



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO

Dissertação

**Avaliação da atividade antitumoral e inibição da atividade das enzimas
acetilcolinesterase e adenosina desaminase por 4-tiazolidinonas derivadas do
4-(metiltio)benzaldeído e do 4-(metilsulfonil)benzaldeído**

Daniel Schuch da Silva

Daniel Schuch da Silva

Avaliação da atividade antitumoral e inibição da atividade das enzimas acetilcolinesterase e adenosina desaminase por 4-tiazolidinonas derivadas do 4-(metiltio)benzaldeído e do 4-(metilsulfonil)benzaldeído

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção.

Orientador: Prof. Wilson João Cunico Filho
Co-orientadora: Prof.^a Roselia Maria Spanevello

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S586a Silva, Daniel Schuch da

Avaliação da atividade antitumoral e inibição da atividade das enzimas acetilcolinesterase e adenosina desaminase por 4-tiazolidinonas derivadas do 4-(metiltio)benzaldeído e do 4-(metilsulfonil)benzaldeído / Daniel Schuch da Silva ; Wilson João Cunico Filho, orientador ; Roselia Maria Spanevello, coorientadora. — Pelotas, 2016.

113 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Tiazolidinonas. 2. Adenosina desaminase. 3. Acetilcolinesterase. 4. Glioblastoma multiforme. 5. Astrócitos. I. Cunico Filho, Wilson João, orient. II. Spanevello, Roselia Maria, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

Daniel Schuch da Silva

**Avaliação da atividade antitumoral e inibição da atividade das enzimas
acetilcolinesterase e adenosina desaminase por 4-tiazolidinonas
derivadas do 4-(metiltio)benzaldeído e do 4-(metilsulfonil)benzaldeído**

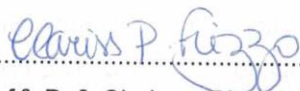
Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 26/02/2016

Banca examinadora:



Prof. Dr. Wilson João Cunico Filho (Orientador). Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria.



Prof.^a Dr.^a Clarissa Piccinin Frizzo. Doutora em Química pela Universidade Federal de Santa Maria.



Prof. Dr. Fabiano Barbosa Carvalho. Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Maria.

Pelotas, 2016

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha mãe Rosane, meu irmão Bruno e ao meu pai Alexandre pela educação, amor e pelas oportunidades que sempre me foram proporcionadas para que eu pudesse me tornar a pessoa que sou hoje. Foram e são parte importante da minha vida e com os quais desejo conviver o maior tempo possível. Agradeço a toda minha família, meus avós, dindos, primos, tios e meu padrasto pelos ensinamentos e por compartilhar os mais variados sentimentos. Agradeço a todos os meus amigos pelos momentos de muita alegria e felicidade e também pelos de muita tristeza e superação, e por estarmos juntos em todas as situações que a vida nos confronta. Agradeço aos colegas que conviveram comigo em diferentes fases da minha formação pessoal e profissional. Agradeço a todos os professores que passaram na escola, na universidade e também nos clubes e fizeram parte de momentos importantes que vieram a estabelecer o meu caráter e a ajudar a formar os valores que carrego. Agradeço ainda a minha namorada Graziela que amo muito e que tem me acompanhado e tem sido a minha parceira e amiga de todos os momentos, e que um dia poderá formar comigo a nossa família.

Aos colegas de laboratório, em especial ao Juliano, Gabriele, Adriana, Bruna, Daniela, Zé e Taís, bem como ao professor Geonir, um muito obrigado pela ajuda, ensinamentos e pelas amizades formadas que compartilhamos diariamente dentro do nosso grupo de pesquisa. Agradecimentos em especial àqueles que fizeram parte direta desse trabalho, como o César, a Mayara, a Gabriela, a Juliana e a Taíse, e que sem os quais o caminho seria muito mais longo e árduo, pessoas pelas quais tenho muito carinho e amizade. Um muito obrigado ao meu orientador e meu amigo Wilson Cunico que possibilitou a formação dessa grande parceria que tem gerado e continuará gerando frutos para o laboratório e para a universidade. Agradeço também à minha co-orientadora Roselia Spanevello pela ajuda e pela oportunidade de desenvolver esse trabalho nesse excelente grupo de pesquisa parceiro do qual também já me sinto parte. Agradeço ainda ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção e à Universidade Federal de Pelotas pela formação, além da Universidade Federal de Santa Maria e à Universidade Estadual de Campinas pela parceria e pela possibilidade de realizar as análises necessárias para o trabalho que não estão à disposição na nossa

universidade. Agradeço ainda à CAPES/FAPERGS pela bolsa de mestrado e aos órgãos de fomento CAPES, CNPQ e FAPERGS.

Resumo

SILVA, Daniel Schuch da. **Avaliação da atividade antitumoral e inibição da atividade das enzimas acetilcolinesterase e adenosina desaminase por 4-tiazolidinonas derivadas do 4-(metiltio)benzaldeído e do 4-(metilsulfonil)benzaldeído**. 2016. 113f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O presente estudo avaliou o potencial farmacológico de quatorze 1,3-tiazolidin-4-onas inéditas na literatura, onde verificou-se a capacidade inibitória desses compostos na atividade das enzimas ADA e AChE, além do potencial efeito anti glioma através da diminuição da viabilidade celular de células de glioblastoma multiforme. Neste trabalho foi aplicada a experiência do grupo de pesquisa na síntese de tiazolidinonas, onde realizou-se reações multicomponente e multicomponente *one-pot* a partir de condições reacionais já estabelecidas pelo grupo, além da determinação de uma nova condição reacional eficiente. As reações ocorreram entre sete diferentes aminas (2-aminoetilpiperidina; 3-aminopropilpiperidina; 3-dietilaminopropilamina; 2-picolilamina; 2-aminopiridina; 4-metiltioanilina; ou 3,4-metilenodioxianilina), dois aldeídos (4-metiltiobenzaldeído ou 4-metilsulfonilbenzaldeído) e o ácido mercaptoacético. Os novos compostos foram sintetizados de forma eficiente através das metodologias utilizadas com rendimentos de moderados a bons (22-86%), e foram devidamente identificados por CG/EM e RMN, sendo ainda cinco compostos caracterizados por EMAR. Os compostos **5b** (65,9%), **5c** (65,4%), **6a** (34,3%), **6b** (56,5%) e **6c** (51,0%) apresentaram efeito inibitório na AChE em linfócitos a partir da concentração de 50 μM e o composto **5a** (34,1%) a partir de 100 μM . Os mesmos compostos foram os únicos a apresentar inibição na atividade da enzima ADA, porém em concentrações mais altas (250 e/ou 500 μM). Avaliando a citotoxicidade desses 6 compostos em linhagem de células CHO (100, 250 e 500 μM em 48h), 5 apresentaram-se seguros já na concentração de 100 μM . Além disso, diversos compostos revelaram diferença significativa em relação ao controle positivo TMZ em 72h e apenas um em 48h à 100 μM no ensaio do MTT em células C6. Os compostos **5b** (52,2% em 48h; 78,0% em 72h), **5e** (48,0%; 75,0%), **5g** (61,2%; 81,7%) and **6e** (47,2%; 77,0%) apresentaram os melhores resultados na triagem de inibição da viabilidade celular e foram analisadas em diferentes concentrações (5, 25, 50, 100 e 250 μM). Os compostos **5b** e **5e** apresentaram diferença estatística em 5 μM , **6e** em 25 μM e **5g** em 50 μM em 72h. Ainda, foi avaliada a citotoxicidade em cultivo primário de astrócitos de ratos, onde dentre quatorze compostos sintetizados, oito foram considerados não tóxicos em 250 μM e nenhum apresentou toxicidade em 100 μM , ambos em 72h. Portanto, este trabalho obteve quatorze novas tiazolidinonas, sendo três compostos (**5c**, **6b**, **6c**) considerados potenciais inibidores da acetilcolinesterase e pelo menos quatro compostos (**5b**, **5e**, **5g**, **6e**) com promissora atividade antitumoral, apresentando um bom perfil de segurança.

Palavras Chave: Tiazolidinonas, Adenosina desaminase, Acetilcolinesterase, Glioblastoma multiforme, Astrócitos.

Abstract

SILVA, Daniel Schuch da. **Avaliação da atividade antitumoral e inibição da atividade das enzimas acetilcolinesterase e adenosina desaminase por 4-tiazolidinonas derivadas do 4-(metiltio)benzaldeído e do 4-(metilsulfonil)benzaldeído**. 2016. 113f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The present study assessed the biological potential of fourteen 1,3-thiazolidin-4-ones through ADA and AChE inhibition effect, besides the potential anti glioma effect through decreasing of cell viability of glioblastoma multiform cells. In this work was applied the experience of the research group in thiazolidinone synthesis, in which was performed multicomponent and multicomponent one-pot reactions from reaction conditions already established for the group, besides determination of a new efficient reaction condition. The reactions occurs by seven different amine (2-(piperidin-1-yl)ethan-1-amine; 3-(piperidin-1-yl)propan-1-amine; N1,N1-diethylpropane-1,3-diamine; pyridin-2-ylmethanamine; pyridin-2-amine; 4-(methylthio)aniline; or benzo[d][1,3]dioxol-5-amine), two aldehydes (4-(methylthio)benzaldehyde ou 4-(methylsulfonyl)benzaldehyde) and the mercaptoacetic acid. The new compounds were efficient synthesized through used methodologies in moderate to good yields (22-86%) and were identified by GC/MS and NMR. Five of them were also characterized by HRMS. The compounds **5b** (65.9%), **5c** (65.4%), **6a** (34.3%), **6b** (56.5%) and **6c** (51.0%) presented inhibitory effect of lymphocytic AChE since 50 μ M and the compound **5a** (34.1%) present statistical difference since 100 μ M. Only the same compounds presented ADA activity inhibition, however at high concentrations tested (250 and/or 500 μ M). Assessing the cytotoxicity of these six compounds in CHO cell line (100, 250 e 500 μ M in 48h), five of them presented safe already at 100 μ M. Besides that, several compounds demonstrate significant difference from positive control TMZ in 72h and only one in 48h at 100 μ M in C6 cell line MTT assay. The compounds **5b** (52.2% in 48h; 78.0% in 72h), **5e** (48.0%; 75.0%), **5g** (61.2%; 81.7%) and **6e** (47.2%; %) were the best results in the screening of inhibition of cell viability and were analyzed at different concentrations (5, 25, 50, 100 and 250 μ M). The compounds **5b** and **5e** presented statistical difference at 5 μ M, **6e** at 25 μ M and **5g** at 50 μ M in 72h of contact. Furthermore, the cytotoxicity study in primary astrocytes cells were evaluated and among fourteen compounds, eight of them were not cytotoxic at 250 μ M, and none presented toxicity at 100 μ M, both in 72h. Therefore, this work achieved fourteen new thiazolidinones, three of them (**5c**, **6b**, **6c**) considered potential acetylcholinesterase inhibitors and at least four (**5b**, **5e**, **5g**, **6e**) with promising antitumor activity, with a good safety profile.

Keywords: Thiazolidinones, Adenosine deaminase, Acetylcholinesterase, Glioblastoma multiform, Astrocytes.

Lista de Figuras

Figura 1 Retrossíntese das tiazolidinonas propostas	16
Figura 2 Estrutura geral das 1,3-tiazolidin-4-onas	16
Figura 3 Metodologias sintéticas das 1,3-tiazolidin-4-onas.....	18
Figura 4 Estrutura geral de 1,3-tiazolidin-4-onas sintéticas e seus autores.....	18
Figura 5 Estrutura de fármacos contendo o anel heterociclo tiazolidinona	20
Figura 6 Estrutura da adenosina.....	25
Figura 7 Fármacos anticolinesterásicos presentes no mercado	27
Figura 8 A inflamação como uma das sete marcas do câncer	28
Figura 9 Estrutura da temozolamida (TMZ)	32

Lista de Tabelas

Tabela 1 Informações de patentes recentes que atuam nos TLRs.....	24
--	----

Lista de Abreviaturas

A₁R – Receptor de adenosina A₁
A_{2A}R - Receptor de adenosina A_{2A}
A_{2B}R - Receptor de adenosina A_{2B}
A₃R - Receptor de adenosina A₃
AcetilCoA – Acetil Coenzima A
ACh – Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
ADA – Adenosina desaminase
ADRs - Receptores de adenosina
AINES – Anti-inflamatórios não esteroidais
AK – Ceratose Actínica
AMP – Adenosina monofosfato
ATP – Trifosfato de adenosina
CAPS – Síndromes periódicas associadas à criopirina
CFS – Síndrome da fadiga crônica
ChAT – Colina acetiltransferase
CHO – Linhagem celular de ovário de hamster chinês
COX – Cicloxigenase
COX-1 – Cicloxigenase 1
COX-2 – Cicloxigenase 2
DNA – Ácido desoxirribonucleico
FDA – Food and Drug Administration
GBM – Glioblastoma multiforme
GR – Receptores de glicocorticóides
HCV – Vírus da hepatite C
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
HPV – Papiloma vírus humano
IFN-γ – Interferon γ
IL-1 – Interleucina 1
IL-10 – Interleucina 10
IL-1β – Interleucina 1β
IL-2 – Interleucina 2

IL-6 – Interleucina 6
IL-6 – Interleucina 6
IL-8 – Interleucina 8
iNOS – Óxido nítrico sintase induzida
LPS – Lipopolissacarídeo
M1mAChR – Receptor muscarínico M1
M5mAChR – Receptor muscarínico M5
mAChR – Receptores muscarínicos
MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos 1
MIF – Fator inibitório de migração de macrófagos
nAChR – Receptores nicotínicos
NDA – *New Drug Application* – FDA
NF- κ B – Fator nuclear κ B
OMS – Organização Mundial de Saúde
PAMPs – Padrões microbianos associados a patógenos
PGE₂ – Prostaglandina E₂
PGI₂ – Prostaciclina
PGs - Prostaglandinas
PLA₂ – Fosfolipase A₂
PPR – Receptores de reconhecimento padrão
ROS – Espécies reativas de oxigênio
SNC – Sistema nervoso central
TGI – Trato gastro-intestinal
TLRs – Receptores do tipo Toll
TMZ - Temozolamida
TNF- α – Fator de necrose tumoral
TXA₂ – Tromboxano A₂
 α 7nAChR – Receptor nicotínico α 7

Sumário

1. Introdução	13
2. Objetivo Geral	15
Objetivos Específicos.....	15
3. Revisão da Literatura.....	16
Tiazolidinonas	16
Processo Inflamatório e os anti-inflamatórios	19
Adenosina desaminase (ADA).....	24
Acetilcolinesterase (AChE)	26
Microambiente tumoral.....	27
Gliomas e Glioblastoma Multiforme (GBM)	30
4. Artigo Científico	33
5. Conclusão.....	95
6. Referências Bibliográficas	96
7. ANEXO I (Aprovação do comitê de ética em experimentação animal)....	101
8. ANEXO II (Normas “European Journal of Medicinal Chemistry”).....	102

1. Introdução

O processo inflamatório é o principal mecanismo de defesa do organismo em resposta a um estímulo prejudicial, sendo característica importante de várias doenças (KOEBERLE et al, 2014). Caracteriza-se por um processo fisiológico complexo, regulado por múltiplas vias de sinalização e é uma resposta necessária, porém, quando excessiva, pode levar a graves consequências (BRUNTON et al, 2012; KOEBERLE et al, 2014; RADMARK et al, 2014).

Levando em conta a resistência de algumas doenças aos anti-inflamatórios disponíveis, se torna mais importante o desenvolvimento de novos fármacos (HU et al, 2013). As tiazolidin-4-onas, heterociclos de cinco membros contendo nitrogênio, enxofre e uma carbonila, têm demonstrado importantes atividades biológicas, e a principal rota sintética para a síntese desses compostos se dá pela reação entre três componentes: uma amina primária, um aldeído ou cetona e o ácido mercaptoacético. (TRIPATHI et al, 2014). As tiazolidinonas e seus derivados têm ocupado uma posição proeminente no campo da química medicinal e atraído interesse ao longo dos anos (DEEP et al, 2012; NEUENFELDT et al, 2011; TRIPATHI et al, 2014). A versatilidade desses derivados tem revelado propriedades como: anti-inflamatória, antifúngica, antiviral, analgésica, antimicrobiana, anticonvulsivante e antitumoral (BOSENBECKER et al, 2014; NANDAGOKULA et al, 2013; NEUENFELDT et al, 2011). Seu núcleo heterocíclico sozinho ou incorporado a diferentes heterociclos, têm sido reportados por possuir potente ação anti-inflamatória. (TRIPATHI et al, 2014).

Devido aos conhecimentos adquiridos sobre a fisiopatologia dos processos inflamatórios, são sugeridas diferentes estratégias de alvos terapêuticos. Justifica-se, assim, o estímulo para o desenvolvimento de novos fármacos, visando à especificidade em mecanismos que atuem nesse processo (KOEBERLE et al, 2014; TRIPHATI et al, 2014).

Evidências apontam que o sistema purinérgico desempenha importante papel na resposta inflamatória e imunológica, sendo a adenosina de grande importância na modulação da resposta imune. O trifosfato de adenosina (ATP) extracelular possui função pró-inflamatória estimulando a proliferação de linfócitos, induzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias, além de ser interpretado como indicador de dano tecidual em altas concentrações (BOURS et al., 2006; BURNSTOCK, 2002). A

adenosina, por outro lado, desempenha ações opostas, possuindo papel crucial na regulação do processo inflamatório e imune, pois inibe a proliferação de linfócitos e a secreção de citocinas. Os níveis extracelulares são regulados pela atividade da enzima adenosina desaminase (ADA). Dessa forma, a enzima ADA está envolvida na imunidade celular e sua atividade pode ser considerada um biomarcador da resposta imunológica e inflamatória (POLACHINI et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014).

Outro importante mediador é a acetilcolina (ACh), com importante ação no sistema imunológico e nas células sanguíneas. As células imunes possuem um sistema colinérgico completo e os linfócitos possuem um sistema não neuronal independente. A ACh produzida nos linfócitos atua como imunomodulador, e inibidores da acetilcolinesterase (AChE) aumentam sua concentração extracelular, tornando-a disponível para interagir com seus receptores. (KAMAL et al, 2009). A atuação da ACh em receptores nicotínicos de células inflamatórias, como macrófagos, tem sido relacionada à supressão da inflamação através da diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias. Dessa forma, a AChE possui importante papel na resposta imune e na diminuição do processo inflamatório (COSTA et al, 2012; KAMAL et al, 2009; POLACHINI et al, 2014; RODRIGUES et al, 2014).

A forte relação entre o desenvolvimento de lesões pré-cancerosas e o microambiente inflamatório já é bem evidenciado na literatura. Assim, a presença recorrente de um processo inflamatório em vários tecidos aparentemente induz ou facilita a carcinogênese e a angiogênese tumoral (FERREIRA et al, 2015; RAYBURN et al, 2009). No entanto, ressalta-se que essa relação não é restrita ao risco do desenvolvimento de tumores, tendo em vista que os componentes inflamatórios estão presentes no microambiente tumoral da maioria dos tecidos neoplásicos e que a presença desse infiltrado inflamatório correlaciona-se positivamente com a malignidade e com o pior prognóstico (COLOTTA et al, 2009).

Os fatores chave pelo qual a inflamação crônica poderia levar ao começo e ao crescimento do tumor no microambiente incluem a infiltração de células imunes mononucleares no tecido, a presença de mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas, a destruição tecidual e a ocorrência de remodelamento tecidual e angiogênese (COLOTTA et al, 2009; RAYBURN et al, 2009). Além disso, está amplamente descrita a alta expressão da COX-2 em tumores cerebrais, enzima essa relacionada à inflamação e ao crescimento tumoral, o que contribui com a hipótese do

uso de anti-inflamatórios no controle do progresso tumoral e no aumento da eficácia do tratamento do câncer (FERREIRA et al, 2015; LIU et al, 2013).

Destacam-se dentre os mais diversos tipos tumorais aqueles que afetam o sistema nervoso central (SNC), sendo, dentre as doenças neurológicas, a segunda maior causa de morte (LIU et al, 2013). Os gliomas são os tumores cerebrais primários mais comuns em adultos, destacando-se o glioblastoma multiforme (GBM) como o tumor mais incidente que afeta o SNC e o de pior prognóstico. O GBM possui altas taxas de quimioresistência a terapia atualmente empregada e devido ao padrão de crescimento infiltrativo e a alta taxa de proliferação, a busca por um tratamento eficaz se torna extremamente difícil. Portanto, o prognóstico atual é extremamente desfavorável, onde apenas 3% dos pacientes sobrevivem cinco anos após o diagnóstico (FERREIRA et al, 2015; LIU et al, 2013; SILVEIRA et al, 2013).

Diante do exposto, este trabalho visa unir grupamentos já relacionados a resultados de potencial atividade anti-inflamatória, ou grupamentos de semelhança estrutural a esses, na busca de novas possibilidades terapêuticas eficazes e seguras. Ressalta-se, nesse sentido, a importância da busca por novas moléculas que atuem em alvos terapêuticos proeminentes de processos de extrema importância para os pacientes, os processos inflamatório e tumoral.

2. Objetivo Geral

Avaliar o efeito de diferentes tiazolidinonas derivadas do 4-(metiltio)benzaldeído e do 4-(metilsulfonil)benzaldeído na atividade das enzimas ADA e AChE, bem como seu potencial antitumoral e citotóxico frente a células de linhagem tumoral e células normais.

Objetivos Específicos

- Realizar a síntese de tiazolidinonas inéditas, derivadas do 4-(metiltio)benzaldeído e do 4-(metilsulfonil)benzaldeído (Figura 1).
- Avaliar o efeito *in vitro* das tiazolidinonas propostas na atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e adenosina desaminase (ADA).
- Avaliar o potencial antitumoral *in vitro* dos compostos em células de linhagem tumoral de glioblastoma multiforme (C-6).
- Analisar a citotoxicidade *in vitro* do tratamento com as tiazolidinonas em linhagem celular de ovário de hamster chinês (CHO) e em astrócitos corticais de ratos.

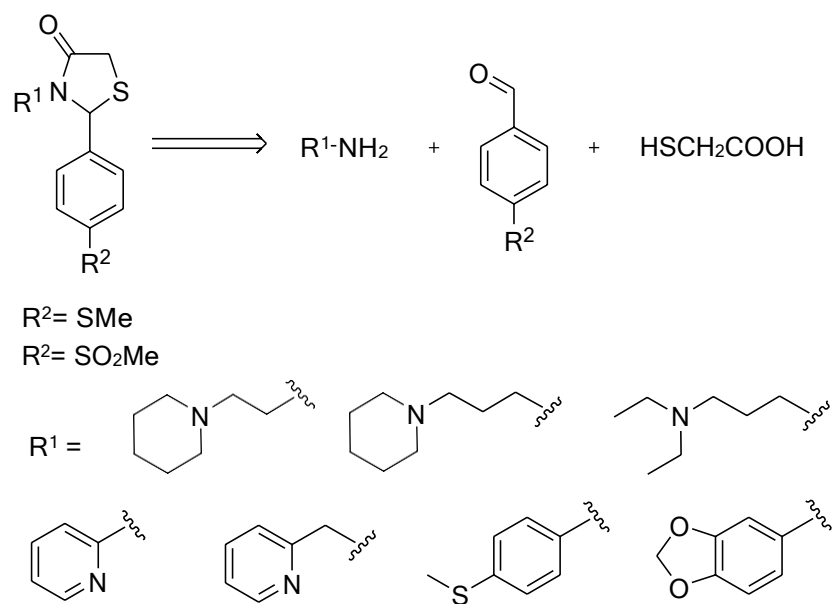


Figura 1. Retrossíntese das tiazolidinonas propostas.

3. Revisão da Literatura

Tiazolidinonas

Os compostos heterocíclicos são de extrema importância para a química medicinal e constituem uma quantia considerável dos fármacos em uso clínico e do que se persegue nessa área ao redor do mundo. Assim, a síntese de novos compostos heterociclos biologicamente ativos chama a atenção dos pesquisadores da área (JAIN et al, 2012; PATRICK, 2009; TRIPATHI et al, 2014).

Existem na literatura diversas moléculas bioativas contendo heterociclos com dois heteroátomos com importantes atividades farmacológicas (BOSENBECKER et al, 2014; KUNZLER et al, 2013). Destacam-se dentre elas as tiazolidinonas, heterociclos de cinco membros contendo um átomo de enxofre na posição 1, um átomo de nitrogênio na posição 3 e uma carbonila na posição 2, 4 ou 5. As 1,3-tiazolidin-4-onas, foco deste trabalho, possuem a carbonila na posição 4 e podem ser derivatizadas nas posições 2, 3 e 5 do anel (Figura 2) (JAIN et al, 2012; NEUENFELDT et al, 2011).

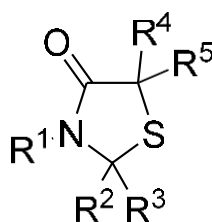


Figura 2. Estrutura geral das 1,3-tiazolidin-4-onas.

A principal rota sintética das 1,3-tiazolidin-4-onas se dá pela reação entre três componentes: uma amina primária, um aldeído ou cetona e o ácido mercaptoacético. Essa reação pode ser realizada tanto em uma como em duas etapas (TRIPATHI et al, 2014). As reações em uma etapa podem ser classificadas como multicomponente (BOSENBECKER et al, 2014; NEVES et al, 2015), adicionando todos os reagentes no começo da reação, e multicomponente *one pot* (MARQUES et al, 2014; MASTELOTO et al, 2015), com a adição posterior do ácido mercaptoacético (Figura 3). Em todos os casos, a reação ocorre pela formação de um intermediário imina, seguido por uma ciclização intramolecular e eliminação de água. O modo mais comum de retirar essa água e possibilitar a formação do produto, se dá por destilação azeotrópica (TRIPATHI et al, 2014).

Através da metodologia de aquecimento térmico convencional, Kunzler et al, 2013, sintetizaram dezesseis 1,3-tiazolidin-4-onas derivadas da 2-aminoetilpiperidina (Figura 4), por reações multicomponente *one pot* (1:1:3, amina;aldeído;ácido), obtendo bons rendimentos, de 53% a 97%. As reações ocorreram em refluxo de tolueno utilizando um *Dean-Stark* para a remoção azeotrópica da água, adicionando excesso de ácido mercaptoacético 2 horas após o início da reação, deixando por mais 3 horas.

De outra forma, utilizando-se de reações multicomponente (1:1:3), Neves et al, 2015 sintetizaram quinze 1,3-tiazolidin-4-onas derivadas da 3-picolilamina (Figura 4), obtendo rendimento de 59% a 97%. A metodologia sintética foi a de aquecimento térmico convencional, através de refluxo de tolueno por 4 horas utilizando um aparato *Dean-Stark*, adicionando todos os reagentes já no começo da reação.

