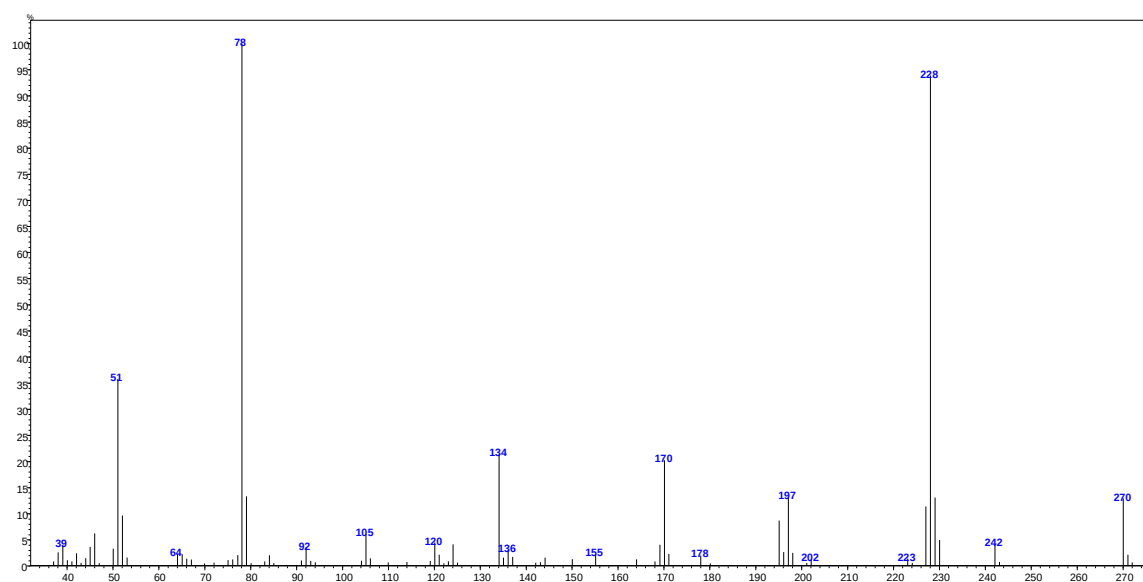
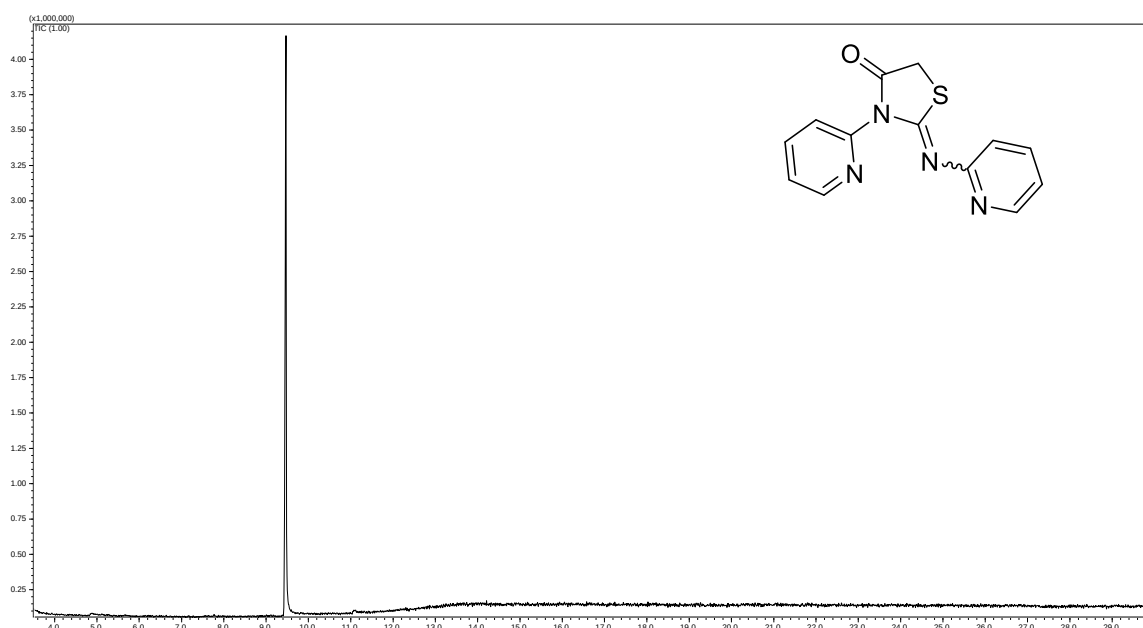


Fig. 1 CG-MS of 3-(pyridin-2-yl)-2-(pyridin-2-ylimino)thiazolidin-4-one (PPIT).