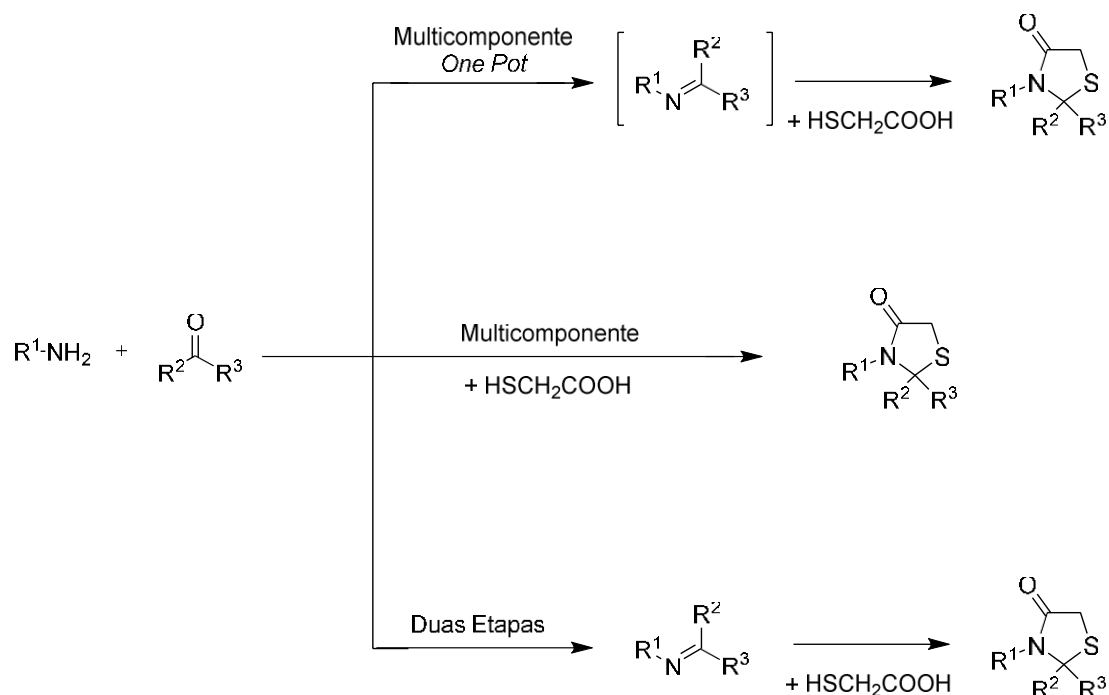


Figura 3. Metodologias sintéticas das 1,3-tiazolidin-4-onas.

Por outro lado, Gouvêa et al, 2012, realizaram a síntese de quinze 1,3-tiazolidin-4-onas derivadas da 2-aminopiridina (Figura 4) a partir de reações multicomponente *one pot* (1:1:1) através da metodologia de aquecimento térmico convencional. Para a obtenção dos produtos, devido à baixa nucleofilicidade da 2-aminopiridina, necessitou-se de um ácido de Lewis como catalizador, o $\text{BF}_3\text{:MeOH}$ 50%. Assim, a reação entre amina, aldeído e o $\text{BF}_3\text{:MeOH}$ (10 gotas) ocorreu por 3 horas em refluxo de tolueno usando um *Dean-Stark*, com posterior adição do ácido mercaptoacético, deixando até o consumo total dos reagentes, totalizando 16 horas.

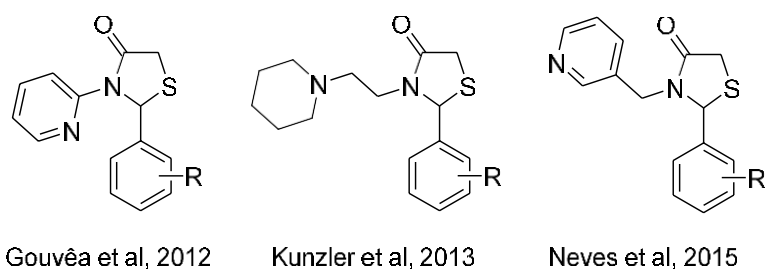


Figura 4. Estrutura geral de 1,3-tiazolidin-4-onas sintéticas e seus autores.

Os derivados tiazolidinonas têm se demonstrado biologicamente ativos através de diversas atividades, como anti-inflamatória, antitumoral, antiviral, antidiabética, antiparasitária, entre outras (JAIN et al, 2012; TRIPATHI et al, 2014). Além disso, existem fármacos como o anti-hipertensivo etozoline, o antidiabético pioglitazona e o

anticonvulsivante ralitoline, que contém em sua estrutura o anel tiazolidinona (Figura 5) (JAIN et al, 2012).

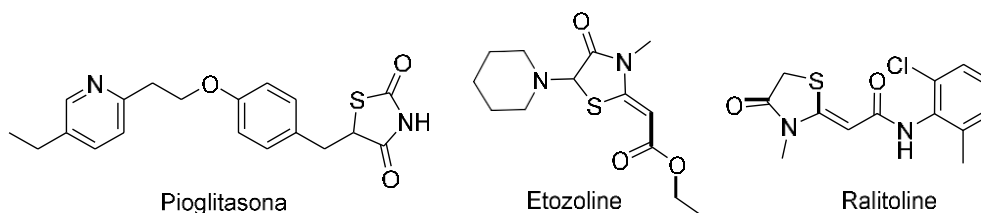


Figura 5. Estrutura de fármacos contendo o anel heterociclo tiazolidinona.

Nesse sentido, as tiazolidinonas têm sido reportadas por possuir potente ação anti-inflamatória, inclusive demonstrando ação anti-inflamatória e analgésica com melhor perfil gastrointestinal que os AINES. Vários derivados têm revelado resultados significativos em modelos de inflamação aguda, como o edema de pata e o modelo de pleurisia induzidos por carragenina em ratos (TRIPATHI et al, 2014).

Demonstrando o potencial das 1,3-tiazolidin-4-onas na resposta inflamatória, Hu et al, 2013 observaram em estudo *in vitro*, atividade significativa da maioria dos compostos utilizados na concentração de 10 μ M, na inibição da liberação de TNF- α e IL-6 estimulado com lipopolissacarídeo (LPS) em células RAW 264.7, de macrófagos de ratos. Verificou-se forte inibição na expressão de TNF- α por seis compostos e na expressão de IL-6 pela ação de nove compostos, sendo que cinco inibiram a expressão de ambas. Ressalta-se ainda que os compostos apresentaram resultados melhores que o controle curcumina.

Bons resultados também foram obtidos por Nandagokula et al, 2013, que utilizaram o modelo de edema de pata induzido por carragenina para avaliar a ação anti-inflamatória de 1,3-tiazolidin-4-onas. Nove compostos demonstraram atividade significativa em comparação com o controle, na concentração de 100 mg/kg, via oral. Além disso, vale ressaltar ainda que nove compostos apresentaram atividade significativa na avaliação de atividade analgésica, nessa mesma concentração. De forma importante, cinco compostos apresentaram ambas atividades, anti-inflamatória e analgésica.

Ainda, Shelke et al, 2012 verificaram que sete 1,3-tiazolidin-4-onas apresentaram boa atividade anti-inflamatória no modelo de edema de pata induzido por carragenina, comparando com o controle. Os referidos compostos apresentaram inibições nos edemas de 53.99% a 85.33% na concentração de 40 mg/kg via oral.

Processo Inflamatório e os anti-inflamatórios

A inflamação trata-se da principal resposta a uma lesão tecidual e do principal mecanismo de defesa do organismo em resposta a um estímulo químico ou microbiano, sendo parte importante de várias doenças e podendo ser classificada em inflamação aguda e crônica (FIRESTEIN et al, 2013; KOEBERLE et al, 2014; SHAIKH, 2011). Na fase aguda, é caracterizada pelo aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, levando a um acúmulo de fluídos, leucócitos e mediadores inflamatórios como as citocinas. Já, em sua fase crônica, ocorre o desenvolvimento de respostas contra o patógeno presente no tecido, principalmente através de uma resposta imune celular e humoral específica (SHAIKH, 2011).

Os processos inflamatório e imune caracterizam-se por processos fisiológicos complexos, regulados por múltiplas vias de sinalização, através do reconhecimento de agentes nocivos. Em condições fisiológicas, imunomoduladores têm o papel de limitar a resposta inflamatória, evitando que essa seja excessiva e prejudicial. Portanto, a inflamação é uma resposta necessária, porém, quando excessiva, pode levar a graves consequências. (BRUNTON et al, 2012; KOEBERLE et al, 2014; RADMARK et al, 2014; SHAIKH, 2011). Assim, as estratégias farmacológicas anti-inflamatórias têm se focado em três principais alvos: agonistas dos receptores de glicocorticóides (GR); interferência na biossíntese de eicosanóides; e bloqueio da via de sinalização de citocinas pró-inflamatórias (KOEBERLE et al, 2014).

Os corticóides, imunossupressores e anti-inflamatórios, possuem propriedades anti-inflamatórias atribuídas ao efeito inibitório que exercem sobre a enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), afetando indiretamente a produção de compostos inflamatórios como os eicosanóides. Ainda, sabe-se que os corticóides ligam-se a receptores específicos, atuando de forma agonista aos GR intracelulares, e modulam a expressão gênica, modificando a síntese proteica nos tecidos-alvo, inibindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios e o recrutamento de células inflamatórias (BRUNTON et al, 2012; ERICSON-NEILSEN et al, 2014; SILVA, 2010). Seu uso clínico está relacionado a sua potente ação anti-inflamatória e imunomoduladora, porém causam efeitos colaterais relevantes, principalmente em uso crônico, sendo aplicados clinicamente em patologias como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e asma (ERICSON-NEILSEN et al, 2014).

Os AINES compõem um grupo de fármacos que atuam na biossíntese de eicosanóides a partir do ácido araquidônico. Exercem sua função inibindo principalmente as enzimas ciclo-oxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2), levando a inibição

da síntese de prostaglandinas (PGs) pró-inflamatórias, e são amplamente utilizados pelos seus efeitos anti-inflamatórios, antipiréticos e analgésicos (KOEBERLE et al, 2014). Apesar de possuírem atividades semelhantes, as isoformas da COX possuem funções biológicas distintas (PATRIGNANI et al, 2014). COX-1 é expressa constitutivamente, e é responsável por manter a homeostase e os níveis de PGs citoprotetoras. Atua de forma importante no epitélio do TGI, na musculatura lisa vascular, nas plaquetas e nos túbulos renais (HARRIS et al, 2014).

O gene da COX-2 se mantém silenciado na maioria das células em condições normais. Estímulos inflamatórios aumentam sua transcrição elevando à biossíntese de PGE₂ a níveis 100 vezes maiores que o basal. A amplificação dessa cascata é desencadeada pelo reconhecimento de estímulos pelos receptores do tipo Toll (TLRs) e consequente ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) (HARRIS et al, 2014).

É importante ressaltar que cada prostanóides atua em receptores metabotrópicos específicos. Do ponto de vista patológico, a ativação dos receptores das PGE₂ e PGI₂, principais agentes inflamatórios, aumentam o fluxo sanguíneo, a permeabilidade vascular, e a infiltração de leucócitos no tecido (BRUNTON et al, 2012; PATRIGNANI et al, 2014). Alguns efeitos farmacológicos e adversos dos AINES tradicionais se devem a inibição da produção de PGE₂ e PGI₂. Essas são importantes na hiperalgesia e hipersensibilidade de terminais nervosos, e sua inibição leva a efeitos analgésicos. Por outro lado, atuam na secreção de muco e bicarbonato, na inibição da secreção de ácidos gástricos, e no aumento do fluxo sanguíneo da mucosa do TGI. Como são protetores da mucosa, sua inibição explica o principal efeito colateral da classe (HANDA et al, 2013; PATRIGNANI et al, 2014).

Os coxibs, subclasse conhecida pela seletividade COX-2, possuem um grave efeito tromboembólico, tendo em vista que essa é necessária na manutenção dos níveis de PGI₂ endoteliais, responsável pelo mecanismo de tromboresistência da parede vascular. A inibição da PGI₂, em contraste com a produção de TXA₂ pelas plaquetas a partir da COX-1, causa um desbalanço no sistema cardiovascular, estimulando a agregação plaquetária e a vasoconstrição, aumentando os riscos cardiovasculares. (FITZGERALD, 2004; PATRIGNANI et al, 2014).

Além dos prostanóides, existem outros importantes moduladores dos processos inflamatório e imune, as citocinas. Elas operam de forma crucial em todos estágios que culminam na ativação da inflamação aguda. Células como macrófagos, neutrófilos, *natural killer* e mastócitos, que constituem a resposta imune inata,

apresentam resposta extremamente rápida às citocinas no tecido lesado. Citocinas ativam leucócitos em resposta a estímulos químicos ou microbianos, aumentam a expressão de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais, estimulam a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), a ativação de derivados do ácido araquidônico, como as PGs, que regulam a liberação de citocinas, além de regular a expressão de receptores como os TLRs (FIRESTEIN et al, 2013).

Diversas citocinas desempenham um importante papel na mediação das respostas inflamatórias agudas, porém, a IL-1, TNF- α e IL-6 possuem um papel crucial nesses processos. A IL-1 e o TNF são mediadores inflamatórios extremamente potentes e são as primeiras citocinas induzidas em animais após a aplicação de uma injeção de LPS (FIRESTEIN et al, 2013; SHAIKH, 2011).

A IL-1, tanto na forma α como na β , podem levar ao desenvolvimento de febre pelo aumento da síntese de PGE₂ pelo endotélio vascular do hipotálamo, podem estimular a proliferação de células T e induzir a liberação de histamina em mastócitos no local inflamado. Vale ressaltar que os níveis plasmáticos de IL-1 se encontram aumentados em pacientes com inflamação ativa. Assim como a IL-1, o TNF- α possui diversas propriedades pró-inflamatórias e está envolvido em várias doenças imunomediadas, como doenças intestinais, de pele e das articulações (BRUNTON et al, 2012; SHAIKH, 2011). Pode induzir febre também pela estimulação da PGE₂, bem como por uma ação indireta induzindo a liberação de IL-1. Ainda, ambas citocinas possuem papel importante nas condições inflamatórias da artrite reumatoide, tendo em vista que estimulam a produção de colagenase e PGE₂ pelas células sinoviais, contribuindo assim para a lesão articular (SHAIKH, 2011).

O TNF- α e a IL-1 possuem um efeito secundário na estimulação da síntese de IL-6 em diversas células, essa que é responsável por mediar os efeitos de ambas TNF- α e IL-1 na indução da febre e da resposta aguda, fazendo com que a resposta inflamatória se perpetue através de uma cascata de sinalizações de diversas citocinas com propriedades que se sobrepõem (SHAIKH, 2011). Ainda, cabe salientar a importância da IL-10, conhecida como fator inibitório da síntese de citocinas, por seu potencial anti-inflamatório, por inibir a produção de interferon γ (IFN- γ) e por ser responsável pela ação oposta aos efeitos pró-inflamatórios das citocinas como TNF- α e IL-1 β (FIRESTEIN et al, 2013; SHAIKH, 2011).

Levando em conta a importância das citocinas nos processos patológicos, foram desenvolvidos fármacos que atuem na inibição da ação dessas citocinas,

ressaltando-se os anti-TNF- α e anti-IL-1. O infliximab e o adalimumab são anticorpos monoclonais anti-TNF que ligam-se com alta afinidade pelo TNF- α , evitando que esse ative seus receptores específicos. Há ainda o etanercepte, que embora não seja um anticorpo monoclonal, possui mecanismo de ação semelhante, ligando-se ao TNF- α e impedindo que esse interaja com seus receptores. Esses fármacos foram aprovados para o tratamento de doenças como artrite reumatóide, espondilite anquilosante, psoríase em placa, entre outras, no entanto, todos eles apresentam importantes efeitos tóxicos, pois aumentam o risco de infecções graves, linfomas e outras neoplasias malignas (BRUNTON et al, 2012).

Já foram desenvolvidos também fármacos inibidores da IL-1. O anakinra é um antagonista dos receptores de IL-1 aprovado pelo FDA para o tratamento da artrite reumatóide. Há ainda o canakinumabe, anticorpo monoclonal anti-IL-1 β aprovado para o tratamento das síndromes periódicas associadas à criopirina (CAPS), doenças inflamatórias raras e hereditárias associadas a superprodução de IL-1, como a síndrome de Muckle-Wells (BRUNTON et al, 2012).

Outra importante via de regulação do processo imune e inflamatório, é através de reguladores dos TLRs, que atuam na sinalização de citocinas pró-inflamatórias, que vêm sendo amplamente estudados. (BOTOS et al, 2011; JUNQUERA et al, 2014; YAMAMOTO et al, 2010). Os TLRs são conhecidos por reconhecer padrões microbianos associados a patógenos (PAMPs), desempenhando um importante papel na resposta imune inata, e sendo necessários na efetiva resposta imune adaptativa (HUANG et al, 2008; JUNQUERA et al, 2014).

São conhecidos no organismo humano dez tipos de receptores TLR (TLR-1 ao 10), sendo expressos em células do sistema imune, incluindo os macrófagos e as células dendríticas. Diferentes TLRs apresentam especificidade por determinados PAMPs e levam a uma resposta imune específica (HUANG et al, 2008; JUNQUERA et al, 2014; YAMAMOTO et al, 2010). Os TLRs representam um grupo de receptores do sistema imune inato, os receptores de reconhecimento padrão (PPR), e estão localizados na superfície celular ou em endossomos (BOTOS et al, 2011). Dentre os extracelulares, estão os TLRs de 1 a 6 e TLR10, ativos a componentes de microorganismos. Já, expressos em endossomos ou lisossomos, estão os TLRs 3, 7, 8 e 9, que reconhecem principalmente padrões virais. Com o intuito de melhorar ou suprimir a resposta imune e inflamatória em certas doenças, companhias trabalham no desenvolvimento de fármacos agonistas e antagonistas dos receptores do tipo Toll.

Na Tabela 1, podem-se observar patentes recentes que ainda não alcançaram a condição clínica (JUNQUERA et al, 2014; YAMAMOTO et al, 2010).

Tabela 1. Informações de patentes recentes que atuam nos TLRs (Adaptado de Junquera et al, 2014). HIV, vírus da imunodeficiência humana; CFS, Síndrome da fadiga crônica; NDA, *New Drug Application* - FDA; HPV, Papiloma vírus humano; AK, Ceratose Actínica; HCV, vírus da hepatite C.

TLR alvo	Indicação	Atividade	Descrição	Estado Clínico
TLR3	HIV, CFS	Agonista	PolyC12U (Ampligen)	Fase IIb (HIV); Pedido no NDA (CFS)
TLR4	Choque Séptico	Antagonista	E5564 (Eritoran)	Fase III
TLR4	Choque Séptico	Antagonista	TAK-242 (Resatorvid)	Fase III
TLR7	HPV	Agonista	852 ^a	Fase II
TLR7	HPV, AK, HCV	Agonista	Imidazoquinoline (Aldara)	Aprovado (HPV e AK); Fase II (HCV)
TLR9	HCV	Agonista	IMO-2125	Fase I
TLR7 e 9	Disordens Autoimunes	Antagonista	CpG ODN (DV 1079)	Fase Pré-clínica
TLR7, 8 e 9	Disordens Autoimunes	Antagonista	CpG 52364	Fase I

Dessa forma, os TLRs são capazes de reconhecer uma variedade de patógenos, sendo importantes na rápida resposta inflamatória, a fim de bloquear a disseminação do agente infeccioso (BOTOS et al, 2011). Quando estimulados, iniciam uma cascata de sinalização envolvendo proteínas adaptadoras, que ativam fatores de transcrição e controlam a expressão genes, levando a produção de mediadores pró-inflamatórios (JUNQUERA et al, 2014; YAMAMOTO et al, 2010).

Tendo contextualizado a ampla complexidade dos processos inflamatório e imune envolvidos nas diversas patologias que afetam o organismo humano, e após abordar o que há no mercado e o que vem sendo pesquisado do ponto de vista farmacológico para o tratamento desses processos e patologias, serão abordadas a seguir diferentes vias de interesse relacionadas ao desenvolvimento deste trabalho. Serão ressaltadas a importância do sistema purinérgico e da enzima ADA, bem como do sistema colinérgico e da enzima AChE para o processo inflamatório, além de salientar a importância desse processo no microambiente tumoral e abordar sobre as especificidades dos gliomas e especificamente do glioblastoma multiforme.

Adenosina desaminase (ADA)

O sistema purinérgico contribui para a resposta inflamatória e imunológica. O ATP extracelular possui função pró-inflamatória atuando na estimulação e proliferação de linfócitos, além de induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, IL-1 β , IFN- γ e TNF- α em macrófagos e linfócitos (BOURS et al., 2006). A adenosina (Figura 6) é um nucleosídeo de purina com importante ação no processo inflamatório, atuando como um mediador intracelular. É um regulador secretado por células mononucleares e produzido pelo metabolismo do ATP, através da ação das ectonucleotidases, com função em diferentes alvos no organismo (BRUZZESE et al, 2014; KUMAR, 2013; ZAVIALOV et al, 2010).

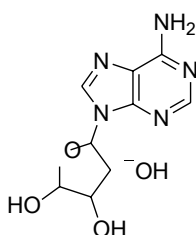


Figura 6. Estrutura da adenosina.

Assim que é liberada, a adenosina liga-se a receptores de adenosina (ADRs), que são receptores acoplados a proteína G. Existem quatro diferentes receptores ADRs (A₁R, A_{2A}R, A_{2B}R e A₃R) que são expressos na maioria das células em diferentes proporções. Ressalta-se que, em condições fisiológicas, a adenosina se encontra em concentrações muito baixas, no entanto aumenta de forma rápida em quadros de estresse metabólico, como inflamação, dano tecidual e câncer. A atuação nos receptores A_{2A}R e A_{2B}R desencadeiam a ativação da proteína G e consequente ativação da adenilciclase. Já os receptores A₁ e A₃ apresentam o efeito contrário, de inibição. (KUMAR, 2013; ZAVIALOV et al, 2010). Estudos já demonstraram que a ligação da adenosina no receptor A_{2A}R leva ao aumento dos níveis de AMP cíclico pelo estímulo da adenilciclase e da proteína G. Logo após, esse AMP cíclico ativa a proteína quinase A, capaz de regular uma série de processos biológicos (BRUZZESE et al, 2014).

O excesso de adenosina é controlado pela ADA que se encontra no interior da célula ou associada a proteína CD26 na membrana celular, e realiza a degradação de adenosina em inosina (BRUZZESE et al, 2014). São conhecidas duas isoformas da enzima ADA, ADA1 e ADA2, sendo ambas encontradas em humanos com atividades catalíticas semelhantes. A principal função da ADA1 é a de eliminar o excesso de adenosina potencialmente tóxico, protegendo, assim, as células da apoptose. A

ADA2, embora ainda apresente carências de estudos quanto às suas propriedades bioquímicas, sabe-se dos baixíssimos níveis dessa no plasma e da distribuição restrita aos monócitos. Há relatos de que a ADA2 expressa sua atividade apenas em condições de altos níveis de adenosina e baixo pH, condições essas associadas a crescimentos tumorais, à hipóxia e à inflamação (ZAVIALOV et al, 2010).

Portanto, a adenosina desempenha um papel crucial na regulação do processo inflamatório e imune, pois inibe a proliferação de linfócitos e a secreção de citocinas. Os níveis extracelulares de adenosina são regulados pela atividade da ADA, assim, essa enzima está envolvida na imunidade celular e sua atividade poderia ser considerada um biomarcador da resposta imunológica e inflamatória (POLACHINI et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014).

Acetilcolinesterase (AChE)

A ACh é outro mediador que a ser considerado, com importante ação no sistema imunológico e nas células sanguíneas (POLACHINI et al, 2014). Tem sido demonstrada a expressão de receptores nicotínicos (nAChR) e muscarínicos (mAChR) em diversas células imunes, como os linfócitos. Já está bem estabelecido que os linfócitos possuem um sistema colinérgico próprio, expressando os componentes colinérgicos necessários, como a colina acetiltransferase (ChAT), receptores nicotínicos e muscarínicos, e a AChE. Além disso, outras células imunes, como os macrófagos, monócitos e células dendríticas, também apresentam diversos componentes colinérgicos (KAWASHIMA, 2012). Esses dados corroboram o fato de que as células imunes possuem um sistema colinérgico completo e que os linfócitos possuem um sistema não neuronal independente (KAMAL et al, 2009).

A ACh é sintetizada pela ação da enzima ChAT a partir de colina e acetilCoA no citosol do neurônio colinérgico pré-sináptico e pela ChAT e pela carnitina acetiltransferase, em menor quantidade, a nível periférico (KAWASHIMA et al, 2003). Estudos revelaram a importância da atuação da ACh em regular o processo imune a partir dos M1 e M5mAChR e $\alpha 7$ nAChR em células T. Revelou-se o aumento dos níveis de TNF- α , IL-6 e IFN- γ a partir dos M1 e M5mAChR, elevando os níveis de IgG no soro. Já, a ativação dos $\alpha 7$ nAChR diminuíram a expressão de TNF- α , IL-6 e IFN- γ , reduzindo os níveis de IgG (KAWASHIMA, 2012).

A atuação da ACh nos receptores nicotínicos de macrófagos também revelou sua ação anti-inflamatória na diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias

(IL-6, IL-1 β e TNF- α) (POLACHINI et al, 2014; RODRIGUES et al, 2014). Dessa forma, a ACh produzida nos linfócitos atua como um imunomodulador e inibidores da AChE aumentam sua concentração extracelular, tornando-a disponível para interagir com receptores nicotínicos expressos em linfócitos. (KAMAL et al, 2009).

A ACh revelou importante papel na supressão da inflamação, diminuindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias em modelo de endotoxemia, mediada por $\alpha 7$ nAChR de macrófagos (COSTA et al, 2012). Alguns trabalhos já reportaram a supressão de diversas reações inflamatórias por inibidores da AChE, como por exemplo a inibição da proliferação de linfócitos pela ativação dos receptores nicotínicos. Ainda, demonstrou-se uma significativa redução na produção de TNF- α e de IL-1 β , sem afetar a liberação de IL-10, anti-inflamatória (KAMAL et al, 2009).

Há no mercado fármacos anticolinesterásicos para o tratamento de doenças como o Alzheimer e a Miastenia gravis. Dentre eles estão a tacrina, primeiro fármaco aprovado para o tratamento do Alzheimer com elevada incidência de efeitos colaterais, a donepezila e a rivastigmina (Figura 7), com efeitos adversos relacionados a estimulação colinérgica excessiva (BRUNTON et al, 2012).