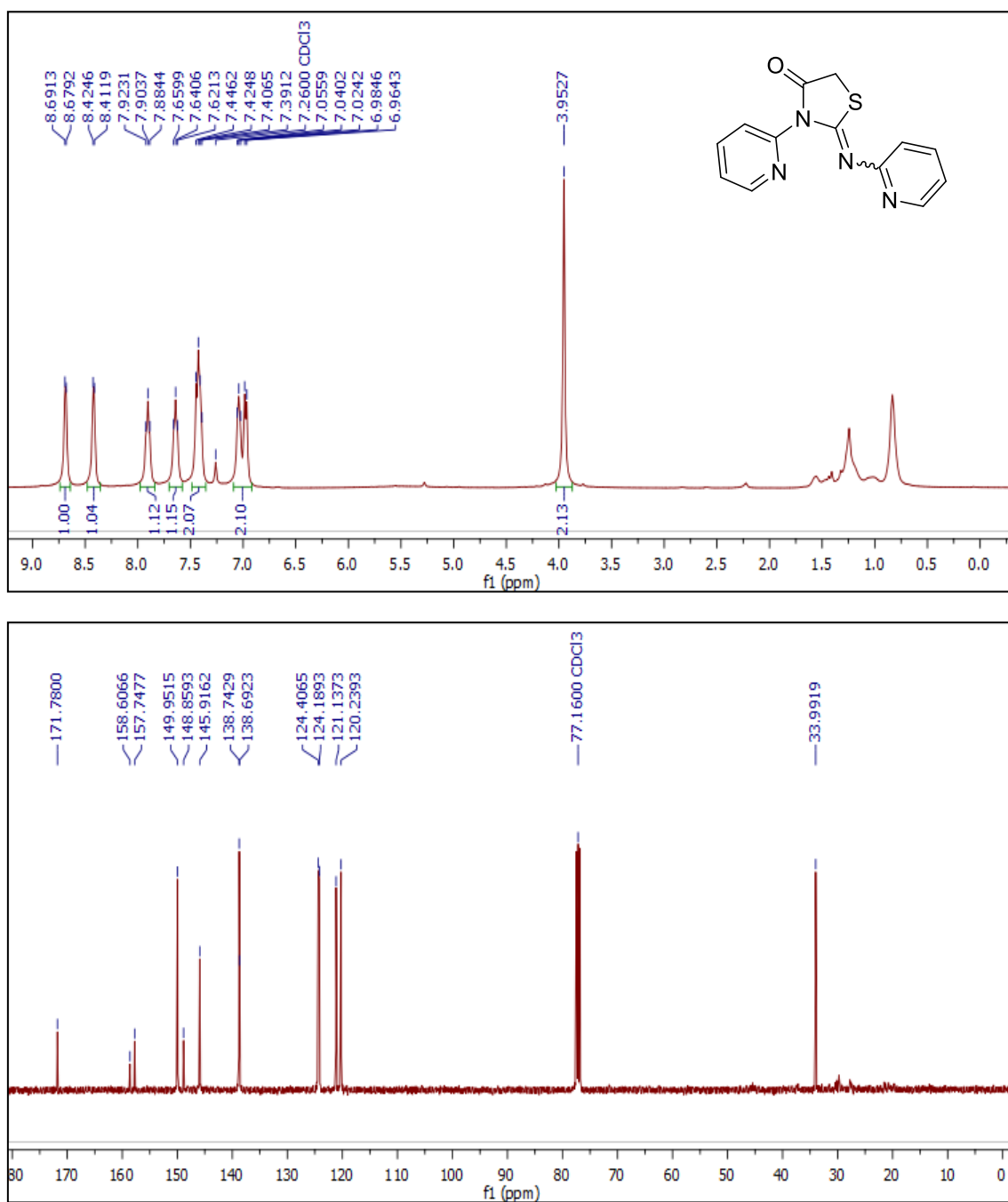


Fig. 2 ¹H (400 MHz, CDCl₃) and ¹³C (100 MHz, CDCl₃) NMR spectra of 3-(pyridin-2-yl)-2-(pyridin-2-ylimino)thiazolidin-4-one (PPIT).

5 CONCLUSÃO

Diante dos objetivos propostos para essa Tese, foi possível sintetizar e caracterizar 17 derivados (**5a-p** e **7**) de IMTSD com excelentes rendimentos de 44 a 91. Os compostos **5a-p** foram sintetizados utilizando metodologia convencional, conforme descrito na rota **A** no referencial teórico utilizando tioureia assimétrica, da mesma forma, o composto **7** foi sintetizado, porém com tioureia simétrica. A purificação foi realizada utilizando materiais e reagentes não tóxicos o que contribui com uma química verde. Os resultados obtidos de CG-EM, RMN de ^1H , ^{13}C e ^{15}N , difração de raio-X puderam determinar as estruturas corretas dos compostos.

Os compostos purificados foram submetidos a duas frentes de estudo: Atividade Antiglioma para os compostos **5a-p** e Atividade Inibidora de MAOs para o composto **7**. Dentre a série de 16 compostos da série **5a-p**, os compostos **5a**, **5l** e **5p** apresentaram considerável atividade antitumoral comparada ao fármaco padrão TMZ, inibindo a proliferação de células tumorais de glioma e ao mesmo tempo apresentando a indução de morte celular do glioma por apoptose, confirmada por expressão de caspase-3/7. Em relação ao composto **7**, foi avaliado a inibição de ambas MAOs apresentando seletividade na inibição da MAO-B em tecido cerebral de rato. Em ambos os casos, foram avaliados também a atividade antioxidante e a toxicidade dos compostos apresentando resultados satisfatórios como antioxidantes e baixa toxicidade.