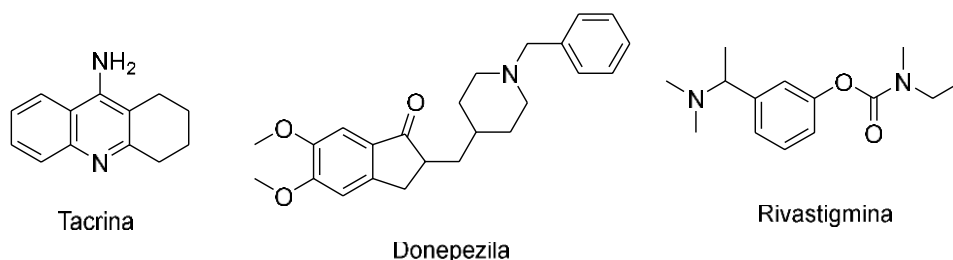


Figura 7. Fármacos anticolinesterásicos presentes no mercado.

Dessa forma, a AChE, responsável pela rápida hidrólise da ACh em colina e ácido acético, também possui importante papel na resposta imune e na diminuição do processo inflamatório. Portanto, sua inibição pode estar relacionada ao aumento dos níveis de ACh, atenuando, assim, o processo inflamatório (POLACHINI et al.; 2014; RODRIGUES et al.; 2014).

Microambiente tumoral

A forte correlação entre a inflamação, o sistema imune e o desenvolvimento de lesões cancerosas não se trata de uma hipótese nova (COUSSENS et al, 2002; RAYBURN et al, 2009). Sabe-se ainda que essa relação não é importante apenas no estabelecimento do tumor, pois mediadores inflamatórios são amplamente

evidenciados na maioria dos tecidos neoplásicos, mesmo naqueles sem um claro processo inflamatório como causa relacionada (COLOTTA et al, 2009; COUSSENS et al, 2002; RAYBURN et al, 2009). Vale ressaltar a vasta informação evidenciando o papel chave da inflamação no desenvolvimento, progresso e agressividade dos mais variados gêneros tumorais, sendo considerada a sétima marca do câncer (Figura 8) (COLOTTA et al, 2009; RAYBURN et al, 2009).

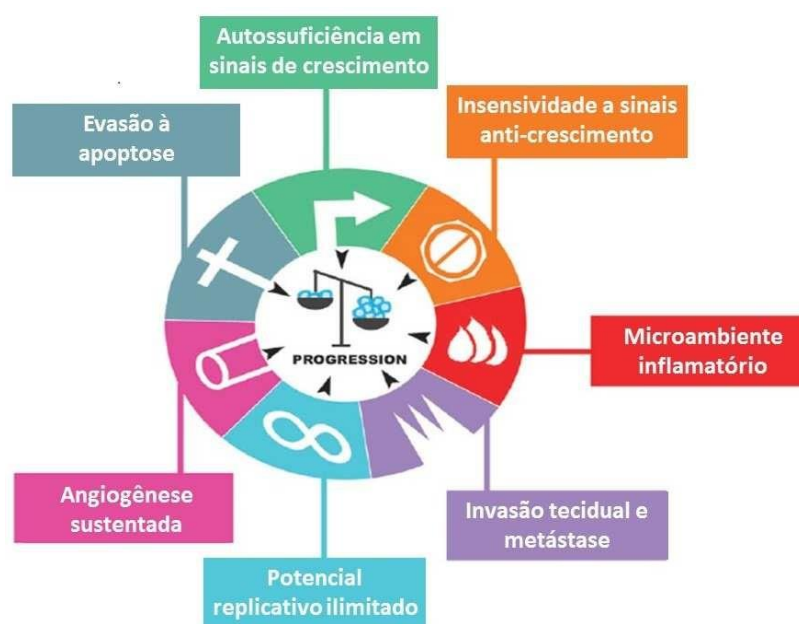


Figura 8. As sete marcas do câncer (Adaptado de Colotta et al, 2009).

Em um tecido normal, a resposta a uma lesão tecidual se dá através de uma série de vias de sinalização química, envolvendo ativação e migração de leucócitos (neutrófilos, monócitos e eosinófilos) para o tecido, tendo ainda os mastócitos uma função significativa para curar o tecido afetado. A primeira célula efetora recrutada na resposta inflamatória aguda são os neutrófilos e algumas vezes os eosinófilos. Posteriormente, através de fatores quimiotáticos, são os monócitos que migram e diferenciam-se em macrófagos nos tecidos. Os macrófagos serão a principal fonte de citocinas e fatores de crescimento, afetando as células presentes no microambiente do tecido. Ainda, os mastócitos atuarão liberando mediadores inflamatórios importantes, como citocinas e histamina (COUSSENS et al, 2002).

O processo inflamatório, em condições normais, é autorregulado, pois a produção de fatores e citocinas pró e anti-inflamatórias se encontram em níveis semelhantes. No entanto, a ocorrência de inflamação crônica persistente e a presença de células tumorais iniciam mudanças cruciais que estabelecem um ambiente de suporte para a progressão tumoral. Esse fato se dá pela persistência de fatores

inflamatórios iniciais ou pela falha de mecanismos regulatórios da resposta inflamatória (COUSSENS et al, 2002; JUNTILA et al, 2013).

Estudos têm sugerido que os efeitos do microambiente inflamatório podem facilitar os processos de angiogênese e carcinogênese tumoral, reafirmando que a inflamação é um componente crítico de progressão tumoral (FERREIRA et al, 2015; SILVEIRA et al, 2013; ZOU et al, 2010). Outros estudos sugerem que a inflamação crônica seria um fator de risco a diferentes tumores e facilitariam o progresso do tumor no local (COLOTTA et al, 2009; SILVEIRA et al, 2013; ULRICH et al, 2006).

A fim de elucidar essa hipótese, ressalta-se que é bem descrita a alta expressão da COX, em especial a COX-2, em diversos tecidos tumorais. COX-2 essa extremamente ligada à resposta inflamatória e relacionada com o crescimento tumoral (FERREIRA et al, 2015; LIU et al, 2013; SILVEIRA et al, 2013). A expressão da COX-2, bem como seus produtos, em especial a PGE₂, apresentam efeitos inibitórios na apoptose, estimulam a migração e proliferação celular, regulam a agregação plaquetária e influenciam a angiogênese (LIU et al, 2013; SILVEIRA et al, 2013; ULRICH et al, 2006). A PGE₂ em combinação com outros moduladores, pode contribuir para o recrutamento e expansão de células T regulatórias e de macrófagos associados ao tumor, responsáveis posteriormente por promover e modular o ambiente imunossupressivo em gliomas (SILVEIRA et al, 2013).

É importante ressaltar também que diversos tumores expressam importantes citocinas e quimiocinas e seus receptores, fatores com grande impacto na migração celular, na angiogênese e inclusive no processo de metástase. Ainda, a inflamação crônica leva a superexpressão de moléculas pró-inflamatórias, como as citocinas TNF- α , IL-1 e IL-6, o óxido nítrico sintase induzido (iNOS), as ROS e o NF-K β , mediadores capazes de criar um microambiente favorável ao crescimento de células malignas (COLOTTA et al, 2009; RAYBURN et al, 2009). Por exemplo, em células tumorais, a atividade do NF-kB constitutivo está ligada a expressão de genes inflamatórios, como os que expressam a IL-1 β , IL-6 e COX-2, e também de genes de resistência à apoptose. Salienta-se que essas alterações estão relacionadas com o aumento da malignidade e da quimioresistência tumoral (SILVEIRA et al, 2013).

Já é relatada uma maior expressão de citocinas, como IL-6, IL-8 e IFN- γ , em carcinoma de mama do que em tecido mamário normal (RAYBURN et al, 2009). Em doenças como o câncer, as citocinas atuantes no microambiente é muito importante.

Por exemplo, o TNF- α é capaz de controlar a população celular inflamatória, além de mediar diversos aspectos nesse processo. (COUSSENS et al, 2002).

A partir de vários mediadores, direta ou indiretamente, a resposta inflamatória induz a proliferação celular e leva ao recrutamento de células inflamatórias, como mastócitos e leucócitos, aumentando a liberação de radicais livres, como ROS. Essas ROS vão ser responsáveis por causar dano oxidativo a macromoléculas, reduzindo ainda o reparo ao DNA (COUSSENS et al, 2002; ULRICH et al, 2006). As combinações desses processos vão facilitar a carcinogênese (ULRICH et al, 2006).

Segundo Chen et al, 2008, há um modelo em três etapas em que as células tumorais modulam a seu favor a resposta imune através da liberação de citocinas. Etapa 1: Recrutamento: através de citocinas como a MCP-1 e IL-8, o tumor recruta células imunes para o microambiente tumoral; Etapa 2: Educação: a partir de citocinas como a IL-6, TNF- α e MIF, capazes de regular a diferenciação celular, as células tumorais induzem as células imunes a desempenhar funções de suporte e progressão tumoral; Etapa 3: Resposta: etapa de promoção do crescimento tumoral e do desenvolvimento de tolerância imune, através da produção de citocinas, hormônios e fatores de crescimento pelas células imunes diferenciadas.

Assim, as características que relacionam o câncer à inflamação, especialmente a crônica, incluem: a infiltração de células imunes mononucleares, como macrófagos e linfócitos; os proeminentes macrófagos associados ao tumor; a presença de citocinas e quimiocinas; a ocorrência de remodelamento tecidual; o aumento na angiogênese e na invasividade tumoral; a fibrose; o dano genômico; o aumento da síntese e o rompimento das vias de reparo do DNA; a proliferação celular; e a inibição da apoptose (COLOTTA et al, 2009; RAYBURN et al, 2009; ULRICH et al, 2006). Portanto, entende-se que a inflamação é capaz de promover um ambiente propício ao desenvolvimento e progresso tumoral, além de ser processo chave na mutação e no estabelecimento do tumor (RAYBURN et al, 2009).

Gliomas e Glioblastoma Multiforme (GBM)

A teoria mais recente e mais aceita para explicar a origem dos gliomas se baseia na hipótese de que se originam de transformações oncogênicas no desenvolvimento das células progenitoras neurais, tornando-se células iniciadores de tumor (SINGH et al, 2004). A teoria mais antiga atribui a origem à mutações em

oncogenes de células gliais maduras promovendo assim desdiferenciação celular e o desenvolvimento do tumor (SANAI et al, 2005).

A classificação dos tipos de gliomas baseiam-se em três parâmetros, de acordo com descrições da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2007: o tipo celular, a localização tumoral e o grau de malignidade. Essa classificação é determinante para a escolha da terapia utilizada no tratamento do paciente, que geralmente passa pelo uso de radioterapia e quimioterapia (LOUIS et al, 2007).

Segundo o tipo celular, a classificação é baseada na morfologia histológica e na similaridade das células com as células da glia diferenciadas. Segundo a OMS, os gliomas podem ser astrocitomas, derivados de astrócitos ou precursores, oligodendrocitomas, de oligodendrócitos, e oligoastrocitomas, de linhagem mista. Existem ainda os ependimomas, derivados de células ependimárias ou precursores, que ocorrem com menor frequência (KLEIHUES, 2000).

Outra classificação pela OMS se dá pelo grau de malignidade, onde os gliomas podem ser classificados em graus de I à IV. Os tumores de grau I possuem baixo poder proliferativo, crescimento lento e são curáveis por ressecção cirúrgica (BEHIN et al, 2003; BURGER et al 2000). Os gliomas de grau II possuem baixa atividade proliferativa e crescimento lento, porém são infiltrativos, podendo ser recorrentes após remoção cirúrgica e tornar-se tumores mais agressivos. Os gliomas de grau III e IV são considerados de alto grau e possuem características de agressividade e malignidade, como indiferenciação celular, pleomorfismo celular e alta capacidade proliferativa, apresentando prognóstico extremamente desfavorável (BEHIN et al, 2003). Caracterizados por apresentar evidências histológicas de malignidade, como atipia nuclear e alta atividade mitótica, os tumores de grau III podem rapidamente tornar-se de grau IV. Os tumores de grau IV ou GBM, possuem características de extrema malignidade, sendo os mais letais e mais comuns dentre os gliomas, representando aproximadamente 70% dos diagnósticos de gliomas de alto grau (ROBINS et al, 2007; KANU et al, 2009; VREDENBURGH et al, 2009).

Conhecidos pelo perfil de características infiltrativas e multifocais, o GBM apresenta descontrole da proliferação celular, infiltração difusa, alta resistência a apoptose, angiogênese e elevada instabilidade genômica. Histologicamente, o glioma de grau IV é caracterizado por células neoplásicas pouco diferenciadas com proliferação vascular e necrose em paliçada (HOLLAND, 2001; LAWS JR et al, 1999; SATHORNUSUMETEE et al, 2008 A). A principal característica desse tumor é o

padrão de crescimento multifocal, onde há formação de diversos tumores ao longo do tecido sadio. Esse perfil exemplifica bem a elevada capacidade infiltrativa no parênquima cerebral e é um fator limitante da remoção cirúrgica, auxiliando ainda na rápida progressão e sendo responsável pelos altos índices de recorrência (STUPP et al, 2007; STUPP et al, 2009; YIN et al, 2007). Por outro lado, as metástases são raras e os motivos para isso incluem a falta de circulação linfática no cérebro e a falta de comunicação da barreira hematoencefálica com os espaços intra e extracraniais (ARMSTRONG et al, 2011; SATHORNSUMETTE et al, 2008 B).

O tratamento dos gliomas envolve remoção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, utilizando o pró-fármaco temozolamida (TMZ; Temodal®; Figura 9), agente alquilante que induz danos ao DNA e leva à morte celular (NEWLANDS et al, 1997; SATHORNSUMETTE et al, 2008 B). Mesmo não sendo aplicável a remoção cirúrgica completa, os paciente são submetidos à ressecção cirúrgica máxima, seguida por seis semanas de radioterapia e quimioterapia adjuvante com TMZ por no mínimo seis meses (ASTHAGIRI et al, 2007; MRUGALA et al, 2013).

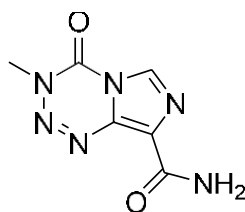


Figura 9. Estrutura da temozolamida (TMZ).

Para o tratamento do tumor maligno, a radioterapia é a mais importante, elevando a sobrevida do paciente de 3 a 4 meses para 7 a 12 meses. Segundo autores, a utilização do TMZ de forma adjuvante a radioterapia aumenta mais a sobrevida dos pacientes, que passa de uma média de 12,1 para 14,6 meses (STUPP et al, 2005). No entanto, já é importante a resistência do GBM ao TMZ, promovida por diversas vias de reparo do DNA. Nesse caso, não há atualmente outros tratamentos para o GBM resistente, levando a um prognóstico extremamente desfavorável ao paciente (OLIVA et al., 2010).

4. Artigo Científico

O artigo a seguir será submetido na revista *European Journal of Medicinal Chemistry* e encontra-se de acordo com as normas da revista, em anexo.

The anticholinesterase and antitumoral potencial effect of 1,3-thiazolidin-4-ones derived from 4-(methylthio)benzaldehyde and 4-(methylsulfonyl)benzaldehyde

Daniel Schuch da Silva^{a,b}

Mayara Sandrielly Pereira Soares^{a,c}

Gabriela Nogueira Debom^{a,c}

Juliana Hofstatter Azambuja^{a,c}

César Emiliano Hoffmann da Silva^{a,b}

Taíse da Rosa Carvalho^{a,c}

Geórgia C. Zimmer^d

Clarissa Piccinin Frizzo^d

Elizandra Braganhol^{a,c}

Roselia Maria Spanevello^{a,c}

Wilson João Cunico Filho^{a,b}

^a*Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.*

^b*Laboratório de Química Aplicada a Bioativos, Centro Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.*

^c*Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.*

^d*Núcleo de Estudos Químicos e Complexidade Molecular (NEOQCOM), Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.*

Corresponding author. Tel.: +55 53 9156-9436 Fax.: + 55 53 53 32757354

E-mail address: wjcunico@yahoo.com.br (Wilson Cunico)

Abstract

The present study assessed the biological potential of fourteen 1,3-thiazolidin-4-ones in inflammatory process, through ADA and AChE inhibition effect, besides the potential anti glioma effect through decreasing of cell viability of glioblastoma multiform cells. The new compounds were efficient synthesized through multicomponent or multicomponent one-pot methodologies in moderate to good yields (22-86%) and were identified by GC/MS and NMR. Five of them were also characterized by HRMS. The compounds **5b** (65.9%), **5c** (65.4%), **6a** (34.3%), **6b** (56.5%) and **6c** (51.0%) presented inhibitory effect of lymphocytic AChE since 50 μ M and the compound **5a** (34.1%) present statistical difference since 100 μ M. Only the same compounds presented ADA activity inhibition, however at high concentrations tested (250 and/or 500 μ M). Assessing the cytotoxicity of these six compounds in CHO cell line (100, 250 e 500 μ M in 48h), five of them presented safe already at 100 μ M. Besides that, several compounds demonstrate significant difference from positive control TMZ in 72h and only one in 48h at 100 μ M in C6 cell line MTT assay. The compounds **5b** (52.2% in 48h; 78.0% in 72h), **5e** (48.0%; 75.0%), **5g** (61.2%; 81.7%) and **6e** (47.2%; 77.0%) were the best results in the screening of inhibition of cell viability and were analyzed at different concentrations (5, 25, 50, 100 and 250 μ M). The compounds **5b** and **5e** presented statistical difference at 5 μ M, **6e** at 25 μ M and **5g** at 50 μ M in 72h of contact. Furthermore, the cytotoxicity study in primary astrocytes cells were evaluated and among fourteen compounds, eight of them were not cytotoxic at 250 μ M, and none presented toxicity at 100 μ M, both in 72h. Therefore, this work achieved fourteen new thiazolidinones, three of them (**5c**, **6b**, **6c**) considered potential acetylcholinesterase inhibitors and at least four (**5b**, **5e**, **5g**, **6e**) with promising antitumor activity, with a good safety profile.

Keywords: thiazolidinones, adenosine deaminase, acetylcholinesterase, Glioblastoma multiform, astrocytes.

1 Introduction

The inflammatory process is indispensable and mostly favorable for healthy organism, represents a defense mechanism in response to prejudicial stimulus and it is important feature of several diseases; however, it can become excessive leading to serious consequences. It's characterized as a complex physiological process, regulated by multiple signaling pathways [1,2]. Due to the acquired knowledge on the pathophysiology of inflammatory processes, there is a stimulus for the development of new drugs that operate in this process [1,3].

It is well established that the purinergic system plays an important role in the inflammatory and immune response [4,5]. Adenosine has a crucial role in the regulation of these processes, acting in inhibiting lymphocyte proliferation and cytokine release. It is secreted by mononuclear cells and produced by ATP metabolism [6,7,8,9]. The action of adenosine in the A_{2A} and A_{2B} receptors ($A_{2A}R$ and $A_{2B}R$) is related to the inflammatory process [6,7]. Under physiological conditions, adenosine is at low concentrations, increasing in frames as inflammation and cancer [7,10]. Extracellular levels of adenosine are regulated by adenosine deaminase (ADA). Thus, ADA is involved in cellular immunity and can be considered a biomarker of the immune and inflammatory response [8,9].

Another important mediator is acetylcholine (ACh), with important action on the immune system and in blood cells. Immune cells possess a whole cholinergic system and lymphocytes has a non-neuronal system independent [11,12]. Studies have shown the importance of ACh in regulating the immune process from $\alpha 7nAChR$ in T cells. It was revealed a decrease in TNF- α , IL-6 and IFN- γ expression, reducing IgG levels [13]. Thus, ACh produced in lymphocytes act as immunomodulator. Acetylcholinesterase (AChE) inhibitors increase its extracellular concentration, making available to interact with its receptors. Authors have reported suppression of inflammatory reactions by AChE inhibitors through the activation of nicotinic receptors. It was demonstrated a significant reduction in TNF- α and IL-1 β production, without affecting IL-10 [11]. Thus, AChE has also an important role in decreasing of immune and inflammatory responses [8,9].

The strong relationship between the development of precancerous lesions and inflammatory microenvironment is well established. So the recurring presence of inflammation in tissues apparently induce or facilitate carcinogenesis and tumor

angiogenesis [14,15]. However this relation is not restricted to risk of developing tumors, considering that inflammatory components are present in microenvironment of most neoplastic tissues and correlate positively with malignancy and worse prognosis [16].

The key factors by which the chronic inflammation could lead to the beginning and tumor growth include infiltration of mononuclear immune cells into the tissue, the presence of inflammatory mediators such as cytokines and chemokines, tissue destruction and the occurrence of tissue remodeling and angiogenesis [15,16]. Further, it is widely described a high expression of COX-2 in brain tumors, contributing to the hypothesis of using anti-inflammatory drugs to the control of tumor progress and enhancing the effectiveness of cancer treatment [14,17].

Central nervous system (CNS) tumors are the second leading cause of death from neurological disease [17]. Among them, gliomas are the most common primary brain tumors in adults, standing out glioblastoma multiform (GBM) as the more prevalent and the worst prognosis among malignant brain tumors. GBMs are chemoresistance to currently used therapy and because of its pattern of infiltrative growth and high rate of proliferation, the effective treatment becomes extremely difficult [14,17,18].

Considering the resistance of some diseases to the available anti-inflammatory therapies, it's important the development of new drugs [19]. Five-membered heterocycles containing nitrogen, sulfur and oxygen, e.g. thiazolidinones, has been extremely investigated to possess important biological activities [20,21]. The thiazolidinones have shown a great versatility of biological properties, like anti-inflammatory, analgesic, antimicrobial, antifungal, anticonvulsant, anti-tumor, among others [21,22,23]. Compounds that have this heterocyclic moiety have been reported to possess potent anti-inflammatory action [19,21,24].

Given the above, this work aims to study new compounds that could be act as a prominent therapeutic targets for inflammatory and tumor processes. In pursuit of new effective and safe therapeutic possibilities, the search of new compounds is very important. Therefore, the objective of this study is synthesize thiazolidinones using seven amines, two arenaldehydes and mercaptoacetic acid. This work also evaluates the effect of such heterocycles against ADA and AChE and its anti-tumor potential in GBM cells.

2 Material and Methods

Chemistry

General

All common reagents and solvents were used as obtained from commercial suppliers without further purification. Reactions progress was monitored by a thin-layer chromatography (TLC) (hexane:ethyl acetate 3:1) and/or by a Shimadzu Gas Chromatograph GC-2010, HP-1 column (cross linked methyl siloxane, 30 m × 0.32 mm × 0.25 µm): Column head pressure, 14 psi, program: T₀ = 60 °C; t₀ = 2.0 min; rate 10.0 °C min⁻¹; T_f = 280 °C; t_f = 13.0 min; Inj. = 250 °C; Det. = 280 °C. The melting points were determined using open capillaries on a Fisatom model 430 apparatus and are uncorrected. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker 250 spectrometer (¹H at 250 MHz and ¹³C at 62.5 MHz), on a Bruker DRX 400 spectrometer (¹H at 400 MHz and ¹³C at 100 MHz), on a Bruker Avance 500 spectrometer (¹H at 500 MHz and ¹³C at 125 MHz), on a Bruker Avance 600 spectrometer (¹H at 600 MHz and ¹³C at 150 MHz), and on a Bruker Avance III 600 MHz (¹H at 600 MHz and ¹³C at 150 MHz), in CDCl₃ containing TMS as an internal standard or DMSO. The mass spectra were obtained on a Shimadzu GCMS-QP2010SE with a split-splitless injector and equipped with a RDX-SMS capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm); helium was used as the carrier gas (56 kPa). The Log P values, or a measure of lipophilicity, was calculated in ChemBioDraw Ultra 13.0 software. Mass spectra were acquired in a GCT-Premier Waters (EI) equipment.

General procedure for the synthesis of thiazolidinones **5a-g** and **6a-g**

The compounds **5a-c** and **6a-c** were obtained according Kunzler *et al*, 2013 [25], **5d** and **6d** were obtained according Gouvêa *et al*, 2012 [26], **5e** and **6e** were obtained according Neves *et al*, 2015 [27] and the compounds **5g** and **6g** were obtained according Masteloto *et al*, 2015 [28].

To obtain the compounds **5f** and **6f**, the reaction proceeds by a mixture of 4-(methylthio)aniline **3f** (1 mmol), arenaldehyde **1** or **2** (1 mmol) and PTSA (5% w/v) in refluxing toluene for 3 hours using a Dean-Stark apparatus. After, was added the mercaptoacetic acid **4** (3 mmol) and the reaction was heated for more 19 hours. For compound **5f**, the organic layer was neutralized with saturated NaHCO₃ (3 x 30 ml),

dried with MgSO_4 and concentrated to obtain the product. For compound **6f**, the mixture was concentrated and the solid compound was filtered off. Both products were purified by column chromatography using hexane:ethyl acetate (8:2) as eluent.

The atom-numbering of synthesized compounds for NMR analyses identification are given in Figure 1.

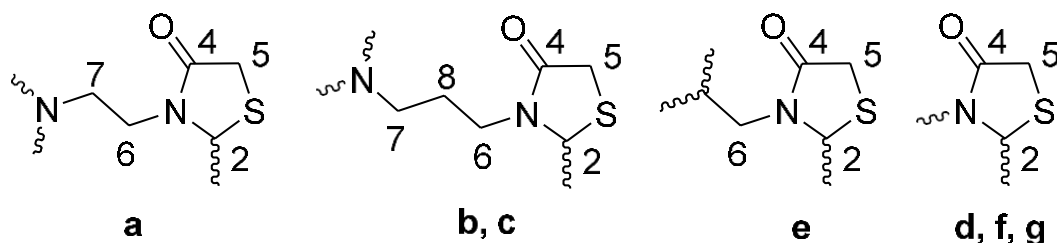


Figure 1. The atom-numbering for synthesized compounds

2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidin-4-one **5a**

Yield: 86,6%; Log P: 3.0; M.p.: 64-66 °C; ^1H NMR δ (CDCl_3 , 600 MHz, ppm, $J_{\text{H-H}}$ = Hz); 7.17 (d, 2H, $^3J=8.5$, Ar); 7.14 (d, 2H, $^3J=8.5$, Ar); 5.80 (d, 1H, $^4J=1.5$, H-2); 3.70 (dd, 1H, $^2J=15.1$, $^4J=1.9$, H-5a); 3.67-3.72 (m, 1H, H-6a); 3.63 (d, 1H, $^2J=15.4$, H-5b); 2.70 (ddd, 1H, $^2J=13.9$, $^3J=6.9$, H-6b); 2.40-2.45 (m, 1H, H-7a); 2.42 (s, 3H, -SCH₃); 2.23 (br, 4H, pip.); 2.20 (ddd, 1H, $^2J=12.4$, $^3J=6.1$, H-7b); 1.47 (quint, 4H, $^3J=5.6$, pip.); 1.34 (br, 2H, pip.). ^{13}C NMR δ (CDCl_3 , 150MHz, ppm, $J_{\text{C-F}}$ = Hz); 171.1 (C-4); 139.8 (Ar); 136.3 (Ar); 127.5 (2C, Ar); 126.6 (2C, Ar); 63.7 (C-2); 56.3 (C-7); 54.5 (2C, pip.); 39.8 (C-6); 32.9 (C-5); 26.0 (2C, pip.); 24.2 (pip.); 15.5 (-SCH₃). MS (70 eV): m/z (%) = 366 (M^+ , 1.7); 252 (0.5); 167 (2); 111 (3); 98 (100); 84 (4).

2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one **5b**

Yield: 64,7%; Log P: 3.11; M.p.: 49-51 °C; ^1H NMR δ (CDCl_3 , 500MHz, ppm, $J_{\text{H-H}}$ = Hz); 7.16 (s, 4H, Ar); 5.60 (s, 1H, H-2); 3.72 (d, 1H, $^2J=15.5$, H-5a); 3.61 (d, 1H, $^2J=15.3$, H-5b); 3.57 (ddd, 1H, $^2J=13.7$, $^3J=6.8$, H-6a); 2.64 (ddd, 1H, $^2J=13.9$, $^3J=6.9$, H-6b); 2.41 (s, 3H, -SCH₃); 2.19-2.24 (m, 5H, H-7a, pip.); 2.11-2.17 (m, 1H, H-7b); 1.59-1.67 (m, 1H, H-8a); 1.52-1.57 (m, 1H, H-8b); 1.48 (quint, 4H, $^3J=5.4$, pip.); 1.35 (br, 2H, pip.). ^{13}C NMR δ (CDCl_3 , 125MHz, ppm, $J_{\text{C-F}}$ = Hz); 171.0 (C-4); 140.0 (Ar); 135.9 (Ar); 127.5 (2C, Ar); 126.5 (2C, Ar); 63.2 (C-2); 56.0 (C-7); 54.3 (2C, pip.); 41.2 (C-6); 32.9 (C-4); 25.7 (2C, pip.); 24.2; 23.9; 15.4 (-SCH₃). MS (70 eV): m/z (%) = 350 (M^+ , 3); 266 (0.6); 127 (5); 112 (3.5); 98 (100); 84 (9). $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{OS}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: calculated 351.1565; found 351.1560.

3-(3-(diethylamino)propyl)-2-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one **5c**

Yield: 29,1%; Log P: 3.05; Oil; ^1H NMR δ (CDCl_3 , 500MHz, ppm, $J_{\text{H-H}} = \text{Hz}$); 7.16 (s, 4H, Ar); 5.58 (d, 1H, $^4J=1.4$, H-2); 3.72 (d, 1H, $^2J=15.5$, H-5a); 3.62 (d, 1H, $^2J=15.5$, H-5b); 3.55 (ddd, 1H, $^2J=14.4$, $^3J=7.3$, H-6a); 2.66 (ddd, 1H, $^2J=13.9$, $^3J=8.4$, $^3J=5.5$, H-6b); 2.42 (q, 4H, $^3J=7.1$, -NEt); 2.41 (s, 3H, -SCH₃); 2.26-2.36 (m, 2H, H-7); 1.56-1.64 (m, 1H, H-8a); 1.46-1.55 (m, 1H, H-8b); 0.91 (t, 6H, $^3J=7.3$, -NEt). ^{13}C NMR δ (CDCl_3 , 100MHz, ppm, $J_{\text{C-F}} = \text{Hz}$); 171.0 (C-4); 140.0 (Ar); 135.9 (Ar); 127.5 (2C, Ar); 126.5 (2C, Ar); 63.2 (C-2); 48.9 (C-7); 46.4 (2C, -NEt); 41.2 (C-6); 32.9 (C-5); 24.2 (C-8); 15.4 (-SCH₃); 11.1 (2C, -NEt). MS (70 eV): m/z (%) = 338 (M^+ , 3); 309 (1.5); 266 (2.5); 115 (3.5); 98 (6); 86 (100); 72 (10). $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{OS}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: calculated 339.1565; found 339.1549.

2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one **5d**

Yield: 35,3%; Log. P: 3.31; M.p.: 109-111 °C; ^1H NMR δ (CDCl_3 , 500MHz, ppm, $J_{\text{H-H}} = \text{Hz}$); 8.16 (dd, 1H, $^3J=4.8$, $^4J=1.1$, pyridin); 7.96 (d, 1H, $^3J=8.4$, pyridin); 7.60 (td, 1H, $^3J=7.9$, $^4J=1.9$, pyridin); 7.14 (d, 2H, $^3J=8.4$, Ar); 7.05 (d, 2H, $^3J=8.4$, Ar); 6.92 (ddd, 1H, $^3J=7.3$, $^3J=4.9$, $^4J=0.7$, pyridin); 6.76 (s, 1H, H-2); 3.93 (dd, 1H, $^2J=16.0$, $^4J=1.1$, H-5a); 3.73 (d, 1H, $^2J=16.0$, H-5b); 2.34 (s, 3H, -SCH₃). ^{13}C NMR δ (CDCl_3 , 125MHz, ppm, $J_{\text{C-F}} = \text{Hz}$); 171.2 (C-4); 150.6; 147.7; 138.5; 137.7; 137.6; 126.6 (2C, Ar); 126.3 (2C, Ar); 120.7; 117.3; 62.6 (C-2); 34.1 (C-5); 15.4 (-SCH₃). MS (70 eV): m/z (%) = 302 (M^+ , 46); 260 (30); 227 (50); 152 (60); 125 (55); 79 (100).

2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(pyridin-2-ylmethyl)thiazolidin-4-one **5e**

Yield: 62,6%; Log. P: 3.09; M.p.: 75-77 °C; ^1H NMR δ (CDCl_3 , 600MHz, ppm, $J_{\text{H-H}} = \text{Hz}$); 8.45 (ddd, 1H, $^3J=4.7$, $^5J=0.8$, pyridin); 7.55 (td, 1H, $^3J=7.6$, $^4J=1.8$, pyridin); 7.08-7.15 (m, 6H, Ar, pyridin); 5.63 (d, 1H, $^4J=1.7$, H-2); 4.97 (d, 1H, $^2J=15.4$, H-6a); 3.80 (dd, 1H, $^2J=15.3$, $^4J=1.9$, H-5a); 3.78 (d, 1H, $^2J=15.3$, H-6b); 3.72 (d, 1H, $^2J=15.6$, H-5b); 2.41 (s, 3H, -SCH₃). ^{13}C NMR δ (CDCl_3 , 150MHz, ppm, $J_{\text{C-F}} = \text{Hz}$); 171.4 (C-4); 155.4; 149.5; 140.0; 136.7; 135.4; 127.8 (2C, Ar); 126.6 (2C, Ar); 122.5; 122.3; 62.1 (C-2); 47.7 (C-6); 32.8 (C-5); 15.4 (-SCH₃). MS (70 eV): m/z (%) = 316 (M^+ , 0.5); 224 (7.5); 167 (4); 152 (9); 93 (100); 79 (3). $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{OS}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: calculated 317.0782; found 317.0765.

2.1.2.6. 2,3-bis(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one **5f**

Yield: 45.6%; Log. P: 4.37; M.p.: 102-105 °C; ^1H NMR δ (CDCl_3 , 600MHz, ppm, $J_{\text{H-H}} = \text{Hz}$); 7.19 (d, 2H, $^3J=7.7$, Ar); 7.14 (d, 4H, $^3J=7.1$, Ar); 7.06 (d, 2H, $^3J=8.0$, Ar); 6.01 (s, 1H, H-2); 3.96 (d, 1H, $^2J=15.9$, H-5a); 3.86 (d, 1H, $^2J=15.9$, H-5b); 2.44 (s, 3H, -SCH₃); 2.41 (s, 3H, -SCH₃). ^{13}C NMR δ (CDCl_3 , 150MHz, ppm, $J_{\text{C-F}} = \text{Hz}$); 171.0 (C-4); 139.8 (Ar); 137.7 (Ar); 135.7 (Ar); 134.3 (Ar); 127.4 (2C, Ar); 126.9 (2C, Ar); 126.3 (2C, Ar); 126.1 (2C, Ar); 65.2 (C-2); 33.4 (C-5); 15.6 (-SCH₃); 15.3 (-SCH₃). MS (70 eV): m/z (%) = 347 (M^+ , 65); 273 (12); 225 (1.5); 178 (100); 169 (30); 135 (85). $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NOS}_3$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: calculated 348.0536; found 348.0551.

3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one **5g**

Yield: 59,7%; Log. P: 3.71; M.p.: 98-100 °C; ^1H NMR δ (DMSO, 600MHz, ppm, $J_{\text{H-H}} = \text{Hz}$); 7.32 (d, 2H, $^3J=8.4$, Ar); 7.15 (d, 2H, $^3J=8.3$, Ar); 6.90 (d, 1H, $^4J=2.0$, Ar); 6.81 (d, 1H, $^3J=8.3$, Ar); 6.71 (dd, 1H, $^3J=8.3$, $^4J=2.0$, Ar); 6.34 (s, 1H, H-2); 5.97 (dd, 2H, $J=8.7$, $J=0.8$, -OCH₂O-); 3.97 (dd, 1H, $^2J=15.7$, $^4J=1.5$, H-5a); 3.85 (d, 1H, $^2J=15.6$, H-5b); 2.42 (s, 3H, -SCH₃). ^{13}C NMR δ (DMSO, 150MHz, ppm, $J_{\text{C-F}} = \text{Hz}$); 170.3 (C-4); 147.1 (Ar); 145.5 (Ar); 138.6 (Ar); 136.1 (Ar); 131.3 (Ar); 127.8 (2C, Ar); 125.4 (2C, Ar); 119.5 (Ar); 107.7 (Ar); 107.3 (Ar); 101.4 (-OCH₂O-); 63.3 (C-2); 32.5 (C-5); 14.1 (-SCH₃). MS (70 eV): m/z (%) = 345 (M^+ , 60); 271 (20); 178 (75); 167 (50); 135 (100); 121 (13).

2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidin-4-one

6a

Yield: 40,2%; Log P: 1.27; Oil; ^1H NMR δ (CDCl_3 , 600MHz, ppm, $J_{\text{H-H}} = \text{Hz}$); 7.96 (d, 2H, $^3J=8.3$, Ar); 7.51 (d, 2H, $^3J=8.2$, Ar); 6.03 (s, 1H, H-2); 3.92 (ddd, 1H, $^2J=13.9$, $^3J=6.6$, H-6a); 3.80 (dd, 1H, $^2J=15.5$, $^4J=1.4$, H-5a); 3.75 (d, 1H, $^2J=15.5$, H-5b); 3.06 (s, 3H, -SO₂CH₃); 2.80 (ddd, 1H, $^2J=13.6$, $^3J=6.6$, H-6b); 2.64 (ddd, 1H, $^2J=12.8$, $^3J=6.4$, H-7a); 2.55 (ddd, 1H, $^2J=12.8$, $^3J=6.4$, H-7b); 2.50 (br, 4H, pip.); 1.62 (quint, 4H, $^3J=5.3$, pip.); 1.46 (br, 2H, pip.). ^{13}C NMR δ (CDCl_3 , 150MHz, ppm, $J_{\text{C-F}} = \text{Hz}$); 171.5 (C-4); 146.2 (Ar); 141.0 (Ar); 128.2 (2C, Ar); 127.8 (2C, Ar); 62.6 (C-2); 55.2 (C-7); 54.1 (2C, pip.); 44.3 (-SO₂CH₃); 38.3 (C-6); 32.6 (C-5); 24.9 (2C, pip.); 23.5 (pip.). MS (70 eV): m/z (%) = 368 (M^+ , 0.7); 199 (0.5); 111 (2); 98 (100); 84 (2).

2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one **6b**

Yield: 35,4%; Log P: 1.37; M.p.: 71-73 °C; ^1H NMR δ (CDCl_3 , 600MHz, ppm, $J_{\text{H-H}}$ = Hz); 7.97 (d, 2H, $^3J=8.3$, Ar); 7.52 (d, 2H, $^3J=8.3$, Ar); 5.84 (d, 1H, $^4J=1.2$, H-2); 3.82 (dd, 1H, $^2J=15.6$, $^4J=1.5$, H-5a); 3.71-3.76 (m, 1H, H-6a); 3.72 (d, 1H, $^2J=15.6$, H-5b); 3.09 (s, 3H, $-\text{SO}_2\text{CH}_3$); 2.69 (ddd, 1H, $^2J=13.8$, $^3J=6.9$, H-6b); 2.33-2.38 (m, 5H, H-7a, pip.); 2.24-2.29 (m, 1H, H-7b); 1.73-1.79 (m, 1H, H-8a); 1.66-1.72 (m, 1H, H-8b); 1.58 (quint, 4H, $^3J=5.6$, pip.); 1.44 (br, 2H, pip.). ^{13}C NMR δ (CDCl_3 , 125MHz, ppm, $J_{\text{C-F}}$ = Hz); 171.2 (C-4); 146.2 (Ar); 141.0 (Ar); 128.2 (2C, Ar); 127.7 (2C, Ar); 62.4 (C-2); 55.6 (C-7); 54.2 (2C, pip.); 44.3 ($-\text{SO}_2\text{CH}_3$); 41.3 (C-6); 32.6 (C-5); 25.5 (2C, pip.); 24.0; 23.7. MS (70 eV): m/z (%) = 382 (M^+ , 2); 298 (0.5); 182 (2); 112 (3.5); 98 (100); 84 (6.5).

3-(3-(diethylamino)propyl)-2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)thiazolidin-4-one **6c**

Yield: 22,3%; Log P: 1.32; Oil; ^1H NMR δ (CDCl_3 , 500MHz, ppm, $J_{\text{H-H}}$ = Hz); 7.90 (d, 2H, $^3J=8.2$, Ar); 7.43 (d, 2H, $^3J=8.3$, Ar); 5.73 (d, 1H, $^4J=1.1$, H-2); 3.75 (dd, 1H, $^2J=15.5$, $^4J=1.6$, H-5a); 3.63-3.69 (m, 1H, H-6a); 3.65 (d, 1H, $^2J=15.5$, H-5b); 3.01 (s, 3H, $-\text{SO}_2\text{CH}_3$); 2.63 (ddd, 1H, $^2J=13.9$, $^3J=8.1$, $^3J=5.8$, H-6b); 2.46 (q, 4H, $^3J=7.1$, -NEt); 2.31-2.40 (m, 2H, H-7); 1.62-1.70 (m, 1H, H-8a); 1.53-1.61 (m, 1H, H-8b); 0.92 (t, 6H, $^3J=7.1$, -NEt). ^{13}C NMR δ (CDCl_3 , 100MHz, ppm, $J_{\text{C-F}}$ = Hz); 171.2 (C-4); 146.2 (Ar); 141.1 (Ar); 128.3 (2C, Ar); 127.7 (2C, Ar); 62.4 (C-2); 49.8 (C-7); 46.3 (2C, -NEt); 44.4 ($-\text{SO}_2\text{CH}_3$); 41.4 (C-6); 32.7 (C-5); 24.2 (C-8); 10.9 (2C, -NEt). MS (70 eV): m/z (%) = 370 (M^+ , 2); 341 (1); 298 (3.5); 98 (4.5); 86 (100); 72 (8).

2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one **6d**

Yield: 42,0%; Log P: 1.58; M.p.: 127-129 °C; ^1H NMR δ (CDCl_3 , 600MHz, ppm, $J_{\text{H-H}}$ = Hz); 8.19 (d, 2H, $^3J=8.6$, pyridin); 7.85 (d, 2H, $^3J=8.3$, Ar); 7.72 (td, 1H, $^3J=7.9$, $^4J=1.7$, pyridin); 7.49 (d, 2H, $^3J=8.3$, Ar); 7.03 (m, 1H, pyridin); 6.91 (s, 1H, H-2); 4.02 (d, 1H, $^2J=16.1$, H-5a); 3.84 (d, 1H, $^2J=16.1$, H-5b); 3.03 (s, 3H, $-\text{SO}_2\text{CH}_3$). ^{13}C NMR δ (CDCl_3 , 150MHz, ppm, $J_{\text{C-F}}$ = Hz); 171.0 (C-4); 150.3; 147.8; 147.6; 139.9; 138.0; 127.9 (2C, Ar); 126.7 (2C, Ar); 120.8; 116.4; 62.0 (C-2); 44.4 ($-\text{SO}_2\text{CH}_3$); 33.9 (C-5). MS (70 eV): m/z (%) = 334 (M^+ , 30); 292 (32); 259 (25); 256 (20); 125 (60); 79 (100).

2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(pyridin-2-ylmethyl)thiazolidin-4-one **6e**

Yield: 83.2%; Log P: 1.35; Oil; ^1H NMR δ (CDCl_3 , 250MHz, ppm, $J_{\text{H-H}}$ = Hz); 8.49 (br, 1H, pyridin); 7.91 (d, 2H, $^3J=7.3$, Ar); 7.64 (q, 1H, $^3J=7.5$, pyridin); 7.48 (d, 2H, $^3J=7.5$, Ar); 7.19 (br, 2H, pyridin); 5.83 (s, 1H, H-2); 5.04 (d, 1H, $^2J=15.0$, H-6a); 3.85 (m, 2H, H-5, H-6b); 3.04 (s, 3H, $-\text{SO}_2\text{CH}_3$). ^{13}C NMR δ (CDCl_3 , 100MHz, ppm, $J_{\text{C-F}}$ = Hz); 171.4 (C-4); 154.9; 149.4; 145.6; 141.0; 136.9; 128.2 (2C, Ar); 128.1 (2C, Ar); 122.8; 122.6; 62.5 (C-2); 48.0 (C-6); 44.3 ($-\text{SO}_2\text{CH}_3$); 32.6 (C-5). MS (70 eV): m/z (%) = 273 (M-75; 2); 194 (1.2); 148 (0.7); 134 (1.2); 93 (100); 79 (2). $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ (M+H) $^+$: calculated 371.1463; found 371.1475.

2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one **6f**

Yield: 82,6%; Log. P 2.64; M.p.: 217-218 °C; ^1H NMR δ (DMSO, 400MHz, ppm, $J_{\text{H-H}}$ = Hz); 7.85 (d, 2H, $^3J=8.4$, $-\text{ArSO}_2\text{CH}_3$); 7.67 (d, 2H, $^3J=8.4$, $-\text{ArSO}_2\text{CH}_3$); 7.31 (d, 2H, $^3J=8.7$, $-\text{ArSCH}_3$); 7.18 (d, 2H, $^3J=8.8$, $-\text{ArSCH}_3$); 6.64 (br, 1H, H-2); 4.07 (dd, 1H, $^2J=15.7$, $^4J=1.5$, H-5a); 3.90 (d, 1H, $^2J=15.7$, H-5b); 3.19 (s, 3H, $-\text{SO}_2\text{CH}_3$); 2.40 (s, 3H, $-\text{SCH}_3$). ^{13}C NMR δ (DMSO, 100MHz, ppm, $J_{\text{C-F}}$ = Hz); 170.4 (C-4); 146.1 (Ar); 140.5 (Ar); 136.5 (Ar); 134.0 (Ar); 127.6 (2C, $-\text{ArSO}_2\text{CH}_3$); 127.4 (2C, $-\text{ArSO}_2\text{CH}_3$); 126.0 (2C, $-\text{ArSCH}_3$); 125.7 (2C, $-\text{ArSCH}_3$); 62.2 (C-2); 43.2 ($-\text{SO}_2\text{CH}_3$); 32.4 (C-5); 14.3 ($-\text{SCH}_3$). MS (70 eV): m/z (%) = 379 (M $^+$, 75); 305 (25); 290 (15); 199 (8); 169 (100); 135 (60).

3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)thiazolidin-4-one **6g**

Yield: 54,0%; Log. P: 1.98; M.p.: 241-243 °C; ^1H NMR δ (DMSO, 600MHz, ppm, $J_{\text{H-H}}$ = Hz); 7.85 (d, 2H, $^3J=8.3$, Ar); 7.67 (d, 2H, $^3J=8.2$, Ar); 6.99 (d, 1H, $^4J=1.9$, Ar); 6.82 (d, 1H, $^3J=8.3$, Ar); 6.77 (dd, 1H, $^3J=8.1$, $^4J=1.9$, Ar); 6.52 (s, 1H, H-2); 5.97 (d, 2H, $J=6.9$, $-\text{OCH}_2\text{O}-$); 4.02 (d, 1H, $^2J=15.7$, H-5a); 3.87 (d, 1H, $^2J=15.7$, H-5b); 3.19 (s, 3H, $-\text{SO}_2\text{CH}_3$). ^{13}C NMR δ (DMSO, 150MHz, ppm, $J_{\text{C-F}}$ = Hz); 170.5 (C-4); 147.3 (Ar); 146.0 (Ar); 145.8 (Ar); 140.6 (Ar); 131.0 (Ar); 127.9 (2C, Ar); 127.4 (2C, Ar); 119.4 (Ar); 108.0 (Ar); 107.2 (Ar); 101.5 ($-\text{OCH}_2\text{O}-$); 62.8 (C-2); 43.2 ($-\text{SO}_2\text{CH}_3$); 32.4 (C-5). MS (70 eV): m/z (%) = 377 (M $^+$, 70); 303 (30); 223 (12); 199 (6); 167 (100); 135 (50); 121 (13).

Animals

Experiments were performed using 1-2 and 60 day-old male Wistar rats. These animals were obtained from the Central Animal Facility of Universidade Federal de Pelotas (Brazil) and were maintained in temperature controlled environment ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), light/dark cycle of 12h, and the diet both solid as water is provided ad libitum to the animals. The protocol was approved by the Ethics Committee and Animal Experimentation of the Universidade Federal de Pelotas, Brazil under the protocol number (CEEA 4975 and CEEA 9219).

Blood serum collection and isolation of lymphocytes

In order to obtain the serum, the blood was collected without anticoagulant and centrifuged at 3500 rpm for 15 min at room temperature. The clot was removed by and the resulting serum for used the biochemical determinations. Lymphocytes were isolated from peripheral blood collected with EDTA and separated on a Ficoll-Histopaque density gradient, according to Boyum et al, 1968 [29].

ADA enzyme assay

The compounds are solubilized in methanol and introduced in the enzymatic assay at final concentrations of 50, 100, 250 and 500 μM . Adenosine deaminase activity in lymphocytes and serum will be measured spectrophotometrically according modified Guisti & Galanti, 1984 [30]. This method is based on the direct production of ammonia when ADA acts in excess of adenosine. The results are expressed in U/L, where one unit of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine in standard test conditions.

AChE enzyme assay

The effects of thiazolidinones in AChE enzyme activity in lymphocytes was determined according to modified Ellman et al, 1961 [31]. The proteins of all samples were adjusted to 0.1–0.2 mg/ml by Coomassie blue method according to Bradford, 1976 [32]. The reading of absorbance was performed on spectrophotometer at 412 nm before and after 30 min of incubation at 27°C . The compounds were tested in concentrations from 50 to 500 μM , the activity of enzyme was calculated from the

quotient between lymphocyte AChE activity and protein content, and results are expressed as μmol of AcSch/h/mg of protein.

General cell culture procedures

The C6 cell line, of malignant glioblastoma multiform of rats, and the CHO cell line, of Chinese hamster ovary, were obtained from American Type of Culture Collection (ATCC). The cell growth and maintenance was promoted in low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 0.1% Fungizone and 100 U/L gentamicin and supplemented with 5% or 10% fetal bovine serum (FBS) respectively. The cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. The culture of primary astrocyte were prepared as described by Da Frota et al, 2009 [33]. In summary, the cortex of neonatal Wistar rats (1-2 days old) were removed and mechanically dissociated in a salt solution with Ca⁺² and Mg⁺² free balanced, pH 7.4. After 10 min of centrifugation (1000 rpm), the pellet was resuspended in DMEM supplemented with 10% FBS. Then, the cells (3×10^4) were plated in 96-well plates. After 4 hours, plates were carefully stirred and washed with phosphate buffered saline (PBS) and the medium was changed. Cultures were allowed growing up to confluence by 20–25 days and the medium was replaced every 4 days.

Cell lines treatment with thiazolidinones

At first, to a screening treatment, all compounds were solubilized in dimethylsulphoxide (DMSO) and were prepared and tested in DMEM at final concentration of 100 μM , using of standard temozolomide in the same concentration (TMZ; Temodal®). The glioma cells were seeded at 5×10^3 cells/well in DMEM/5% FBS in 96-well plates. Cultures were exposed to compounds for 48h and 72h and the control cells were treated with vehicle. Then, the thiazolidinones with four best results in decreasing tumor cell viability, were taken for further tests in various concentrations (5, 25, 50, 100 and 250 μM). These tests followed the same protocol described above.

For cytotoxicity evaluation of six best compounds of AChE inhibitory effect (**5,6a-c**), each thiazolidinone was soluted in DMSO and tested at final concentrations of 100, 250 and 500 μM in CHO cells. The cells were seeded at 5×10^3 cells/well in DMEM/10% FBS in 96-well plates and the culture was exposed to compounds for 48h. The control cells were treated with vehicle. Similarly, analyzing the effects of all molecules on a central nervous system cell of primary astrocytes, each thiazolidinone

was soluted in DMSO and tested at final concentration of 100 and 250 μ M. The cells were seeded at 3×10^4 cells/well in DMEM/10% FBS and the culture was exposed to compounds for 72h, using like negative control vehicle treated cells.

Cell viability assay

To analyze the antitumoral effects of thiazolidinones in C6 glioma cells, such as the cytotoxicity of this compounds in CHO and primary astrocytes cells, was chosen the method witch assess the cell viability, by the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. This method is based on the ability of viable cells to reduce MTT to formazan, a blue solid. The MTT solution was added in the wells with medium in plates with 96 wells at final concentration of 0.5 mg/ml. Then, these plates are brought to the incubator for 90 min at 37°C and a humidified atmosphere with 5% CO₂. After, the medium was removed and the formazan precipitate was shaken with DMSO for 30 min. At 492nm, was measured the optical density of each well, and the results were expressed as absorbance or percentage of inhibition, considering the growth of the control group as 100%.