Em conclusão, os composto (**5a-p** e **7**) demonstraram serem um potencial candidato a fármaco para uso clínico contra o glioma e enfermidades neuropsíquicas, uma vez que nos testes *in vitro* reduziu a viabilidade celular das células C6 de maneira seletiva e inibição seletiva da MAO-B. Para isso é necessário complementar os estudos, como objetivos futuros, explorando os compostos em modelos animais nas doenças supracitadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, N. *et al.* Symmetrical aryl linked bis-iminothiazolidinones as new chemical entities for the inhibition of monoamine oxidases: Synthesis, in vitro biological evaluation and molecular modelling analysis. **Bioorganic Chemistry**, [S. l.], v. 70, p. 17–26, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.11.004>
- ALEXANDER, B. M. *et al.* Targeting DNA repair and the cell cycle in glioblastoma. **Journal of Neuro-Oncology**, [S. l.], v. 107, n. 3, p. 463–477, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11060-011-0765-4>
- ALOISI, F. Immune function of microglia. **Glia**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 165–179, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/glia.1106>
- APPALANAIDU, K. *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel 2-imino-4-thiazolidinone derivatives as potent anti-cancer agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 26, n. 21, p. 5361–5368, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.08.013>
- BASERGA, R.; PERUZZI, F.; REISS, K. The IGF-1 receptor in cancer biology. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 107, n. 6, p. 873–877, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.11487>
- BECHMANN, I.; GALEA, I.; PERRY, V. H. What is the blood–brain barrier (not)? **Trends in Immunology**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 5–11, 2007. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.it.2006.11.007>
- BEN-HARARI, R. R.; YODIM, M. B. Ontogenesis of uptake and deamination of 5-hydroxytryptamine, dopamine and beta-phenylethylamine in isolated perfused lung and lung homogenates from rats. **British journal of pharmacology**, [S. l.], v. 72, n. 4, p. 731–737, 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1981.tb09155.x>
- BERTHET, C.; KALDIS, P. Cell-specific responses to loss of cyclin-dependent kinases. **Oncogene**, [S. l.], v. 26, n. 31, p. 4469–4477, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210243>
- BILLETT, E. E. Monoamine Oxidase (MAO) in Human Peripheral Tissues. **NeuroToxicology**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 139–148, 2004. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0161-813X\(03\)00094-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0161-813X(03)00094-9)

BOND, P. A.; CUNDALL, R. L. Properties of monoamine oxidase (MAO) in human blood platelets, plasma, lymphocytes and granulocytes. **Clinica Chimica Acta**, [S. l.], v. 80, n. 2, p. 317–326, 1977. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0009-8981\(77\)90039-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0009-8981(77)90039-0)

BORRONI, E. *et al.* Sembragiline: A Novel, Selective Monoamine Oxidase Type B Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [S. l.], v. 362, n. 3, p. 413 LP – 423, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/jpet.117.241653>

BORTOLATO, M.; CHEN, K.; SHIH, J. C. Monoamine oxidase inactivation: From pathophysiology to therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 60, n. 13, p. 1527–1533, 2008. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.06.002>

BRENNAN, C. W. *et al.* The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. **Cell**, [S. l.], v. 155, n. 2, p. 462–477, 2013. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034>

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; FLOHÉ, L. Basic Principles and Emerging Concepts in the Redox Control of Transcription Factors. **Antioxidants & Redox Signaling**, [S. l.], v. 15, n. 8, p. 2335–2381, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3534>

BRUNI, J. E. Ependymal development, proliferation, and functions: A review. **Microscopy Research and Technique**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 2–13, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19980401\)41:1<2::AID-JEMT2>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980401)41:1<2::AID-JEMT2>3.0.CO;2-Z)

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging¹¹This article is dedicated to the memory of our dear friend, colleague, and mentor Lars Ernster (1920–1998), in gratitude for all he gave to us. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 222–230, 2000. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00317-8)

CAI, M.-G. G.; WU, Y.; CHANG, J. Synthesis and biological evaluation of 2-arylimino-3-pyridin-thiazolineone derivatives as antibacterial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 26, n. 10, p. 2517–2520, 2016. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.03.089>

CAI, W. *et al.* Synthesis and Anticancer Activity of Novel Thiazole-5-Carboxamide Derivatives. **Der PharmaChemica**, [S. l.], v. 8, n. November 2015, p. 4–13, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app6010008>

CAO, X. *et al.* Serine 209 resides within a putative p38(MAPK) consensus motif and regulates monoamine oxidase-A activity. **Journal of Neurochemistry**, [S. l.], v. 111, n. 1, p. 101–110, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06300.x>

CASES, O. *et al.* Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. **Science**, [S. l.], v. 268, n. 5218, p. 1763 LP – 1766, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.7792602>

CECCARELLI, M. *et al.* Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. **Cell**, [S. l.], v. 164, n. 3, p. 550–563, 2016. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.028>

CHAITIDIS, P. *et al.* Th2 Response of Human Peripheral Monocytes Involves Isoform-Specific Induction of Monoamine Oxidase-A. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 173, n. 8, p. 4821 LP – 4827, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.8.4821>

CHAITIDIS, P. *et al.* Expression regulation of MAO isoforms in monocytic cells in response to Th2cytokines. **Medical Science Monitor**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 259–265, 2005. Disponível em: <https://doi.org/https://dx.doi.org/>

CHING, J. *et al.* The peroxisome proliferator activated receptor gamma agonist pioglitazone increases functional expression of the glutamate transporter excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2) in human glioblastoma cells. **Oncotarget**, [S. l.], v. 6, n. 25, p. 21301–21314, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4019>

CHUNG, W. J. *et al.* Inhibition of Cystine Uptake Disrupts the Growth of Primary Brain Tumors. **The Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 25, n. 31, p. 7101 LP – 7110, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5258-04.2005>

COHEN, G.; FAROOQUI, R.; KESLER, N. Parkinson disease: A new link between monoamine oxidase and mitochondrial electron flow. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 94, n. 10, p. 4890 LP – 4894, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.4890>