Statistical analysis

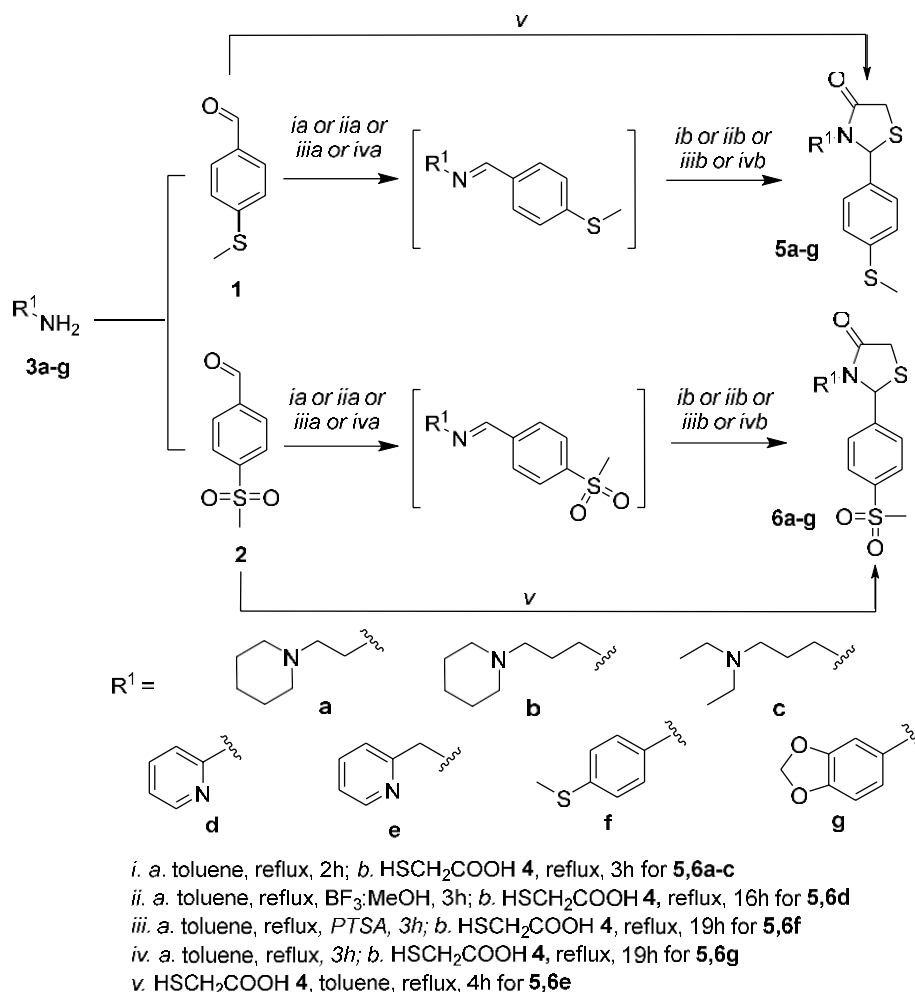
Data were analyzed by using one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test for multiple comparisons in the softwares Graphpad Prism 5 or Statistics 8. Furthermore, all data were expressed as mean $\pm$ standard error and the differences between mean values were considered significant when $P < 0.05$.

3 Results and Discussion

Fourteen new 1,3-thiazolidin-4-ones were synthesized from multicomponent (**5a-d**, **6a-d**, **5f-g** and **6f-g**) or multicomponent one-pot (**5e** and **6e**) reactions between different amines **3a-g**, two different aldehydes **1** or **2** and mercaptoacetic acid **4** (Scheme 1). All reactions were realized through conventional thermal heating methodology, in toluene refluxing using a Dean-Stark apparatus for water removal by azeotropic distillation. All compounds were obtained in regular to good yields and have been properly purified and characterized.

In general, the yields obtained after purification varied from regular to good and the methodologies were considerate efficient, in view of the obtaining of all proposed

products. However, it is understood that different synthetic methodologies must be tested to improve yields and to obtain the products in higher purity without purification. All compounds were identified and characterized by mass spectrometry (GC-MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) of ^1H and ^{13}C . Besides that, the compounds **5b**, **5c**, **5e**, **5f** and **6c** were also characterized by high resolution mass spectrometry (HRMS). It is emphasized that all analyses are in full agreement with the proposed structures.



Scheme 1. Reagents and synthetic conditions of proposal thiazolidinones

It is important to note the difference in lipophilicity of the compounds, where the compounds derivate of 4-(methylthio)benzaldehyde **5** posses the value of Log P clearly higher than derivate of 4-(methylsulfonyl)benzaldehyde **6** (see **2.1.2**). This fact may affect the oral absorption and the penetration of the blood brain barrier. Due to the lower value of lipophilicity, the compounds **6** probably cannot pass through the blood brain barrier, having low or none effect at the level of central nervous system. Differently, the compounds **5** probably presents good effect in SNC.

After the compounds were taken to the enzymatic assays. Firstly, it emphasized that the methanol group didn't reveal any difference from water control group in ADA and AChE assays. On assay of ADA in lymphocytes, five compounds (**5a**, **5b**, **6a**, **6b** and **6c**) present significant inhibition related to water control in the highest tested concentration, 500 μ M. At serum ADA assay, the results were quite similar, where the compounds **5b**, **5c** and **6c** revealed inhibitory effect of ADA at 500 μ M and **5a**, **6a** and **6b** at 250 and 500 μ M. It emphasizes that the compounds **6f** and **6g** were not tested in this protocol due to insolubility in methanol at all tested concentrations. For the same reason, the compounds **5d**, **5f** and **6d** were evaluated at concentrations of 50, 100 and 250 μ M and **5g** only at 50 and 100 μ M (Table 1).

Table 1. Effect of thiazolidinones on serum and lymphocytic ADA.

Comp.	Biological Sample	<i>In vitro</i> ADA activity on serum and lymphocytes - U/l $\pm$ (Std. Error)					
		Water Control	Methanol Control	50 μ M	100 μ M	250 μ M	500 μ M
5a	Serum	24.09 $\pm$ (1.58)	24.44 $\pm$ (1.31)	18.07 $\pm$ (2.61)	16.00 $\pm$ (2.13)	13.81 $\pm$ (2.28) ^a	10.73 $\pm$ (2.42) ^b
	Lymphocytes	30.50 $\pm$ (1.00)	30.93 $\pm$ (1.07)	29.58 $\pm$ (1.71)	29.90 $\pm$ (1.60)	28.31 $\pm$ (1.98)	22.84 $\pm$ (1.22) ^a
5b	Serum	21.76 $\pm$ (0.79)	21.66 $\pm$ (2.07)	17.79 $\pm$ (1.98)	17.22 $\pm$ (2.60)	14.55 $\pm$ (2.11)	11.41 $\pm$ (0.67) ^a
	Lymphocytes	30.50 $\pm$ (1.00)	30.93 $\pm$ (1.07)	31.85 $\pm$ (1.74)	31.62 $\pm$ (1.89)	25.12 $\pm$ (1.21)	19.81 $\pm$ (1.18) ^b
5c	Serum	30.09 $\pm$ (1.24)	29.07 $\pm$ (1.59)	27.88 $\pm$ (1.48)	27.68 $\pm$ (1.53)	23.28 $\pm$ (2.04)	20.11 $\pm$ (1.33) ^b
	Lymphocytes	28.03 $\pm$ (0.91)	28.91 $\pm$ (0.99)	24.67 $\pm$ (0.67)	25.83 $\pm$ (2.04)	24.59 $\pm$ (1.03)	25.30 $\pm$ (0.83)
5d	Serum	25.33 $\pm$ (2.73)	24.76 $\pm$ (0.93)	23.56 $\pm$ (3.04)	22.01 $\pm$ (2.64)	18.72 $\pm$ (3.21)	-
	Lymphocytes	25.03 $\pm$ (0.94)	25.87 $\pm$ (1.11)	25.72 $\pm$ (1.17)	26.91 $\pm$ (1.11)	25.74 $\pm$ (1.30)	-
5e	Serum	28.58 $\pm$ (2.21)	28.03 $\pm$ (1.85)	25.66 $\pm$ (4.20)	23.03 $\pm$ (2.55)	20.13 $\pm$ (2.96)	19.16 $\pm$ (2.30)
	Lymphocytes	25.00 $\pm$ (1.14)	25.41 $\pm$ (1.14)	23.56 $\pm$ (1.01)	24.63 $\pm$ (1.03)	26.02 $\pm$ (0.22)	26.06 $\pm$ (0.78)
5f	Serum	23.84 $\pm$ (0.98)	23.72 $\pm$ (1.29)	21.40 $\pm$ (1.35)	21.93 $\pm$ (1.33)	21.16 $\pm$ (1.26)	-
	Lymphocytes	25.03 $\pm$ (0.94)	25.87 $\pm$ (1.11)	27.96 $\pm$ (1.81)	28.66 $\pm$ (1.74)	27.49 $\pm$ (1.65)	-
5g	Serum	23.84 $\pm$ (0.98)	23.72 $\pm$ (1.29)	24.66 $\pm$ (1.36)	24.70 $\pm$ (1.02)	-	-
	Lymphocytes	25.03 $\pm$ (0.94)	25.87 $\pm$ (1.11)	28.32 $\pm$ (0.59)	29.84 $\pm$ (0.57)	-	-
6a	Serum	23.59 $\pm$ (0.85)	23.49 $\pm$ (2.24)	22.35 $\pm$ (1.39)	20.24 $\pm$ (1.38)	16.81 $\pm$ (0.58) ^a	13.68 $\pm$ (0.33) ^b
	Lymphocytes	28.03 $\pm$ (0.91)	28.91 $\pm$ (0.99)	26.69 $\pm$ (0.45)	26.61 $\pm$ (0.67)	26.07 $\pm$ (1.18)	22.50 $\pm$ (1.42) ^a

6b	Serum	23.59 ± (0.85)	23.49 ± (2.24)	19.75 ± (1.75)	19.39 ± (1.03)	16.97 ± (0.44) ^a	10.24 ± (0.95) ^c
	Lymphocytes	30.50 ± (1.00)	30.93 ± (1.07)	30.08 ± (1.50)	28.45 ± (1.59)	25.89 ± (1.36)	21.53 ± (1.62) ^b
6c	Serum	23.57 ± (2.35)	22.93 ± (2.00)	22.22 ± (2.32)	20.78 ± (1.91)	16.45 ± (1.37)	14.73 ± (1.21) ^a
	Lymphocytes	28.03 ± (0.91)	28.91 ± (0.99)	26.15 ± (0.86)	27.23 ± (0.79)	25.35 ± (0.85)	22.41 ± (1.36) ^a
6d	Serum	23.84 ± (0.98)	23.72 ± (1.29)	21.55 ± (1.26)	22.13 ± (1.80)	22.97 ± (1.80)	-
	Lymphocytes	25.00 ± (1.14)	25.41 ± (1.14)	23.06 ± (1.06)	23.42 ± (0.86)	24.04 ± (0.36)	-
6e	Serum	25.33 ± (2.73)	24.76 ± (0.93)	26.29 ± (2.48)	24.22 ± (2.29)	24.20 ± (1.85)	22.59 ± (2.17)
	Lymphocytes	25.00 ± (1.14)	25.41 ± (1.14)	22.72 ± (1.33)	22.92 ± (1.72)	21.75 ± (2.29)	22.88 ± (1.19)

As regards the effect of the compounds **6f** and **6g** in the AChE activity in lymphocytes, it was also not possible to evaluate due to its insolubility in methanol. For the same reason, **5f** and **5g** were tested only in 50 and 100 μ M and do not show activity. Compounds **5e** and **6e** demonstrate significant inhibitory AChE activity compared to the water control, however just at higher concentration (500 μ M). The thiazolidinones **5a-c** and **6a-c** presented the best activities of AChE inhibition (Figure 2). Compounds **5b** (65.9%), **5c** (65.4%), **6a** (34.3%), **6b** (56.5%) and **6c** (51.0%) presented good inhibitory effect different at 50 μ M. Furthermore, **5a** (34.1%) present statistical difference at 100 μ M. Curiously, the same six molecules with the best results in AChE inhibition were the best results in ADA inhibition.

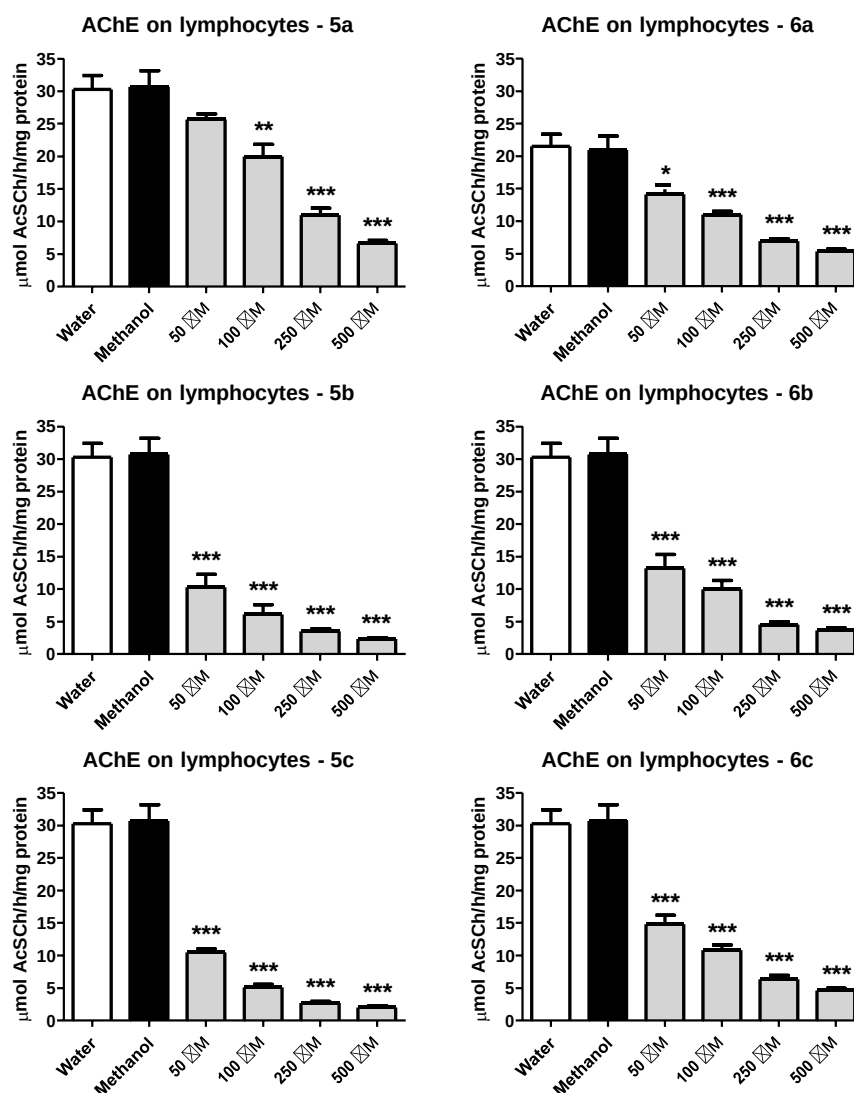


Figure 2. The inhibitory effect of thiazolidinones **5,6a-c** on AChE activity in rat lymphocytes. Bars represent means $\pm$ SEM; *represents statistical difference from water control group, considering $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (One-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test, $n = 5$).

Comparing the structure of active and inactive thiazolidinones in enzyme assays, it is clear the importance of the substituent at the 3-position, derived from the amine used in the reaction. The compounds **5a-c** and **6a-c** revealed high percentage of inhibition of AChE activity and the other compounds didn't reveal any results from inhibition or not as pronounced. It emphasizes the similarity of the substituents at position 3 of these six compounds with the natural substrate acetylcholine (Figure 3). These thiazolidinones have an ethylenic or propylenic carbon chain between the amide nitrogen and the amine nitrogen, similar to ethylenic chain between oxygen ester and tertiary amine nitrogen of acetylcholine.

According to the obtained percentage of inhibition, the compounds with propylenic carbon chain, **5b** (ranging from 65,9%-92,2%), **5c** (65,4%-93,3%), **6b** (56,5%-87,9%) and **6c** (51,0%-84,6%), appears to be more efficient for the AChE inhibition than the compounds **5a** (15,3%-78,0%) and **6a** (34,3%-75,0%) (Figure 3). The aryl group also influence the activities. Generally, the compounds **5**, derivate from 4-(methylthio)benzaldehyde, appears to be more effective than compounds **6**, derivate from 4-(methylsulfonyl)benzaldehyde.

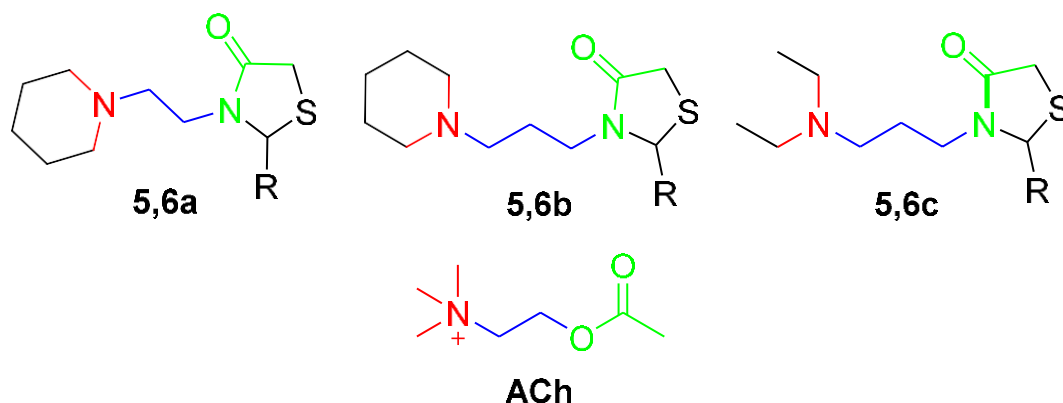


Figure 3. The structural similarity of thiazolidinones and acetylcholine.

Then, the compounds **5a-c** and **6a-c**, with higher inhibitory effect of AChE, were tested in CHO cells for evaluation of cytotoxicity by MTT assay method and the results were demonstrated in Figure 4. It can be seen in the figure that the compounds **6** have not present significant cytotoxicity, apparently demonstrating a safe profile. Only the molecule **6b** at high concentration (500 μ M) present statistical difference comparing to control group. However, compounds **5** were considered by statistical analyses more toxic than compounds **6**. **5a**, **5b** and **5c** decreasing of cell viability of CHO cell at 250 and 500 μ M. Further, the compound **5b** presented cytotoxicity at 100 μ M, the lowest tested concentration.

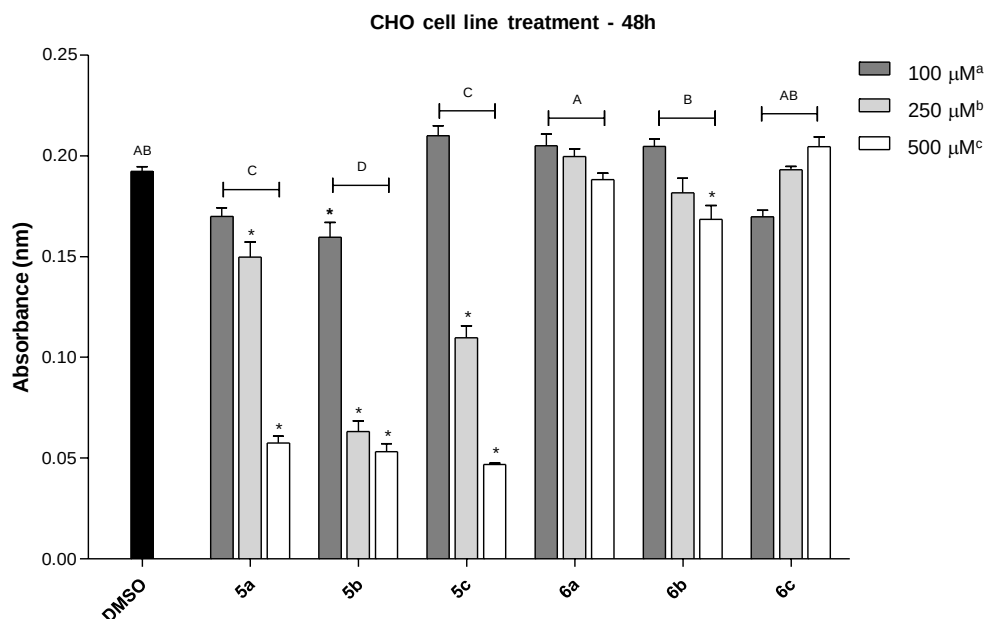


Figure 4. Evaluation of cytotoxicity of thiazolidinones **5,6a-c** in normal CHO cell line by MTT assay in 48h. Capital letters represents statistical difference between all groups (treatment and control) and small letters represents difference between concentrations; *represents statistical difference from DMSO control group, considering $P < 0.05$ (Two-way ANOVA followed by Tukey's test, $n=3$). Bars represent means $\pm$ SEM.

Therefore, in general, the thiazolidinones appears like potential agents for anticholinesterase therapy. It is emphasized a good therapeutic window, because compounds **5c**, **6b** and **6c** demonstrate the good inhibitory activity in lower concentrations tested (50 μM) with good safety, presenting toxicity only in 250 and 500 μM . Compound **5b** with high toxicity should be further analyzed to assess its true risk-benefit.

Then, the study of the antitumor effect of all synthesized thiazolidinones in C6 cell line was carried out. The results of the screening at 100 μM in 48h and 72h of exposure are shown in Figure 5, presented as percentage of cell viability, considering the mean of DMSO control group as 100%.

The compound **5g** (61.2%) was the only that show difference from the positive control TMZ (42.3%) in 48h, however the compounds **5b** (52.2%), **5e** (48.0%) and **6e** (47.2%) also showed good results of inhibition of tumor cell viability at 100 μM . In 72h, all compounds demonstrated difference from DMSO at 100 μM . It is important to note that the compounds **5a** (61.0%), **5b** (78.0%), **5c** (67.5%), **5d** (48.5%), **5e** (75.0%), **5g** (81.7%) and **6e** (77.0%) presents statistical difference from TMZ in 72h.

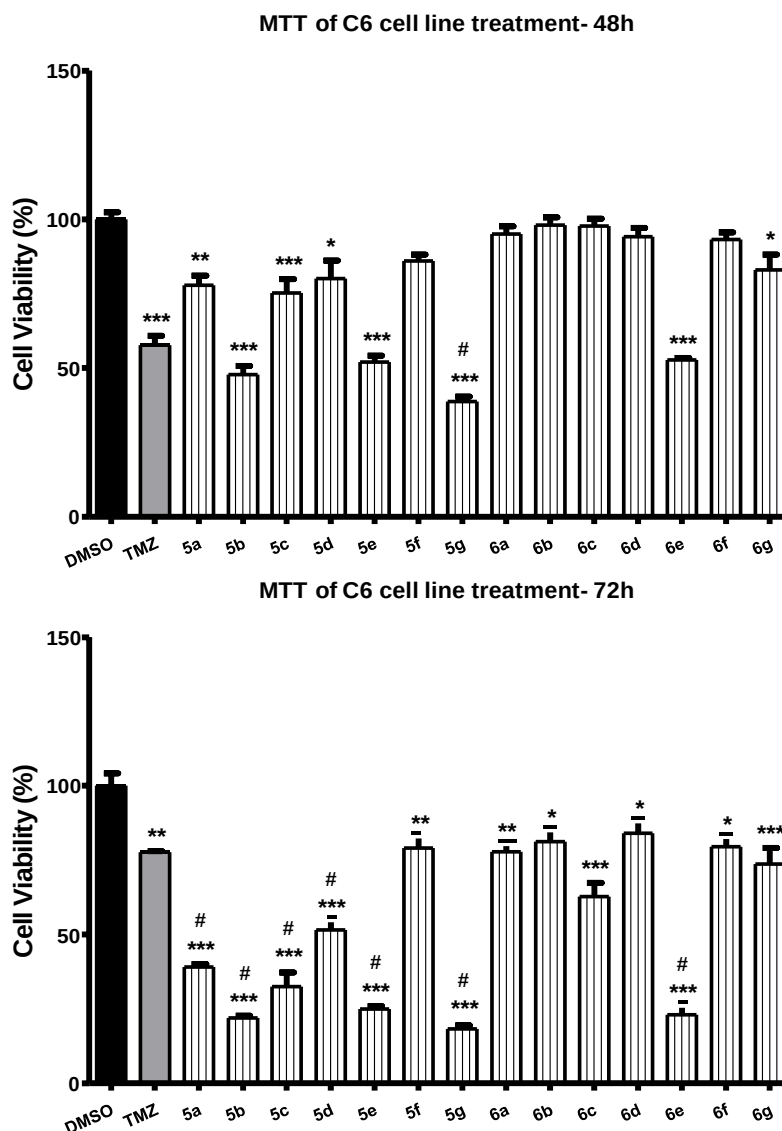


Figure 5. Antitumor Screening at 100 μ M of thiazolidinones proposed in 48h and 72h of exposure. Bars represent means $\pm$ SEM; *represents statistical difference from DMSO control group, considering $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; #represents statistical difference from TMZ (100 μ M) positive control group, considering $P < 0.05$ (One-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test, $n = 4$).

Considering the results of Figure 5, the four best active thiazolidinones **5b**, **5e**, **5g** and **6e** were carried to concentration-responding test, as shown in Figure 6. It can be observed the importance of concentration for the activity in both tested times. In 48h, the compounds **5b** and **5e** presented inhibition since 100 μ M, **5g** since 50 μ M and **6e** since 25 μ M. In 72h, **5g** and **6e** maintained its activity since 50 μ M and 25 μ M, respectively. The best results were found for **5b** and **5e** that presented significant activity at 5 μ M, the lowest concentration tested. These results showed that the time was important for the activity of **5b** and **5e** (see 48h and 72h).