- COLLINS, I.; GARRETT, M. D. Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. **Current Opinion in Pharmacology**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 366–373, 2005. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.04.009>
- CREWS, C. M.; MOHAN, R. Small-molecule inhibitors of the cell cycle. **Current Opinion in Chemical Biology**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 47–53, 2000. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(99\)00050-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1367-5931(99)00050-2)
- CREWS, C. M.; SHOTWELL, J. B. Small-molecule inhibitors of the cell cycle: an overview. **Progress in cell cycle research**, [S. l.], v. 5, p. 125–133, 2003.
- DA SILVA, D. S. *et al.* Thiazolidin-4-ones from 4-(methylthio)benzaldehyde and 4-(methylsulfonyl)benzaldehyde: Synthesis, antiglioma activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 124, p. 574–582, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.057>
- DAS NEVES, A. M. *et al.* Synthesis of Novel Thiazolidin-4-ones and Thiazinan-4-ones Analogous to Rosiglitazone. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, [S. l.], v. 56, n. 1, p. 251–259, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jhet.3402>
- DE CARVALHO, D. D.; YOU, J. S.; JONES, P. A. DNA methylation and cellular reprogramming. **Trends in Cell Biology**, [S. l.], v. 20, n. 10, p. 609–617, 2010. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.08.003>
- DEL RIO, D.; SERAFINI, M.; PELLEGRINI, N. Selected methodologies to assess oxidative/antioxidant status in vivo: a critical review. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD**, Netherlands, v. 12, n. 6, p. 343–351, 2002.
- DEZSI, L.; VECSEI, L. **Monoamine Oxidase B Inhibitors in Parkinson's Disease**. [S. l.: s. n.]
- DROZAK, J.; KOZŁOWSKI, M. [Monoamine oxidase as a target for drug action]. **Postepy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)**, Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. jdrozak@biol.uw.edu.pl, v. 60, p. 498–515, 2006.
- EDMONDSON, D. E. *et al.* Molecular and Mechanistic Properties of the Membrane-Bound Mitochondrial Monoamine Oxidases. **Biochemistry**, [S. l.], v. 48, n. 20, p. 4220–4230, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi900413g>

FARINA, C.; ALOISI, F.; MEINL, E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. **Trends in Immunology**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 138–145, 2007. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.it.2007.01.005>

FELSBERG, J. *et al.* Epidermal Growth Factor Receptor Variant III (EGFRvIII) Positivity in EGFR-Amplified Glioblastomas: Prognostic Role and Comparison between Primary and Recurrent Tumors. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 23, n. 22, p. 6846 LP – 6855, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0890>

FERNANDEZ, A. M. *et al.* Insulin Regulates Astrocytic Glucose Handling Through Cooperation With IGF-I. **Diabetes**, [S. l.], v. 66, n. 1, p. 64 LP – 74, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/db16-0861>

FERRÉ, P. The Biology of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. **Diabetes**, [S. l.], v. 53, n. suppl 1, p. S43 LP-S50, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2007.S43>

FINBERG, J. P. M.; RABEY, J. M. **Inhibitors of MAO-A and MAO-B in Psychiatry and Neurology**. [S. l.: s. n.]

FITZGERALD, J. C. *et al.* Monoamine oxidase-A modulates apoptotic cell death induced by staurosporine in human neuroblastoma cells. **Journal of Neurochemistry**, [S. l.], v. 103, n. 6, p. 2189–2199, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04921.x>

FRANKLIN, J. L. Redox Regulation of the Intrinsic Pathway in Neuronal Apoptosis. **Antioxidants & Redox Signaling**, [S. l.], v. 14, n. 8, p. 1437–1448, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3596>

GABRION, J. B. *et al.* Ependymal and choroidal cells in culture: Characterization and functional differentiation. **Microscopy Research and Technique**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 124–157, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19980415\)41:2<124::AID-JEMT3>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980415)41:2<124::AID-JEMT3>3.0.CO;2-U)

GAWESKA, H.; FITZPATRICK, P. F. Structures and mechanism of the monoamine oxidase family. **Biomolecular Concepts**, Berlin, Boston, v. 2, n. 5, p. 365–377, 2011. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1515/BMC.2011.030>

GHANBARI MOVAHED, Z. *et al.* Cancer cells change their glucose metabolism to overcome increased ROS: One step from cancer cell to cancer stem cell? **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 112, n. February, p. 108690, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108690>

GIORGIO, M. *et al.* Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 722–728, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm2240>

GLOBOCAN OBSERVATORY, W. Cancer Today - World. **International Agency for Research on Cancer**, [S. l.], v. 876, p. 2018–2019, 2019.

GOLL, M. G.; BESTOR, T. H. EUKARYOTIC CYTOSINE METHYLTRANSFERASES. **Annual Review of Biochemistry**, [S. l.], v. 74, n. 1, p. 481–514, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721>

GRIMSBY, J. *et al.* Increased stress response and β -phenylethylamine in MAOB-deficient mice. **Nature genetics**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 206–210, 1997.

GROMMES, C. *et al.* Inverse association of PPAR γ agonists use and high grade glioma development. **Journal of Neuro-Oncology**, [S. l.], v. 100, n. 2, p. 233–239, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0185-x>

GROMMES, C.; LANDRETH, G. E.; HENEKA, M. T. Antineoplastic effects of peroxisome proliferatoractivated receptor γ agonists. **The Lancet Oncology**, [S. l.], v. 5, n. 7, p. 419–429, 2004. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(04\)01509-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01509-8)

GUYTON, K. Z. *et al.* Activation of Mitogen-activated Protein Kinase by H₂O₂. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, [S. l.], v. 271, n. 8, p. 4138–4142, 1996.

HANSEN, M. B.; WITTE, A.-B. The role of serotonin in intestinal luminal sensing and secretion. **Acta Physiologica**, [S. l.], v. 193, n. 4, p. 311–323, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2008.01870.x>

HENCHCLIFFE, C.; SEVERT, W. L. Disease Modification in Parkinson's Disease. **Drugs & Aging**, [S. l.], v. 28, n. 8, p. 605–615, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.2165/11591320-000000000-00000>

HERRICK, J. GENETIC VARIATION AND DNA REPLICATION TIMING, OR WHY IS THERE LATE REPLICATING DNA? **Evolution**, [S. l.], v. 65, n. 11, p. 3031–3047, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01407.x>

HOLLEY, A. K.; DHAR, S. K.; CLAIR, D. K. S. Manganese superoxide dismutase versus p53 : the mitochondrial center. **ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES**, [S. l.], v. 1201, p. 72–78, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05612.x>

IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 145–169, 2003. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01197-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01197-8)

JAHNG, J. W. *et al.* Localization of monoamine oxidase A and B mRNA in the rat brain by in situ hybridization. **Synapse**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 30–36, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199701\)25:1<30::AID-SYN4>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199701)25:1<30::AID-SYN4>3.0.CO;2-G)

JAWORSKA-ADAMU, A. K. A. U.-J. **Synantocytes: the fifth type of glia? In comparison with astrocytes.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.2478/v10042-010-0033-z>

JENKINS, R. B. *et al.* A t(1;19)(q10;p10) Mediates the Combined Deletions of 1p and 19q and Predicts a Better Prognosis of Patients with Oligodendroglioma. **Cancer Research**, [S. l.], v. 66, n. 20, p. 9852 LP – 9861, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1796>

JIAPAER, S. *et al.* Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma. **Neurologia medico-chirurgica**, [S. l.], v. 58, n. 10, p. 405–421, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2018-0141>

JONSSON, T.; EDMONDSON, D. E.; KLINMAN, J. P. Hydrogen tunneling in the flavoenzyme monoamine oxidase B. **Biochemistry**, [S. l.], v. 33, n. 49, p. 14871–14878, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi00253a026>

KALDIS, P.; RICHARDSON, H. E. When cell cycle meets development. **Development**, [S. l.], v. 139, n. 2, p. 225 LP – 230, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/dev.073288>

KALUDERCIC, N. *et al.* Monoamine oxidases (MAO) in the pathogenesis of heart failure and ischemia/reperfusion injury. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [S. l.], v. 1813, n. 7, p. 1323–1332, 2011. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.09.010>

KANDUC, D. *et al.* Cell death: Apoptosis versus necrosis (Review). **Int J Oncol**, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Bari, I-70126 Bari, Italy. d.kanduc@biologia.uniba.it null, v. 21, n. 1, p. 165–170, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ijo.21.1.165>

KÜÇÜKGÜZEL, I. *et al.* 2-Heteroarylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones as a new class of non-nucleoside inhibitors of HCV NS5B polymerase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 69, p. 931–941, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.08.043>

KUNDUZOVA, O. R. *et al.* Regulation of JNK/ERK activation, cell apoptosis, and tissue regeneration by monoamine oxidases after renal ischemia-reperfusion. **The FASEB Journal**, [S. l.], v. 16, n. 9, p. 1129–1131, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.01-1008fje>

KYRITSIS, A. P. *et al.* Inherited predisposition to glioma. **Neuro-Oncology**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 104–113, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/neuonc/nop011>

LE RHUN, E. *et al.* Molecular targeted therapy of glioblastoma. **Cancer Treatment Reviews**, [S. l.], v. 80, p. 101896, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101896>

LI, G. *et al.* Catecholamines regulate the activity, secretion, and synthesis of renalase. **Circulation**, [S. l.], v. 117, n. 10, p. 1277–1282, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.732032>

LIPSKI, R. *et al.* p53 Dimers Associate with a Head-to-Tail Response Element to Repress Cyclin B Transcription. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 8, p. e42615, 2012.

LIU, L.; LI, X. IDH gene mutation in glioma. **Cancer Translational Medicine**, Xiangya Hospital, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha, Hunan; Xiangya Hospital, Xiangya School of Medicine, Central South University; School of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan; Xiangya Hospital, v. 4, n. 5, p. 129–133, 2018. Disponível em: https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4103/ctm.ctm_27_18

- LIU, X.-H. *et al.* Facile and efficient synthesis and herbicidal activity determination of novel 1,2,4-triazolo[4,3-a]pyridin-3(2H)-one derivatives via microwave irradiation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 25, n. 23, p. 5524–5528, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.10.064>
- LIU, X. *et al.* Discovery and SAR of Thiazolidine-2,4-dione Analogues as Insulin-like Growth Factor-1 Receptor (IGF-1R) Inhibitors via Hierarchical Virtual Screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 53, n. 6, p. 2661–2665, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm901798e>
- LIU, Z. *et al.* Cocaine- and amphetamine-regulated transcript promotes the differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells into neural cells. **BMC Neuroscience**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 67, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2202-12-67>
- LOVEN, K. *et al.* Evaluation of the efficacy and tolerability of applied to each side of the face in patients with actinic keratosis. **Clinical Therapeutics**, [S. l.], v. 24, n. 6, p. 4–5, 2002.
- MAGDER, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? **Critical Care**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 208, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/cc3992>
- MAKHAEVA, G. F. *et al.* Synthesis, molecular docking, and biological activity of 2-vinyl chromones: Toward selective butyrylcholinesterase inhibitors for potential Alzheimer's disease therapeutics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.08.010>
- MALTA, T. M. *et al.* Glioma CpG island methylator phenotype (G-CIMP): biological and clinical implications. **Neuro-Oncology**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 608–620, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox183>
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 222–231, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35106065>
- MANDEL, S. *et al.* Neuroprotective Strategies in Parkinson's Disease. **CNS Drugs**, [S. l.], v. 17, n. 10, p. 729–762, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.2165/00023210-200317100-00004>