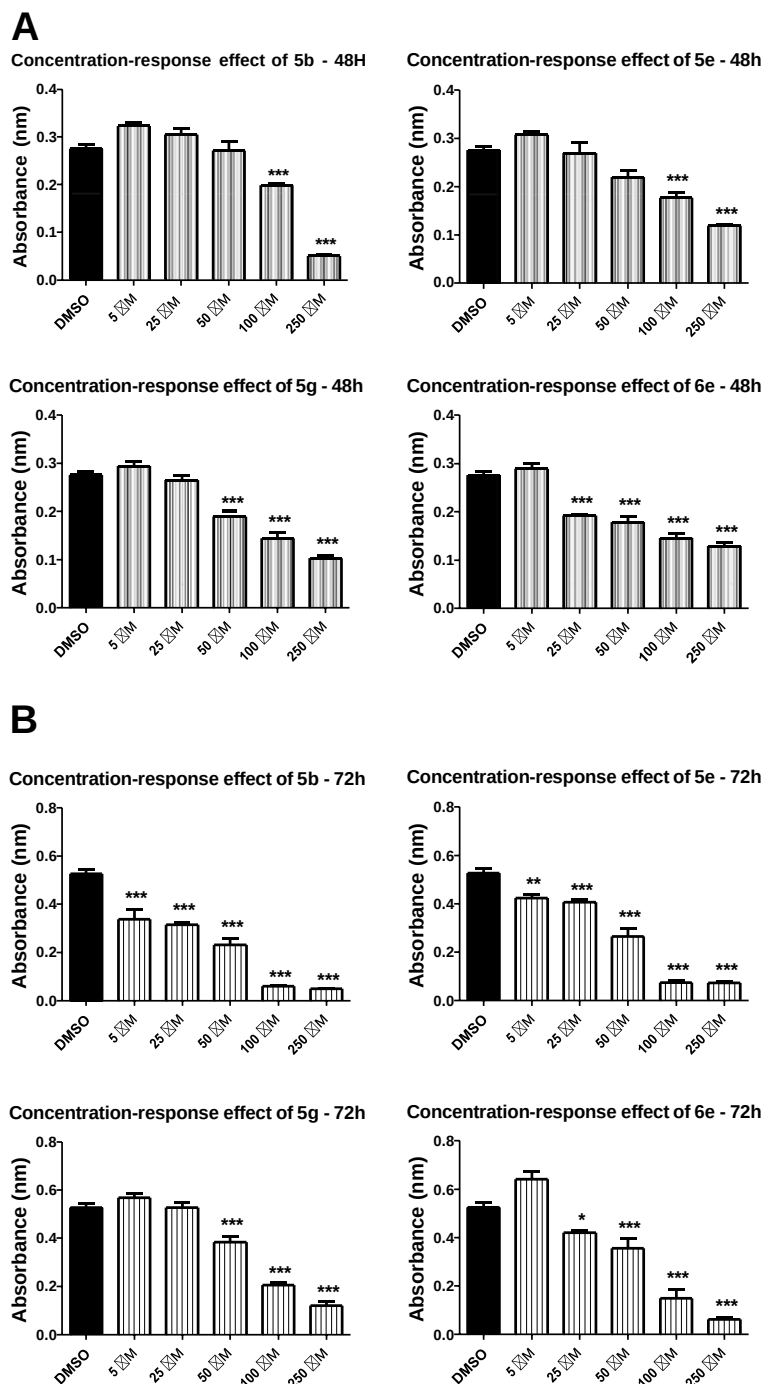


Figure 6. Evaluation of inhibitory effect of different concentrations of thiazolidinones **5b**, **5e**, **5g** and **6e** in cell viability. **A.** C6 cells treatment with different concentrations of **5b**, **5e**, **5g** and **6e** in 48h **B.** C6 cells treatment with different concentrations of **5b**, **5e**, **5g** and **6e** in 72h. Bars represent means $\pm$ SEM; *represents statistical difference from DMSO group, $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (One-way ANOVA followed by Tukey's test, $n = 4$).

These results reinforce the potential of 1,3-thiazolidin-4-ones as antitumor agents, according to reviewed by Jain et al, 2012 [34], and Tripathi et al, 2014 [3]. A

large number of thiazolidinone derivatives with the most different substituents have been reported in the literature for possess potential antitumor activity, but is uncommon the study against glioma cells [3,34].

In general, it's clear the importance of 2-(4-methylthio)phenyl group (**5**) once these compounds demonstrated better results than compounds **6** (2-(4-methylsulfonyl)phenyl). From seven different amines studied, four of the best compounds have propylpiperidine (**b**), benzo-3,4-methylenedioxi (**g**) or methylpyridine (**e**) moieties. It can be noted that the substituent 3-methylpyridin-2-yl (**e**) could be important for antitumor action, in view of the two compounds (**5e** and **6e**) that possess this substituent are among the top four. Furthermore, the compound **6e** was clearly the best compound of series **6**, demonstrating the importance of this group to the activity.

It emphasized that there was reported in the literature thiazolidinone with pyridine core with good anti-tumor effect [35], groups contained in compounds **5e** and **6e**. Thus, another authors reported thiazolidinones derivated from diethylaminopropylamine, similar to aminoethylpiperidine used for obtaining of compound **5b**, also with good anti-tumor activity [36]. These compounds also contained the benzo-3,4-methylenedioxy core, which are present in compound **5g**.

In addition, it was evaluated the cytotoxic effect of all compounds through the MTT assay in primary astrocytes cells, to verified the therapeutic window. Figure 3 shows that ten of fourteen compounds do not present statistical differences from DMSO in 72h at 250 μ M. However, the compounds **5a**, **5b**, **5c** and **6c** were cytotoxic at this concentration. It emphasized that none compound present any cytotoxicity at 100 μ M, demonstrating clearly safe profile at this concentration. Three of the top four in antitumor test were not cytotoxic in these analysis (**5e**, **5g** and **6e**) and only **5b** was considerate toxic to normal cell, however just at 250 μ M.

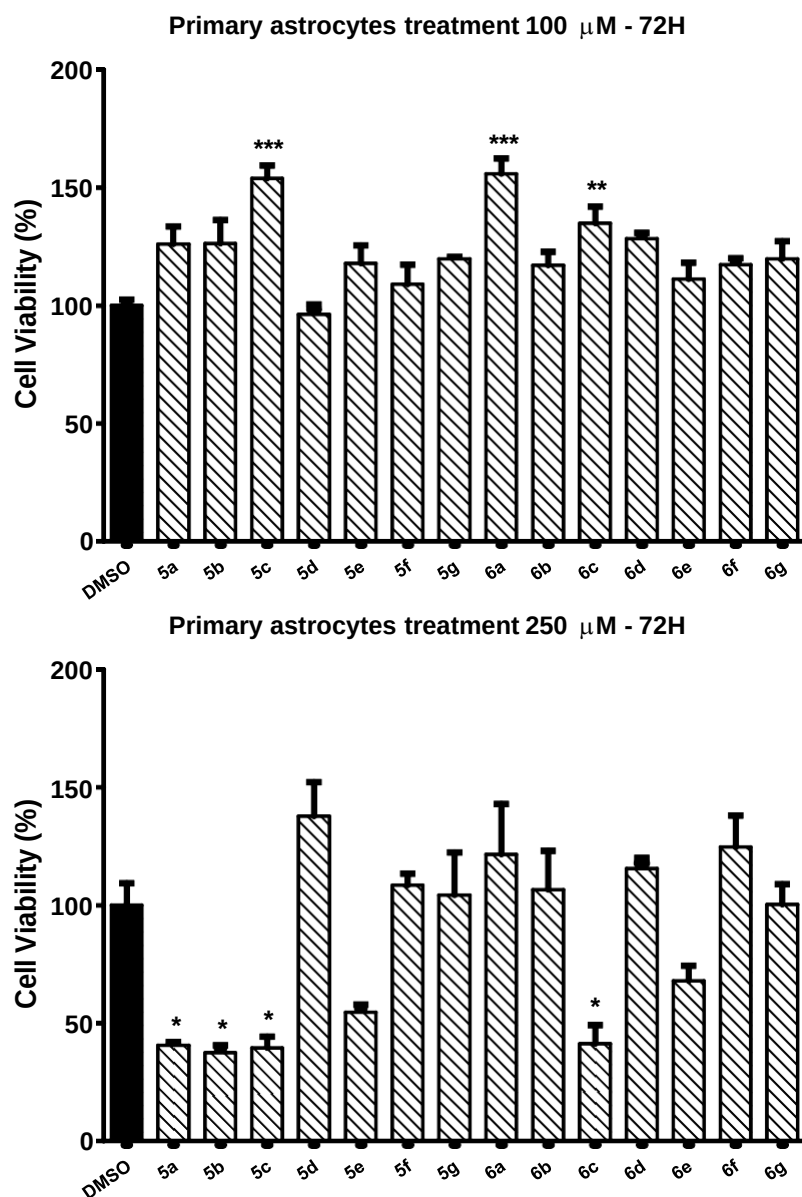


Figure 7. Evaluation of treatment of astrocytes cells with proposal thiazolidinones at 100 μ M and 250 μ M in 72h. *represents statistical difference from DMSO control group, considering $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (One-way ANOVA followed by Tukey's test, $n=3$). Bars represent means $\pm$ SEM.

Thereby, the antitumor assay discovered at least four potential compounds to glioma therapy. These compounds will continue to be investigated and further tests will be carried out, including *in vivo* tests. Both the toxicity of **5b** and low lipophilicity of **6e** could be adjusted by pharmacological or biotechnological techniques, including nanocapsules to try resolve these problems.

4 Conclusions

It's important to highlight the achievement of fourteen new thiazolidinones that are fully identified and characterized. All reaction conditions were efficient for the synthesis of desire compounds. Considering the best thiazolidinones in lymphocytic AChE and in CHO MTT assays, three compounds (**5c**, **6b**, **6c**) were considered potential acetylcholinesterase inhibitors with safe action. Only a few compounds presented inhibitory effect in ADA assay, however just at high concentrations. Taking into account the obtained results in antitumor evaluation, at least four compounds (**5b**, **5e**, **5g**, **6e**) may be placed as potential agent for glioma treatment. The prognosis and chemoresistance to therapy of GBM makes it extremely relevant to search for new therapeutic agents, including thiazolidinones and the synthesized compounds demonstrate excellent potential anti glioma with significant inhibition in low doses.

Lastly, studies are needed to evaluate correctly mechanism of AChE inhibition and mechanism of cell death. Furthermore, the structure-activity relationship should be more evaluated to study the pharmacophore core. Then it is emphasized that new studies have been grounded, including *in vivo* trials to confirm the potential of these thiazolidinones as safe therapeutic agents with anticholinesterase and/or antitumor effect.

Supplementary Information

The supplementary information contains the GC/MS and ^1H and ^{13}C NMR spectra of all synthesized compounds, besides that, HRMS analyses and the results of ADA assay.

Acknowledgements

The authors thank UFPel and FAPERGS (proc. 11/2068-7) for financial support. Fellowships granted to D.S.S. by CAPES/FAPERGS and W.C. and R.M.S. by CNPq.

References

1. KOEBERLE, A.; WERZ, O. Multi-target approach for natural products in inflammation, *Drug Discovery Today*. (2014) 1-12;
2. RADMARK, O. et al. 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease, *Biochimica et Biophysica Acta*. (2014) 1-9;
3. TRIPATHI, A.C. et al. 4-Thiazolidinones: The advances continue... *European Journal of Medicinal Chemistry*. 72 (2014) 52-77;
4. BOURS, M.J. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*. 112 (2006) 358–404;
5. BURNSTOCK, G. Purinergic Signaling and Vascular Cell Proliferation and Death. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 22 (2002) 364-373;
6. BRUZZESE, L. et al. NF- κ B enhances hypoxia-driven T-cell immunosuppression via upregulation of adenosine A2A receptors. *Cellular Signalling*. 26 (2014) 1060-1067;
7. KUMAR, V. Adenosine as an endogenous immunoregulator in câncer pathogenesis: where to go? *Purinergic Signalling*. 9 (2013) 145-165.
8. POLACHINI, C.R.N. et al. Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis. *Neuroscience*. 266 (2014) 266-274.
9. RODRIGUES, R. et al. Alterations of ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in lymphocytes of Down syndrome subjects: Relation with inflammatory parameters. *Clinica Chimica Acta*. 433 (2014) 105-110.
10. ZAVIALOV, A.V. et al. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. 88 (2010) 279-290;
11. KAMAL, M.A.; GREIG, N.H.; REALE, M. Anti-Inflammatory Properties of Acetylcholinesterase Inhibitors Administred in Alzheimer's Disease. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*. 8 (2009) 85-100;
12. KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sciences*. 74 (2003) 675–696;
13. KAWASHIMA, K. et al. Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. *Life Sciences*. 91 (2012) 1027–1032;
14. FERREIRA, L.M. et al. Ketoprofen-loaded pomegranate seed oil nanoemulsion stabilized by pullulan: Selective antiglioma formulation for intravenous administration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 130 (2015) 272–277;

15. RAYBURN, E.R.; EZELL, S.J.; ZHANG, R. Anti-Inflammatory Agents for Cancer Therapy. *Molecular and Cellular Pharmacology*. 1:1 (2009) 29–43;
16. COLOTTA, F. et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 30:7 (2009).1073–1081;
17. LIU, Y. et al. Association between nonsteroidal anti-inflammatory drug use and brain tumour risk: a meta-analysis. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 78:1 (2013) 58–68;
18. SILVEIRA, E.F. et al. Ketoprofen-loaded polymeric nanocapsules selectively inhibit cancer cell growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma multiforme. *Investigational New Drugs*. 31 (2013) 1424–1435.
19. HU, J. et al. Synthesis and biological evaluation of novel thiazolidinone derivatives as potencial anti-inflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 64 (2013) 292-301;
20. GOUVÊA, D.P. et al. Variable intermolecular interactions in 2-aryl-3-(pyridin-2-yl)-1,3-thiazolidin-4-one derivatives. *Zeitschrift für Kristallographie*. 228 (2013) 382-393;
21. NANDAGOKULA, C. et al. Synthesis, characterization, and biological evaluation of some N-aryl hydrazones and their 2,3-disubstituted-4-thiazolidinone derivatives. *Medicinal Chemistry Research*. 22 (2013) 253-266;
22. BOSENBECKER, J. et al. Synthesis and Antioxidant Activity of 3-(Pyridin-2-ylmethyl)-1,3-thiazinan(thiazolidin)-4-ones. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 28:9 (2014) 425-432;
23. NEUENFELDT, P.D. et al. Efficient sonochemical synthesis of thiazolidinones from piperonilamine. *Ultrasonics Sonochemistry*. 18 (2011) 65-67;
24. SHELKE, S.H. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of a novel series of 3-aryl-2-(2-substituted-4-methylthiazole-5-yl)thiazolidin-4-one as possible anti-inflammatory and antimicrobial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 22 (2012) 6373-6376;
25. KUNZLER, A. et al. Synthesis, antifungal and cytotoxic activities of 2-aryl-3-((piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidinones. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 64 (2013) 74-80;
26. GOUVÊA, D.P. et al. Ultrasonics promoted synthesis of thiazolidinones from 2-aminopyridine and 2-picolilamine. *Ultrasonics Sonochemistry*. 19 (2012) 1127–1131;
27. NEVES, A.M. et al. Thiazolidin-4-ones from 3-(Aminomethyl)pyridine, Arenealdehydes and Mercaptoacetic Acid: Synthesis and Radical Scavenger Activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 26:2 (2015) 381-388;
28. MASTELOTO, H.G. 3,4-(Methylenedioxy)aniline as precursor to the synthesis of thiazolidin-4-ones. *Monatshefte für Chemie*. 146 (2015) 327–334;

29. BÖYÜM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 97 (1968) 77–89;
30. GUISTI, G.; GALANTI, B. Colorimetric method. In: Bergmeyer HU, editor. Methods of enzymatic analysis. Weinheim: Verlag Chemie. (1984) 315–323;
31. ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol. 7 (1961) 88–95;
32. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72 (1976) 248–254;
33. DA FROTA JR, M.L. et al. 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. 27:1 (2009) 13–20;
34. JAIN, A.K. et al. Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: A review. Bioorganic & Medicinal Chemistry. (2012).
35. KAMEL, M. M. et al. Synthesis, antitumor activity and molecular docking study of novel Sulfonamide-Schiff's bases, thiazolidinones, benzothiazinones and their C-nucleoside derivatives. Eur J Med Chem. 45 (2010) 572-580.
36. WANG, S. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel 4-thiazolidinones containing indolin-2-one moiety as potential antitumor agent. Eur J Med Chem. 46 (2011) 3509-3518.

Supplementary Material

The anticholinesterase and antitumoral potencial effect of 1,3-thiazolidin-4-ones derived from 4-(methylthio)benzaldehyde and 4-(methylsulfonyl)benzaldehyde

Daniel Schuch da Silva

Mayara Sandrielly Pereira Soares

Gabriela Nogueira Debom

Juliana Hofstatter Azambuja

César Emiliano Hoffmann da Silva

Táise da Rosa Carvalho

Geórgia C. Zimmer

Clarissa Piccinin Frizzo

Elizandra Braganhol

Roselia Maria Spanevello

Wilson João Cunico Filho

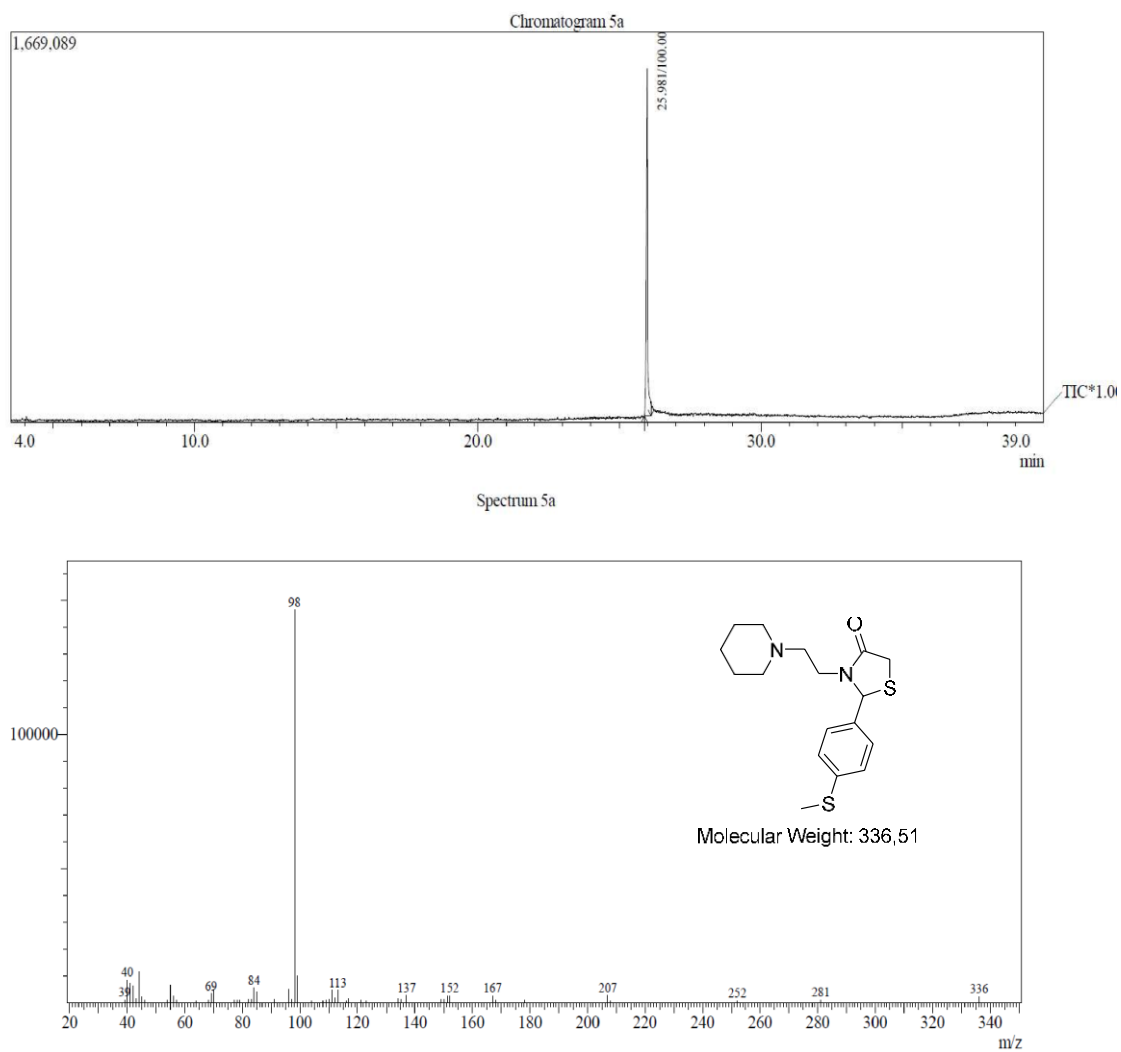
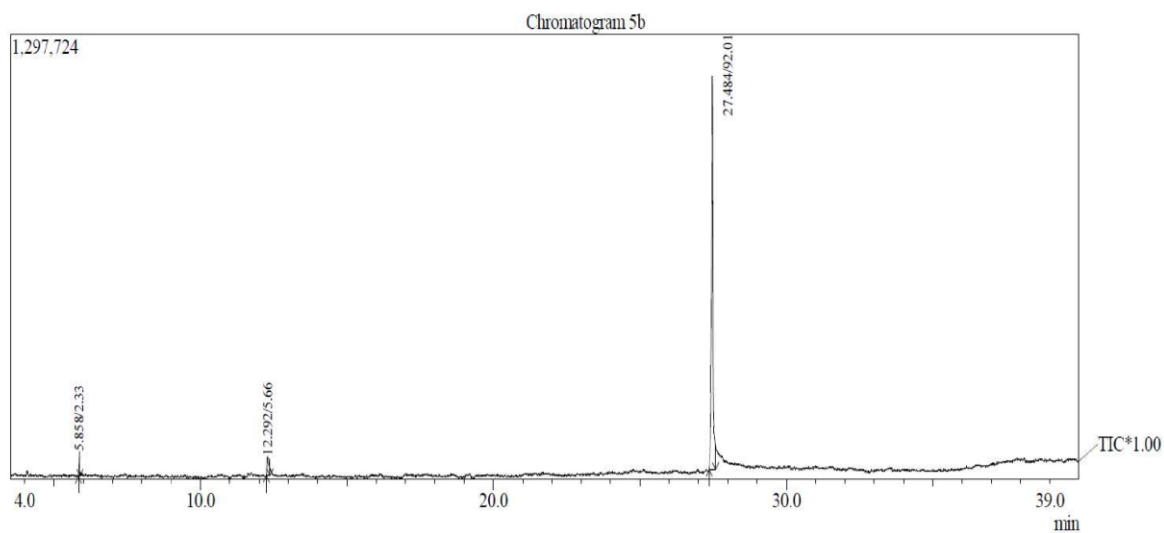


Figure S1. GC/MS of compound 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidin-4-one **5a**.



Spectrum 5b

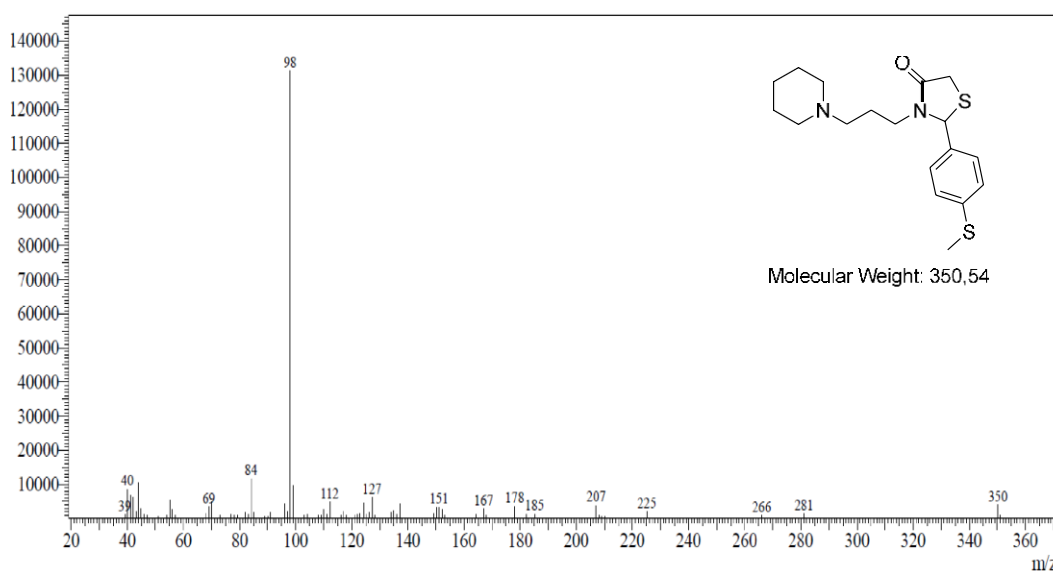


Figure S2. GC/MS of compound 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one **5b**.

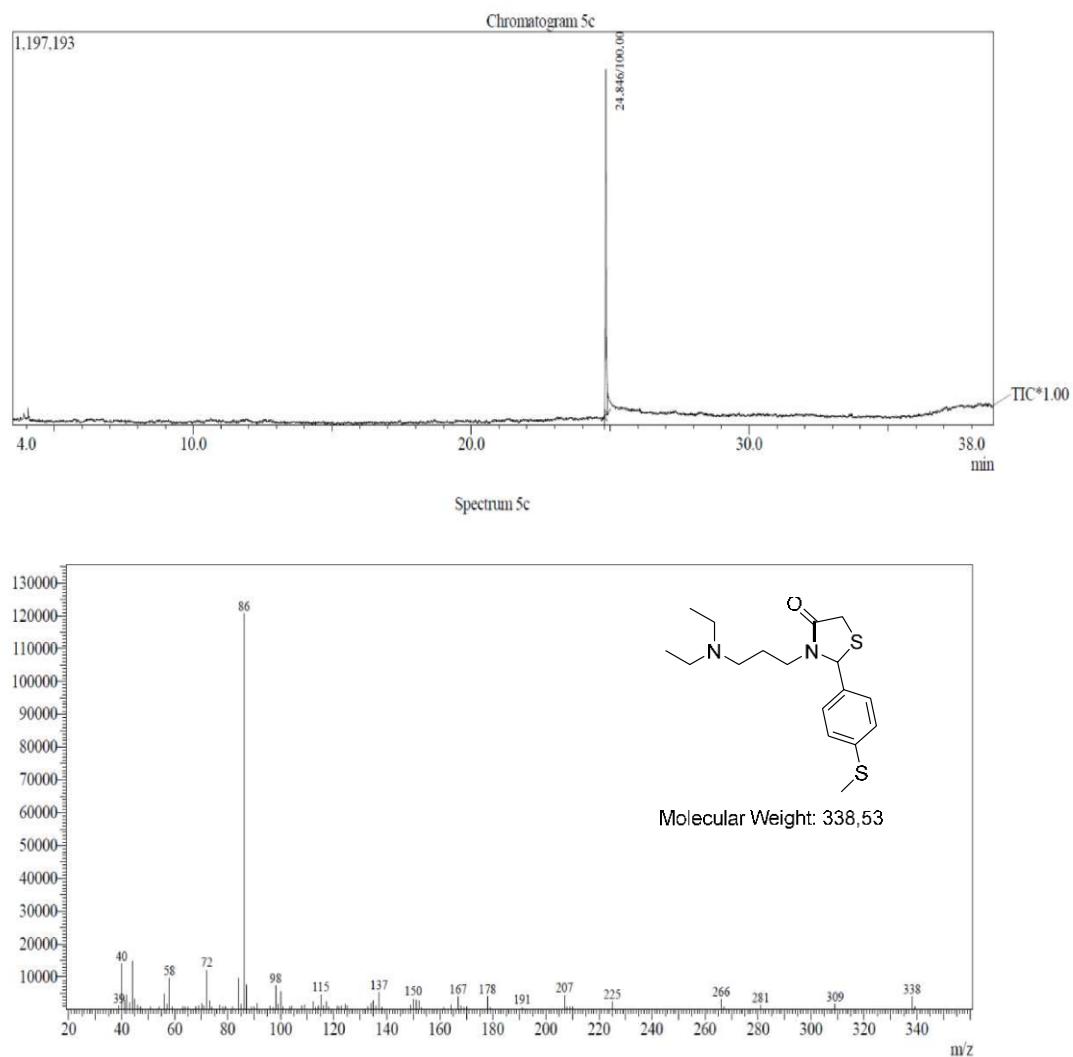


Figure S3. GC/MS of compound 3-(3-(diethylamino)propyl)-2-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one **5c**.