MANOLI, I. *et al.* Monoamine oxidase-A is a major target gene for glucocorticoids in human skeletal muscle cells. **The FASEB Journal**, [S. l.], v. 19, n. 10, p. 1359–1361, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.04-3660fje>

MARTINO, J.-C.; YOUNG, R. J. Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 Family Members and Mitochondrial Dynamics. **Developmental Cell**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 92–101, 2011. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.017>

MIALET-PEREZ, J. *et al.* New insights on receptor-dependent and monoamine oxidase-dependent effects of serotonin in the heart. **Journal of Neural Transmission**, [S. l.], v. 114, n. 6, p. 823–827, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00702-007-0695-7>

MIDDELDORP, J.; HOL, E. M. GFAP in health and disease. **Progress in Neurobiology**, [S. l.], v. 93, n. 3, p. 421–443, 2011. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.005>

MOGHADDAM, F. M.; HOJABRI, L. A novel synthesis of some 2-imino-4-thiazolidinone derivatives. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 35–38, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jhet.5570440106>

MOROSSETTI, R. *et al.* The PPAR γ ligands PGJ2 and rosiglitazone show a differential ability to inhibit proliferation and to induce apoptosis and differentiation of human glioblastoma cell lines. **Int J Oncol**, Division of Pediatric Oncology, Catholic University of Rome, 00168 Rome, Italy. rmorosetti@rm.unicatt.it null, v. 25, n. 2, p. 493–502, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ijo.25.2.493>

MUGHAL, A.; KUMAR, D.; VIKRAM, A. Effects of Thiazolidinediones on metabolism and cancer: Relative influence of PPAR γ and IGF-1 signaling. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 768, p. 217–225, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.10.057>

MUR, P. *et al.* Impact on prognosis of the regional distribution of MGMT methylation with respect to the CpG island methylator phenotype and age in glioma patients. **Journal of Neuro-Oncology**, [S. l.], v. 122, n. 3, p. 441–450, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11060-015-1738-9>

MUSHTAQUE, M. *et al.* Synthesis, stereochemistry determination, pharmacological studies and quantum chemical analyses of bisthiazolidinone derivative. **Journal of Molecular Structure**, [S. l.], v. 1127, p. 99–113, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.07.089>

NANDIGAMA, R. K.; EDMONDSON, D. E. Structure–Activity Relations in the Oxidation of Phenethylamine Analogues by Recombinant Human Liver Monoamine Oxidase A. **Biochemistry**, [S. l.], v. 39, n. 49, p. 15258–15265, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi001957h>

ORTELLS, M. O.; ARIAS, H. R. Neuronal networks of nicotine addiction. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [S. l.], v. 42, n. 12, p. 1931–1935, 2010. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.08.019>

OTTANÀ, R. *et al.* In vitro antiproliferative activity against human colon cancer cell lines of representative 4-thiazolidinones. Part I. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 15, n. 17, p. 3930–3933, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.05.093>

OU, X.-M.; CHEN, K.; SHIH, J. C. Monoamine oxidase A and repressor R1 are involved in apoptotic signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 103, n. 29, p. 10923 LP – 10928, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0601515103>

PARPURA, V. *et al.* Glial cells in (patho)physiology. **Journal of Neurochemistry**, [S. l.], v. 121, n. 1, p. 4–27, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07664.x>

PEARCE, R. K. B. *et al.* Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, [S. l.], v. 104, p. 661–677, 1997.

PLATE, K. H. *et al.* Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: Coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible In vivo regulatory mechanisms. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 59, n. 4, p. 520–529, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.2910590415>

- PORTER, A. G.; JÄNICKE, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 99–104, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400476>
- RIEDERER, P.; LAUX, G. MAO-inhibitors in Parkinson's Disease. **Experimental neurobiology**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 1–17, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.5607/en.2011.20.1.1>
- ROBERTS, P. J. *et al.* Multiple Roles of Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitors in Cancer Therapy. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 104, n. 6, p. 476–487, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jnci/djs002>
- ROUSSEAU, A.; MOKHTARI, K.; DUYCKAERTS, C. The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system – what has changed? **Current Opinion in Neurology**, [S. l.], v. 21, n. 6, 2008.
- SAEED, A. *et al.* Benzothiazolyl substituted iminothiazolidinones and benzamido-oxothiazolidines as potent and partly selective aldose reductase inhibitors. **MedChemComm**, [S. l.], v. 5, n. 9, p. 1371–1380, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c4md00206g>
- SALMINEN, A. *et al.* Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 3–11, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07738.x>
- SAMUDRA, N. *et al.* Seizures in glioma patients: An overview of incidence, etiology, and therapies. **Journal of the Neurological Sciences**, [S. l.], v. 404, p. 80–85, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.07.026>
- SANDAL, T. Molecular Aspects of the Mammalian Cell Cycle and Cancer. **The Oncologist**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 73–81, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.7-1-73>
- SAURA, J. *et al.* Molecular neuroanatomy of human monoamine oxidases A and B revealed by quantitative enzyme radioautography and in situ hybridization histochemistry. **Neuroscience**, [S. l.], v. 70, n. 3, p. 755–774, 1996. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)83013-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)83013-2)