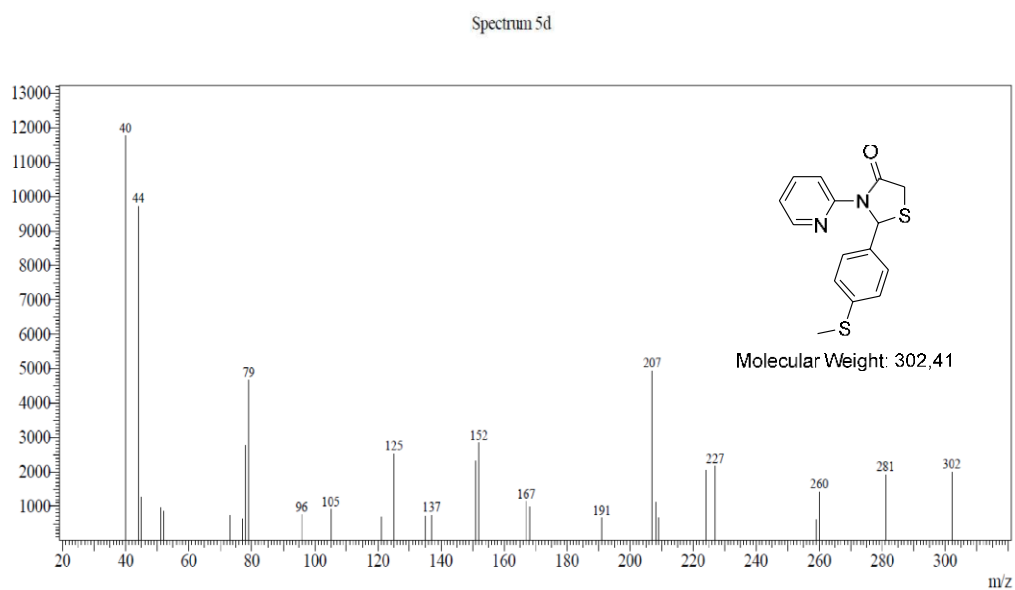
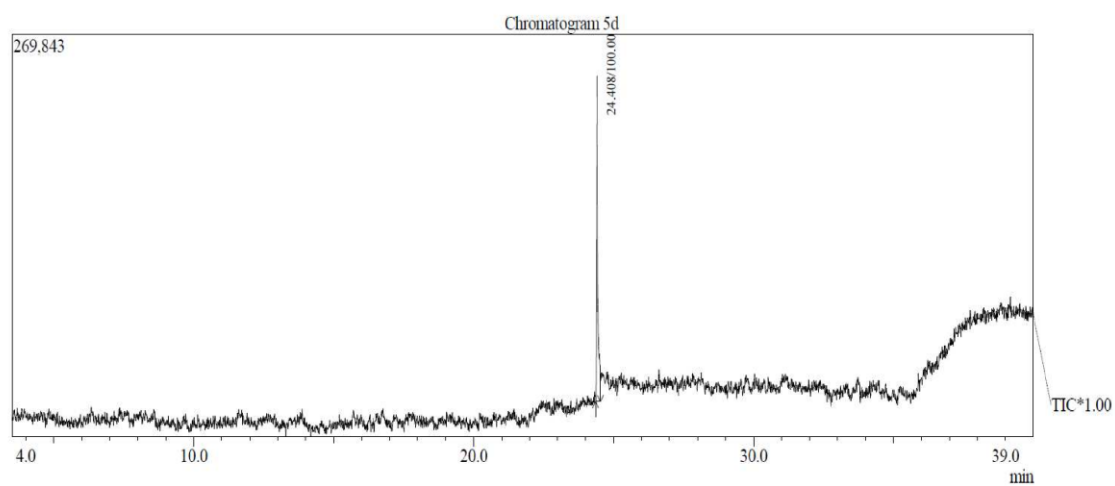


Figure S4. GC/MS of compound 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one **5d**.

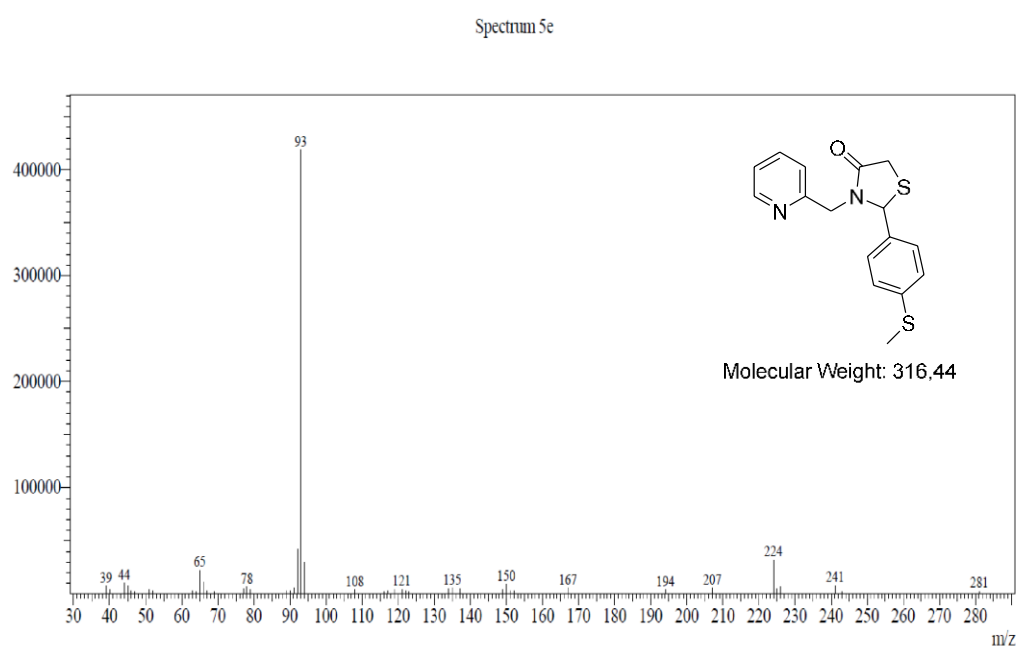
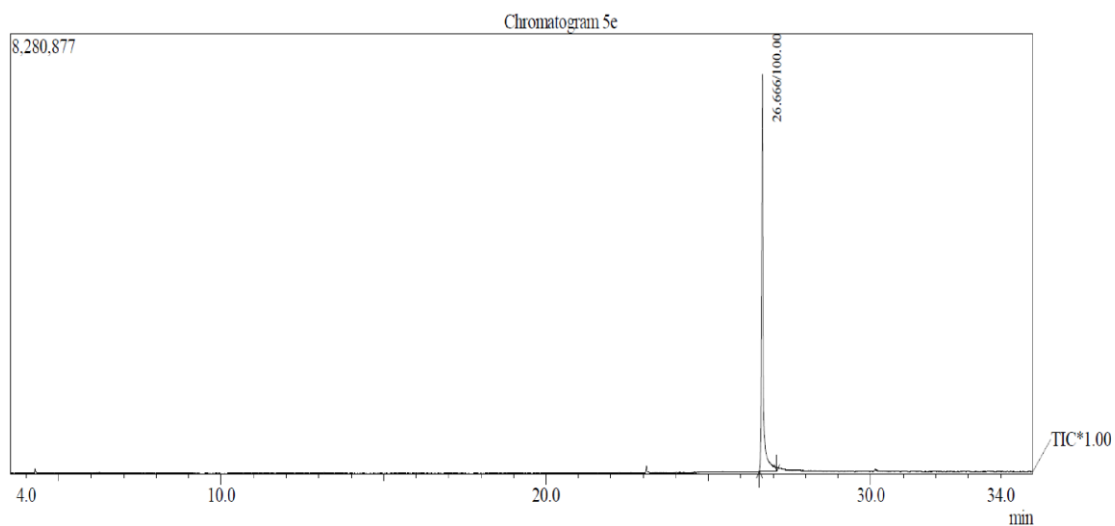


Figure S5. GC/MS of compound 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(pyridin-2-ylmethyl)thiazolidin-4-one **5e**.

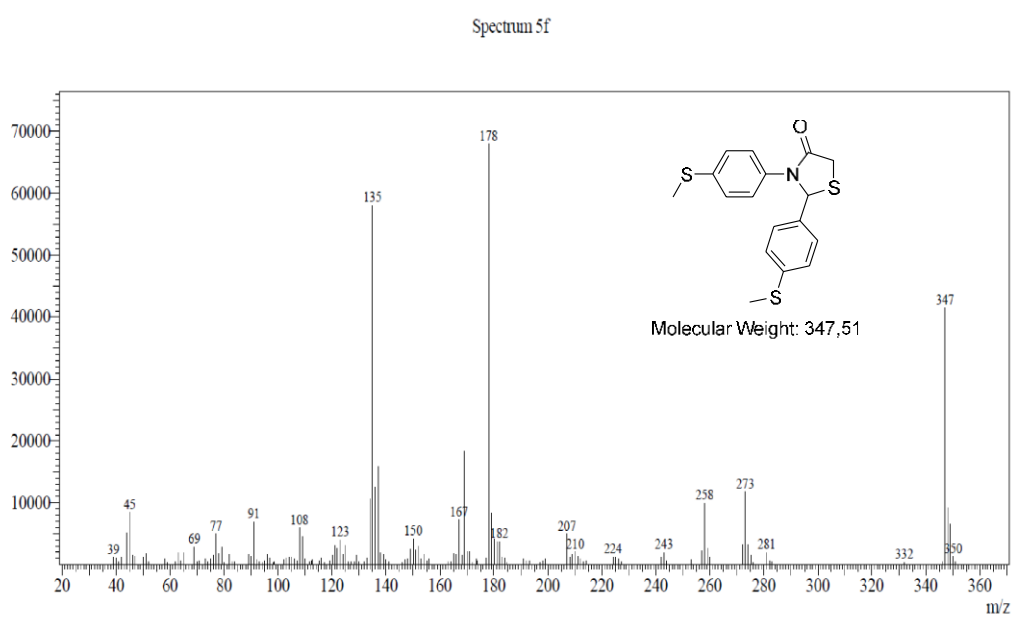
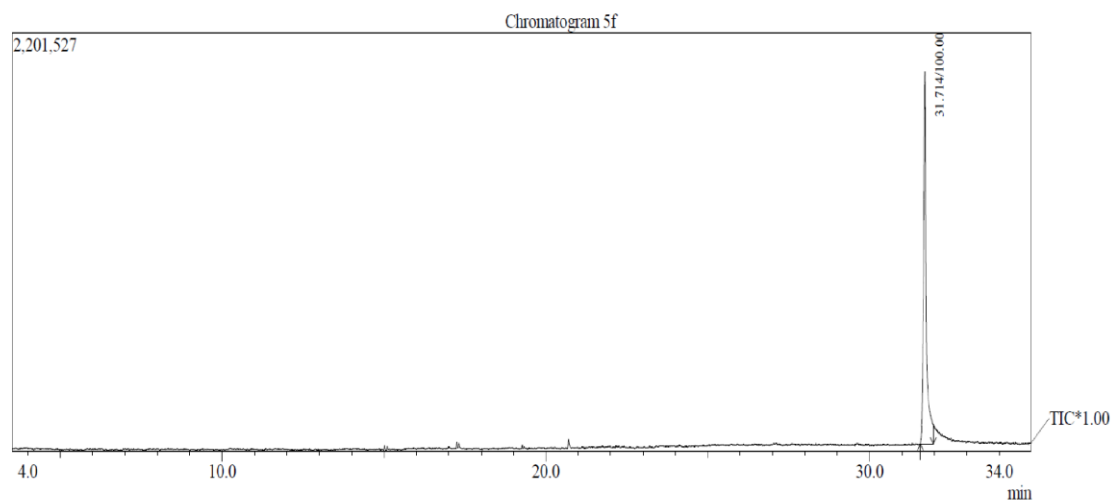


Figure S6. GC/MS of compound 2,3-bis(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one **5f**.

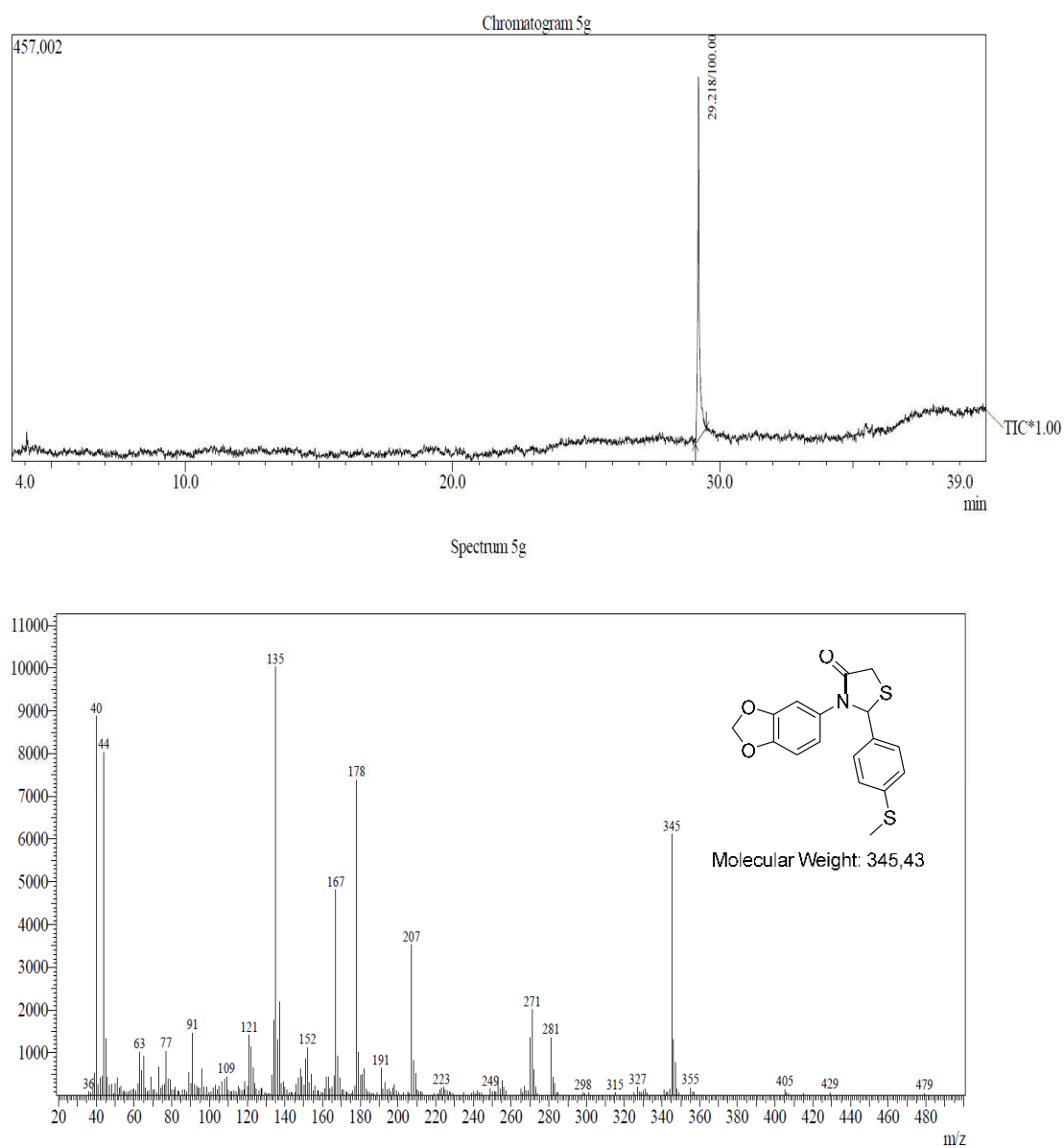


Figure S7. GC/MS of compound 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one **5g**.

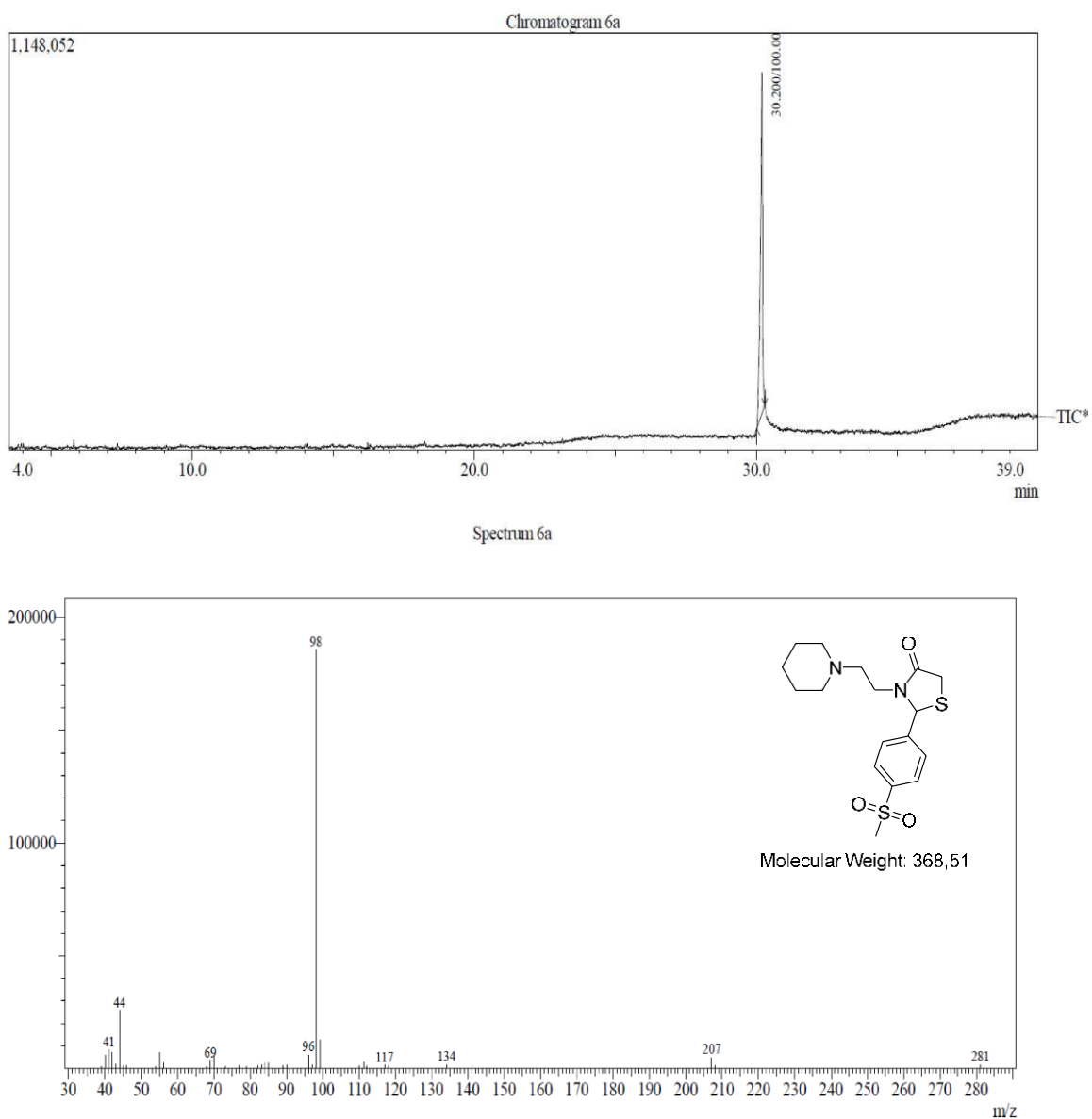
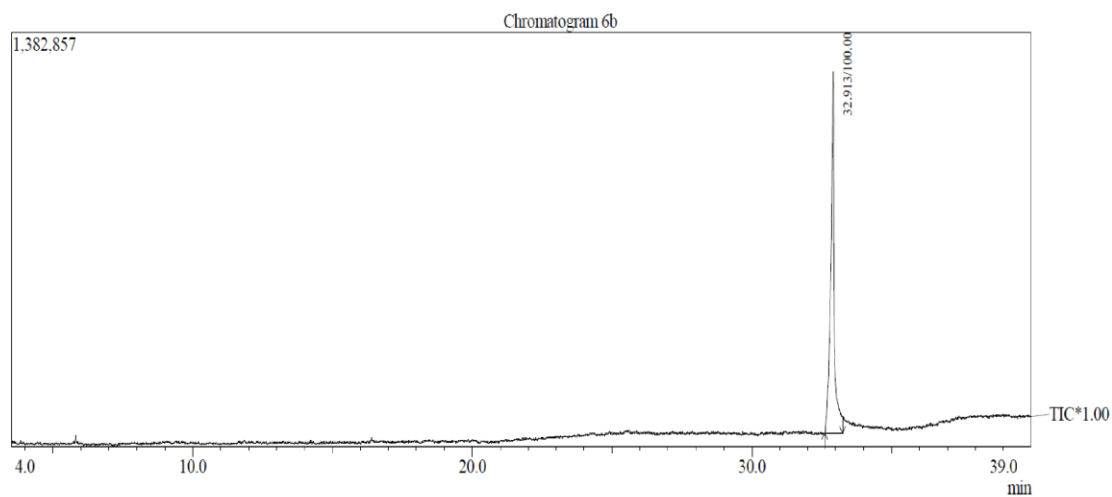


Figure S8. GC/MS of compound 2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidin-4-one **6a**.



Spectrum 6b

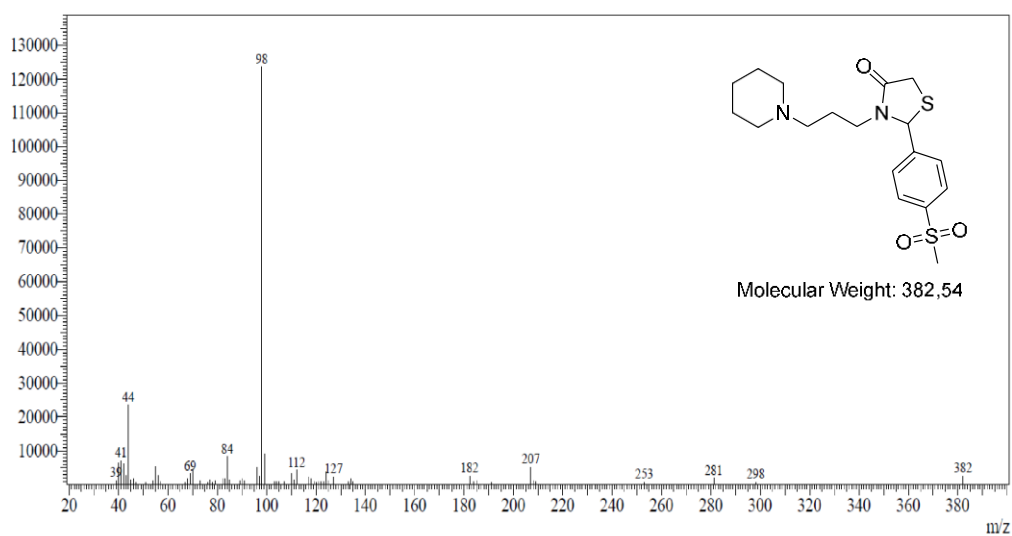
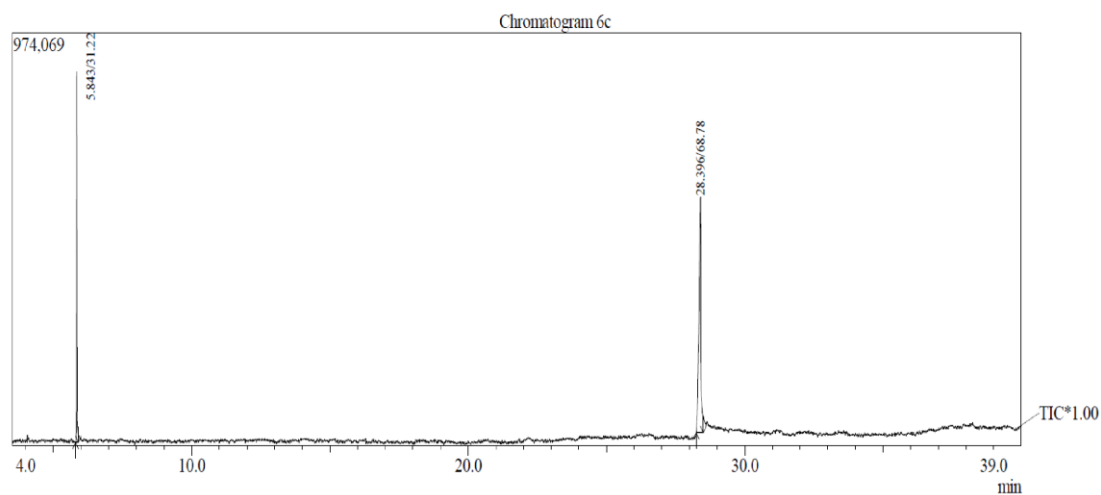


Figure S9. GC/MS of compound 2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one **6b**.



Spectrum 6c

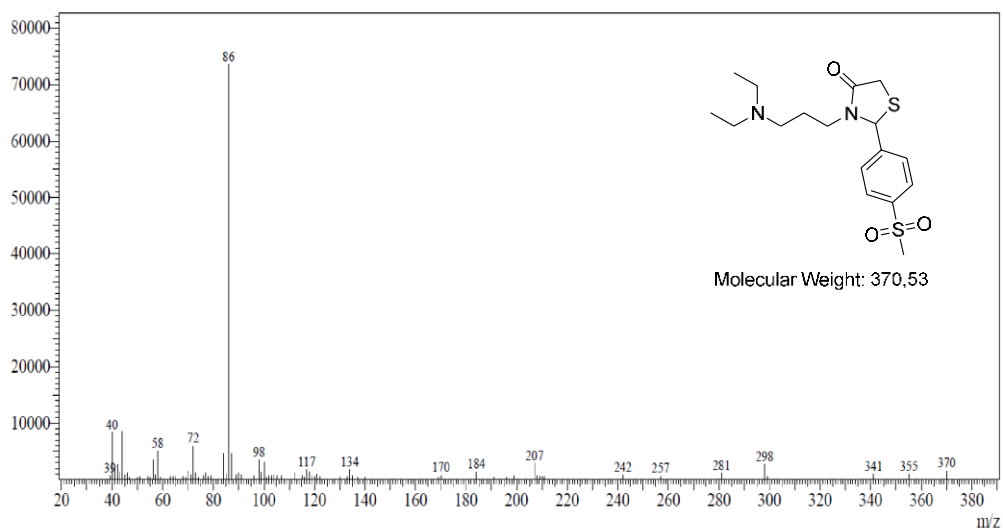


Figure S10. GC/MS of compound 3-(3-(diethylamino)propyl)-2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)thiazolidin-4-one **6c**.