SCRUTTON, N. S. Chemical aspects of amine oxidation by flavoprotein enzymes. **Natural Product Reports**, [S. l.], v. 21, n. 6, p. 722–730, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/B306788M>

SHERR, C. J. The Pezcoller Lecture: Cancer Cell Cycles Revisited. **Cancer Research**, [S. l.], v. 60, n. 14, p. 3689 LP – 3695, 2000.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. **Genes & Development**, [S. l.], v. 9, n. 10, p. 1149–1163, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gad.9.10.1149>

SHIH, J. C.; CHEN, K.; RIDD, M. J. MONOAMINE OXIDASE: From Genes to Behavior. **Annual Review of Neuroscience**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 197–217, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.197>

SHRESTHA, A. *et al.* Design, synthesis, and structure-activity relationships of new benzofuro[3,2-b]pyridin-7-ols as DNA topoisomerase II inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 566–571, 2018 a. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.01.048>

SHRESTHA, A. *et al.* Design, synthesis, biological evaluation, structure-activity relationship study, and mode of action of 2-phenol-4,6-dichlorophenyl-pyridines. **Bioorganic Chemistry**, [S. l.], v. 79, p. 1–18, 2018 b. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.03.033>

SINGH, N. *et al.* Ulcerogenicity devoid novel non-steroidal anti-inflammatory agents (NSAIDS): Syntheses, computational studies, and activity of 5-arylidene-2-imino-4-thiazolidinones. **Medicinal Chemistry Research**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 1927–1941, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00044-014-1270-z>

SINGH, S. P. *et al.* Chemistry and Biological Activity of Thiazolidinones. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 81, n. 2, p. 175–203, 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr00042a003>

SIVASUBRAMANIAM, S. D. *et al.* Monoamine Oxidase Expression and Activity in Human Placentae from Pre-eclamptic and Normotensive Pregnancies. **Placenta**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 163–171, 2002. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1053/plac.2001.0770>

SKLADANOWSKI, A.; KONOPA, J. Adriamycin and daunomycin induce programmed cell death (apoptosis) in tumour cells. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 375–382, 1993. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(93\)90512-U](https://doi.org/10.1016/0006-2952(93)90512-U)

ST. LAURENT, D. R. *et al.* Regioselective synthesis of 3-(heteroaryl)-iminothiazolidin-4-ones. **Tetrahedron Letters**, [S. l.], v. 45, n. 9, p. 1907–1910, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.01.001>

STOCKWELL, S. R. *et al.* Mechanism-Based Screen for G1/S Checkpoint Activators Identifies a Selective Activator of EIF2AK3/PERK Signalling. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. e28568, 2012.

SU, A. I. *et al.* A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 101, n. 16, p. 6062 LP – 6067, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0400782101>

SZABO, E. *et al.* Autocrine VEGFR1 and VEGFR2 signaling promotes survival in human glioblastoma models in vitro and in vivo. **Neuro-Oncology**, [S. l.], v. 18, n. 9, p. 1242–1252, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/neuonc/now043>

TARAWNEH, R.; HOLTZMAN, D. M. The Clinical Problem of Symptomatic Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [S. l.], v. 2, n. 5, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006148>

TAYLOR, A. P. *et al.* Modern advances in heterocyclic chemistry in drug discovery. **Org. Biomol. Chem.**, [S. l.], v. 14, n. 28, p. 6611–6637, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C6OB00936K>

TERAISHI, F. *et al.* P-Glycoprotein-Independent Apoptosis Induction by a Novel Synthetic Compound , MMPT [5- [(4-Methylphenyl) methylene] -2- (phenylamino) -4 (5H) -thiazolone]. **Pharmacology**, [S. l.], v. 314, n. 1, p. 355–362, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/jpet.105.085654.moresistance>

THEODORAS, A. M.; ZON, L. I.; KYRIAKIS, J. M. Cdc42Hs , but Not Rac1 , Inhibits Serum-stimulated Cell Cycle Progression at G 1 / S through a Mechanism Requiring p38 / RK * ´ d Molna. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, [S. l.], v. 272, n. 20, p. 13229–13235, 1997.

TRIPATHI, A. C. *et al.* 4-Thiazolidinones: The advances continue. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 72, p. 52–77, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.11.017>

UFER, C. *et al.* Redox Control in Mammalian Embryo Development. **Antioxidants & Redox Signaling**, [S. l.], v. 13, n. 6, p. 833–875, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ars.2009.3044>

VASCONCELOS, A. de *et al.* **2,4-Thiazolidinedione as Precursor to the Synthesis of Compounds with Antiglioma Activities in C6 and GL261 Cells.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/1573406416666200403075826>

VERKHRATSKY, A.; ORKAND, R. K.; KETTENMANN, H. Glial calcium: Homeostasis and signaling function. **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 78, n. 1, p. 99–141, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.99>

VICINI, P. *et al.* 2-Heteroarylimino-5-benzylidene-4-thiazolidinones analogues of 2-thiazolylimino-5-benzylidene-4-thiazolidinones with antimicrobial activity: Synthesis and structure-activity relationship. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 16, n. 7, p. 3714–3724, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.02.001>

VINDIS, C. *et al.* Dopamine induces ERK activation in renal epithelial cells through H₂O₂ produced by monoamine oxidase. **Kidney International**, [S. l.], v. 59, n. 1, p. 76–86, 2001. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00468.x>

VUKOVIC, J. *et al.* Activation of neural precursors in the adult neurogenic niches. **Neurochemistry International**, [S. l.], v. 59, n. 3, p. 341–346, 2011. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.04.003>

WALKER, M. C.; EDMONDSON, D. E. Structure-Activity Relationships in the Oxidation of Benzylamine Analogues by Bovine Liver Mitochondrial Monoamine Oxidase B. **Biochemistry**, [S. l.], v. 33, n. 23, p. 7088–7098, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi00189a011>

WEI, J.; ZAIKA, E.; ZAIKA, A. p53 Family: Role of Protein Isoforms in Human Cancer. **Journal of Nucleic Acids**, [S. l.], v. 2012, p. 687359, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/687359>

WEINBERG, R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, [S. l.], v. 81, n. 3, p. 323–330, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90385-2)

WELLER, M. *et al.* Glioma. **Nature Reviews Disease Primers**, [S. l.], v. 1, n. July, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.17>

WESTLUND, K. N. *et al.* Localization of distinct monoamine oxidase a and monoamine oxidase b cell populations in human brainstem. **Neuroscience**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 439–456, 1988. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90250-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90250-3)

WIESNER, R. *et al.* Oxygenation of mitochondrial membranes by the reticulocyte lipoygenase. Action on monoamine oxidase activities A and B. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [S. l.], v. 986, n. 1, p. 11–17, 1989. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2736\(89\)90266-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2736(89)90266-6)

WILLIAMS, A.; PIATON, G.; LUBETZKI, C. Astrocytes—Friends or foes in multiple sclerosis? **Glia**, [S. l.], v. 55, n. 13, p. 1300–1312, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/glia.20546>

WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **The Journal of Pathology**, [S. l.], v. 226, n. 2, p. 352–364, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/path.3022>

WIRENFELDT, M.; BABCOCK, A. A.; VINTERS, H. V. Microglia - Insights into immune system structure, function, and reactivity in the central nervous system. **Histology and Histopathology**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 519–530, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.14670/HH-26.519>

WONG, C.-W. *et al.* Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 99, n. 23, p. 14783 LP – 14788, 2002 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.192569699>

WONG, W. K. *et al.* Activation of Human Monoamine Oxidase B Gene Expression by a Protein Kinase C MAPK Signal Transduction Pathway Involves c-Jun and Egr-1 *. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, [S. l.], v. 277, n. 25, p. 22222–22230, 2002 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M202844200>

- WU, H.; ZHANG, Y. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. **Genes & Development**, [S. l.], v. 25, n. 23, p. 2436–2452, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gad.179184.111>
- YAMADA, M.; YASUHARA, H. Clinical Pharmacology of MAO Inhibitors: Safety and Future. **NeuroToxicology**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 215–221, 2004. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0161-813X\(03\)00097-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0161-813X(03)00097-4)
- YE, Z.-C.; SONTHEIMER, H. Glioma Cells Release Excitotoxic Concentrations of Glutamate. **Cancer Research**, [S. l.], v. 59, n. 17, p. 4383 LP – 4391, 1999.
- YELLA, R.; GHOSH, H.; PATEL, B. K. It is “2-imino-4-thiazolidinones” and not thiohydantoins as the reaction product of 1,3-disubstituted thioureas and chloroacetylchloride. **Green Chemistry**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. 1307–1312, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/b807775d>
- YOON, S.; SEGER, R. The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. **Growth Factors**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 21–44, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02699050500284218>
- YOUDIM, M. B.; FINBERG, J. P. Monoamine oxidase B inhibition and the “cheese effect”. **Journal of neural transmission. Supplementum**, Rappaport Family Research Institute, Faculty of Medicine, Technion, Haifa, Israel., v. 25, p. 27–33, 1987.
- YOUSEFNIA, S. *et al.* The influence of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligands on cancer cell tumorigenicity. **Gene**, [S. l.], v. 649, p. 14–22, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.01.018>
- YU, P. H. *et al.* Stereospecific deuterium substitution at the α -carbon position of dopamine and its effect on oxidative deamination catalyzed by MAO-A and MAO-B from different tissues. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 1027–1036, 1986. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-2952\(86\)90094-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-2952(86)90094-8)
- ZANDER, T. *et al.* Induction of apoptosis in human and rat glioma by agonists of the nuclear receptor PPAR γ . **Journal of Neurochemistry**, [S. l.], v. 81, n. 5, p. 1052–1060, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00899.x>

ZEHETMEYR, F. K. *et al.* Ovicidal in vitro activity of 2-aryl-3-(2-morpholinoethyl)thiazolidin-4-ones and 2-aryl-3-(3-morpholinopropyl)thiazolidin-4-ones against *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 192, p. 60–64, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.07.012>

ZHAO, D. *et al.* Biological evaluation of halogenated thiazolo[3,2-a]pyrimidin-3-one carboxylic acid derivatives targeting the YycG histidine kinase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 87, p. 500–507, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.09.096>

ZHAO, S. *et al.* Glioma-Derived Mutations in IDH1 Dominantly Inhibit IDH1 Catalytic Activity and Induce HIF-1 α . **Science**, [S. l.], v. 324, n. 5924, p. 261 LP – 265, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1170944>

ZHOU, H. *et al.* Design, Synthesis, Cytoselective Toxicity, Structure–Activity Relationships, and Pharmacophore of Thiazolidinone Derivatives Targeting Drug-Resistant Lung Cancer Cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 51, n. 5, p. 1242–1251, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm7012024>