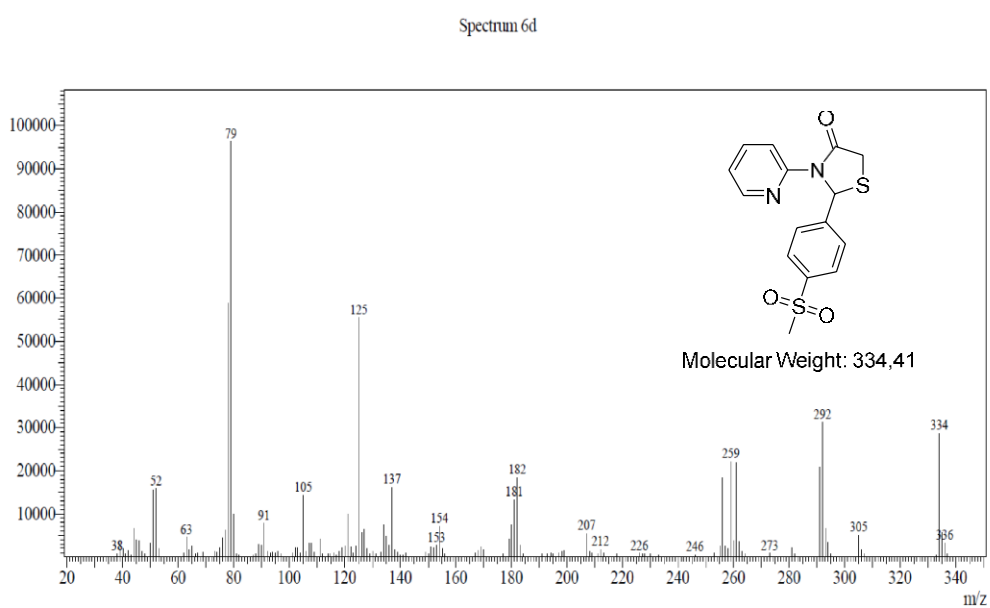
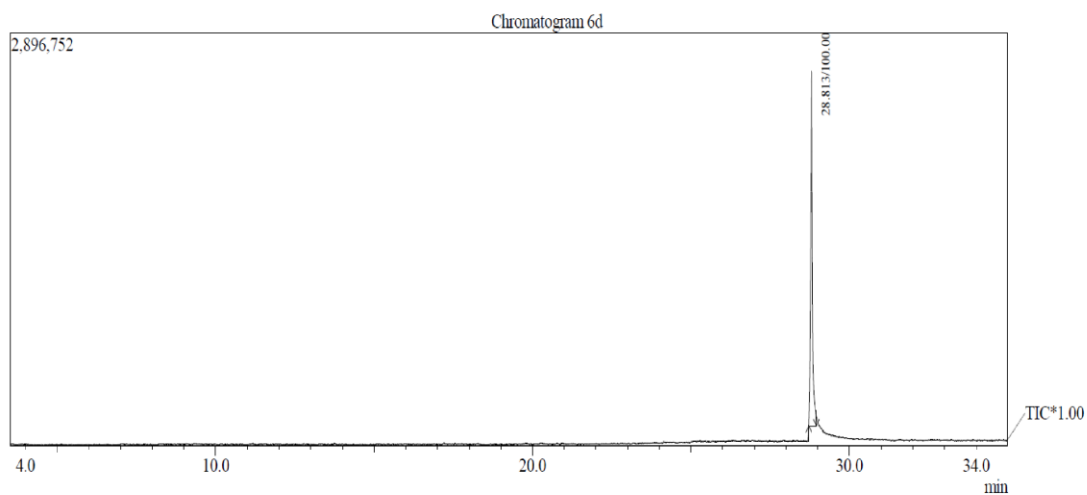


Figure S11. GC/MS of compound 2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one **6d**.

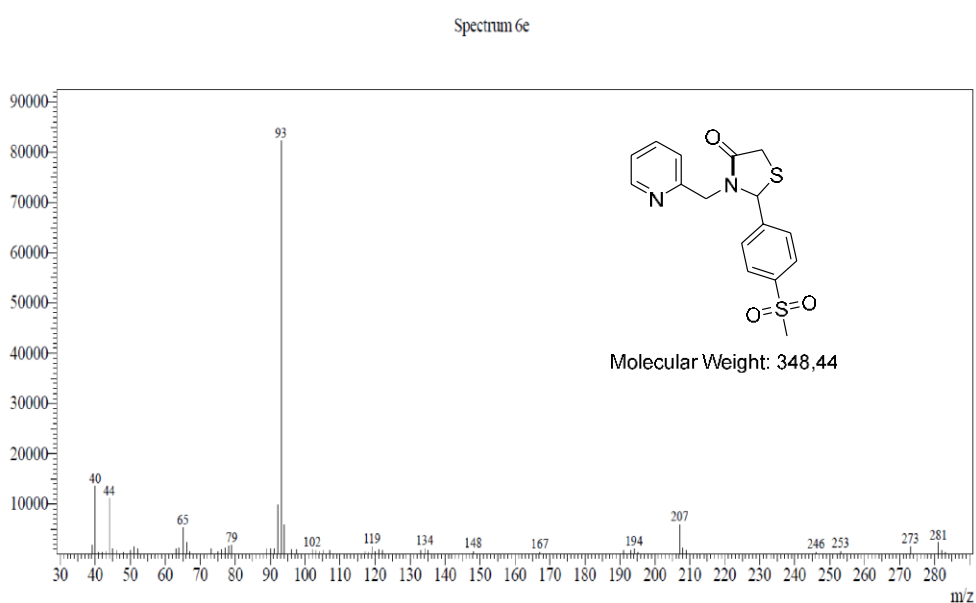
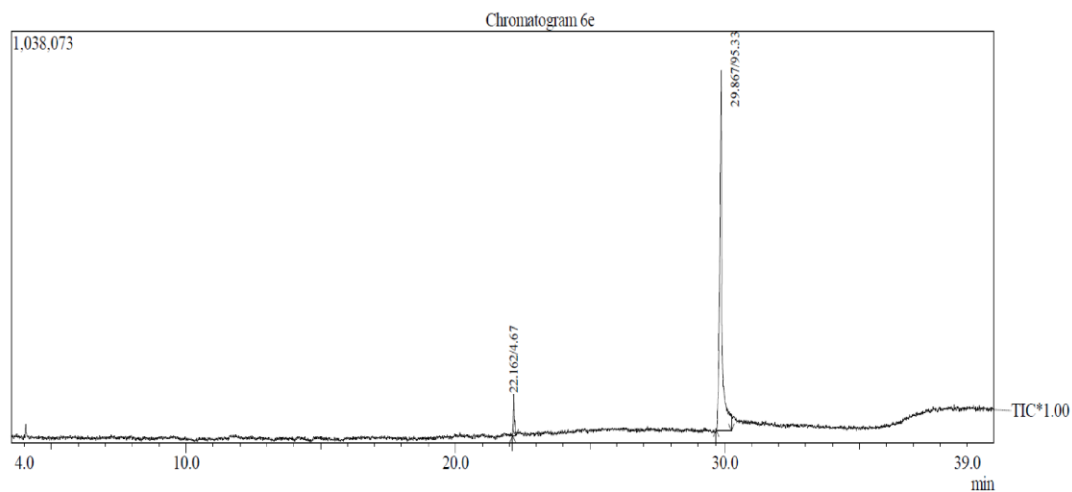


Figure S12. GC/MS of compound 2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(pyridin-2-ylmethyl)thiazolidin-4-one **6e**.

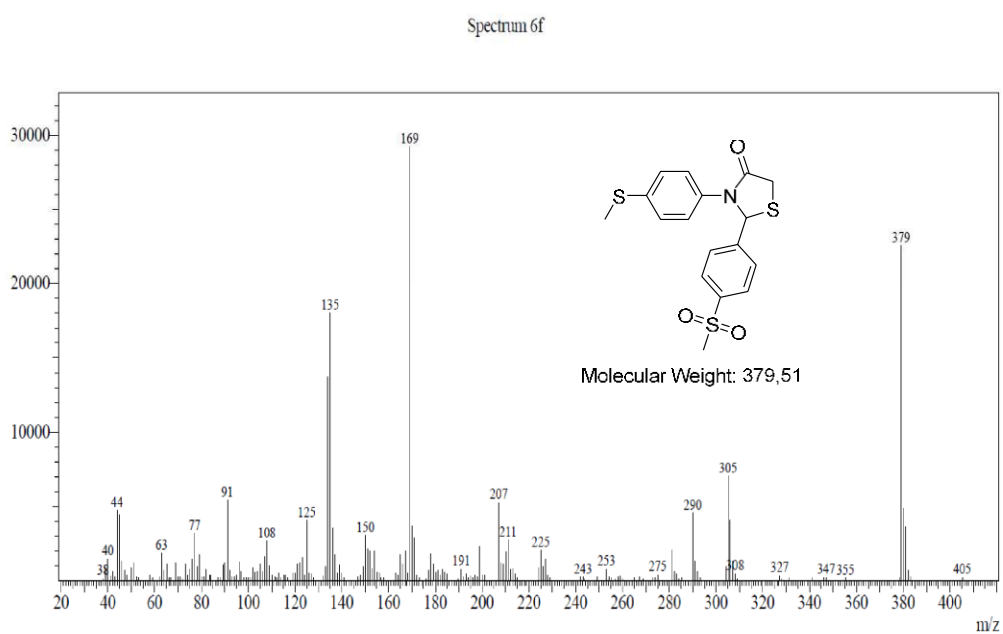
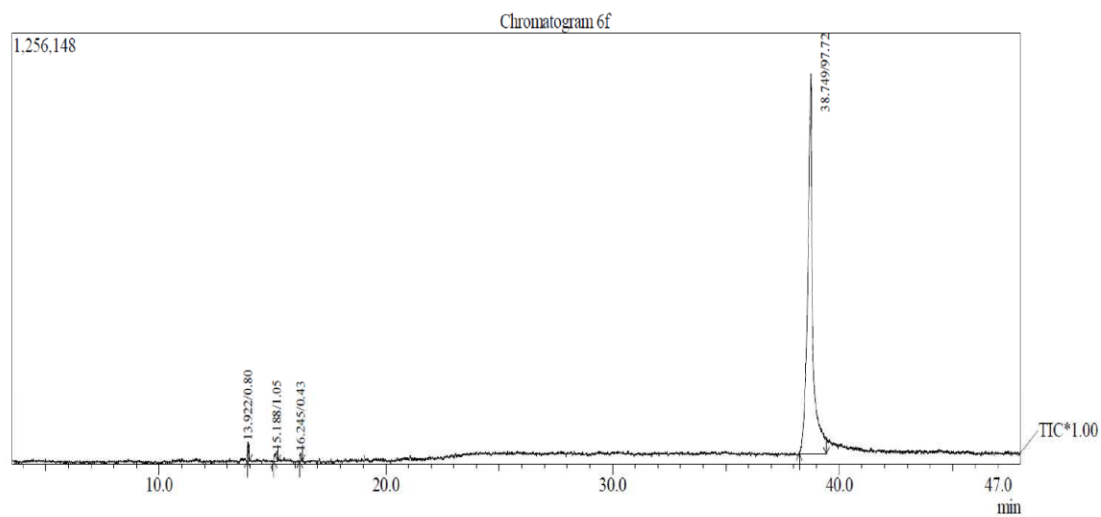


Figure S13. GC/MS of compound 2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one **6f**.

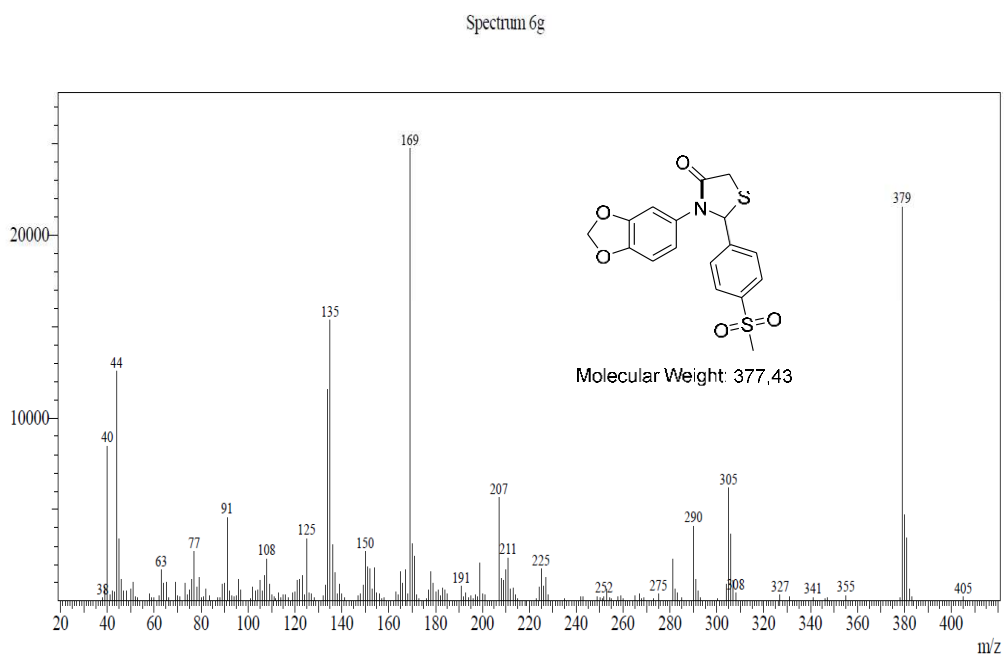
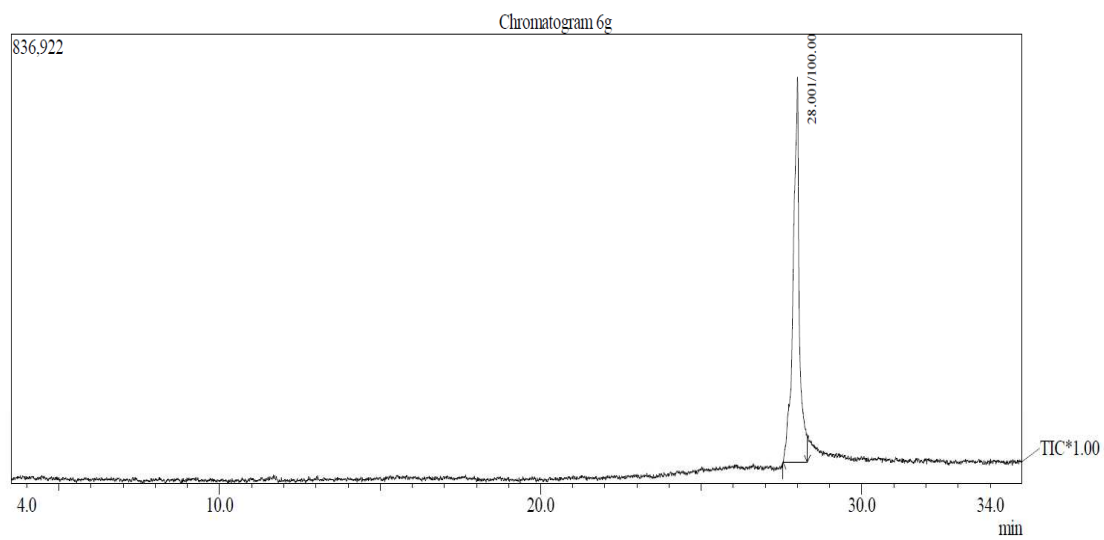


Figure S14. GC/MS of compound 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)thiazolidin-4-one **6g**.

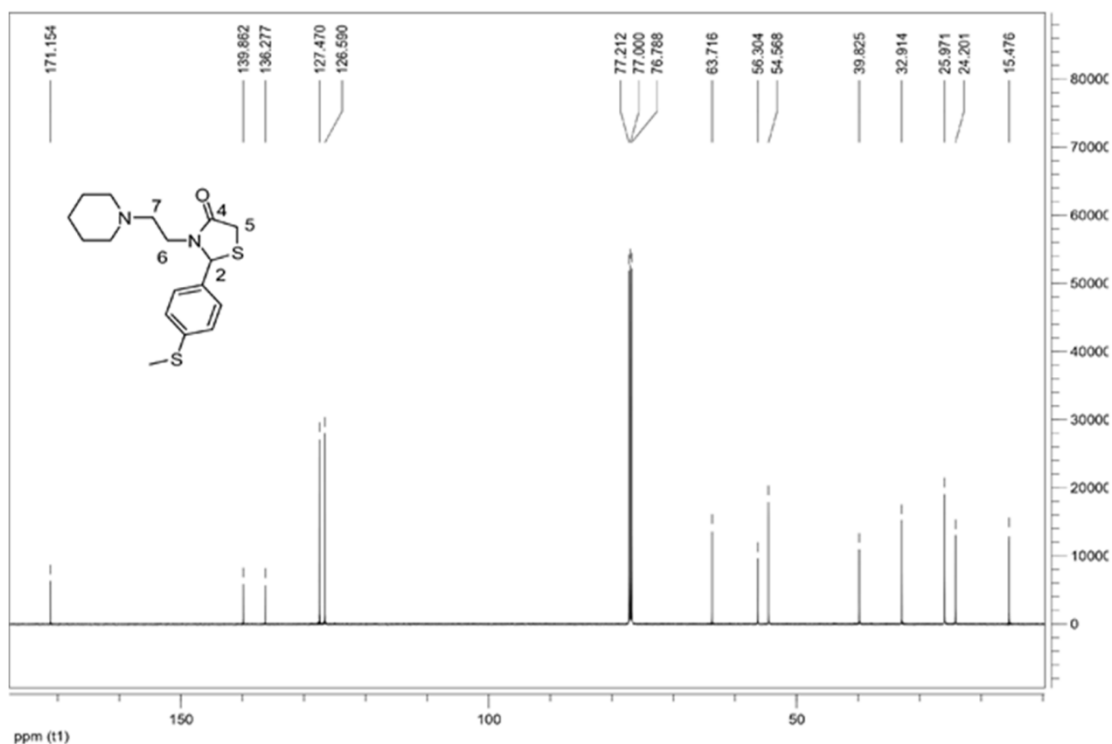


Figure S15. ^{13}C NMR spectrum of compound 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidin-4-one **5a**.

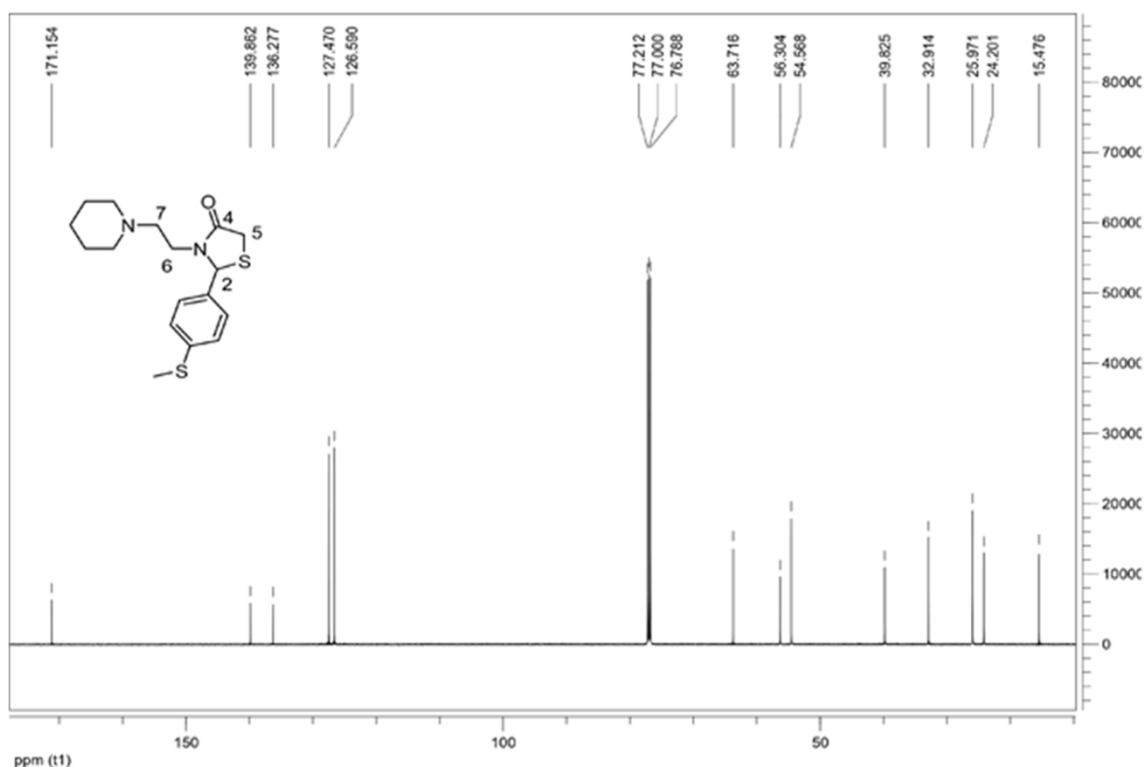


Figure S16. ^1H NMR spectrum of compound 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidin-4-one **5a**.

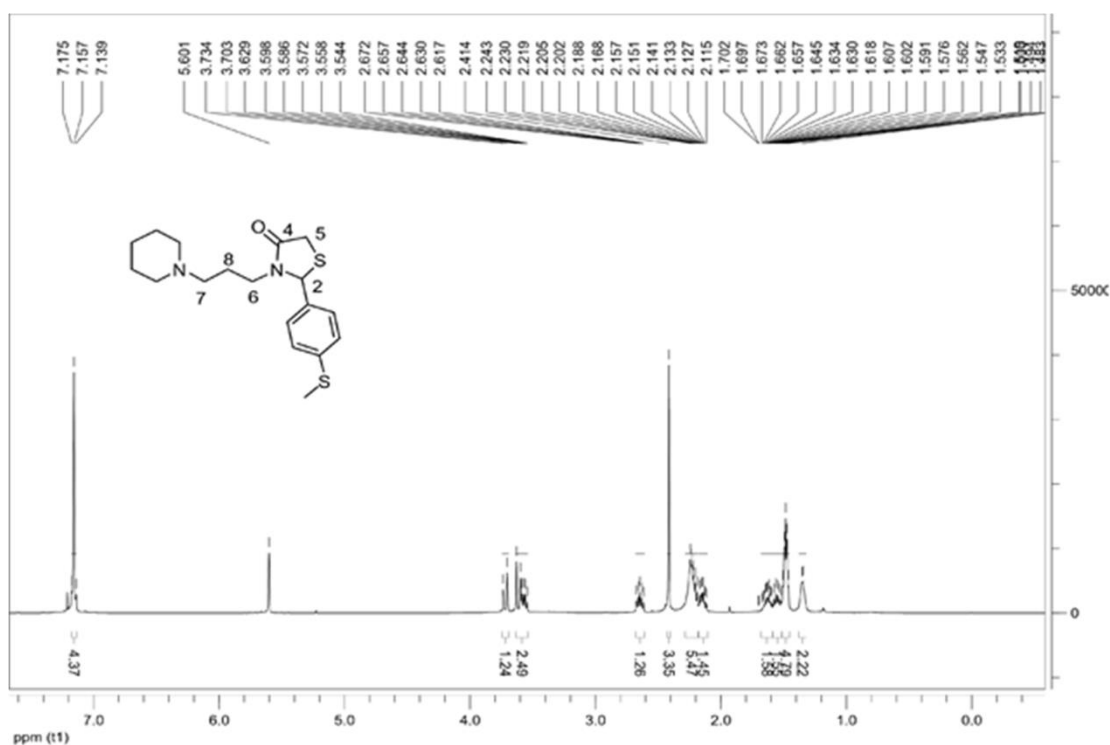


Figure S17. ^1H NMR spectrum of compound 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one **5b**.

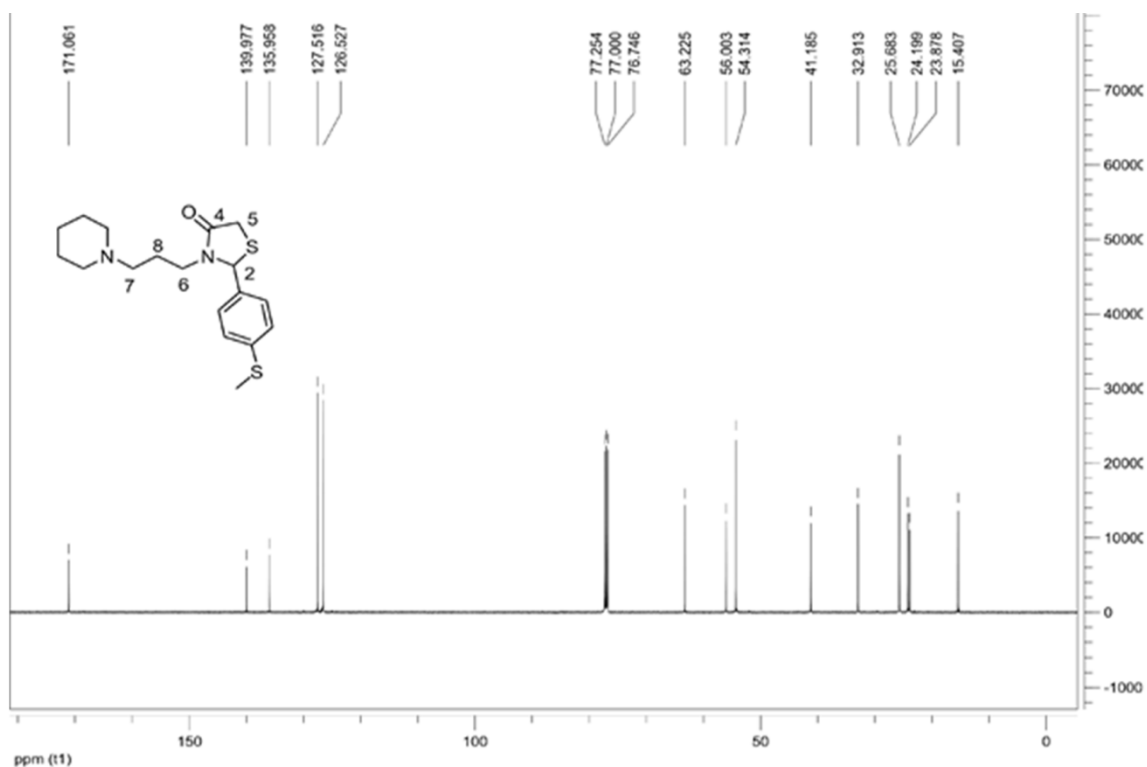


Figure S18. ^{13}C NMR spectrum of compound 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one **5b**.

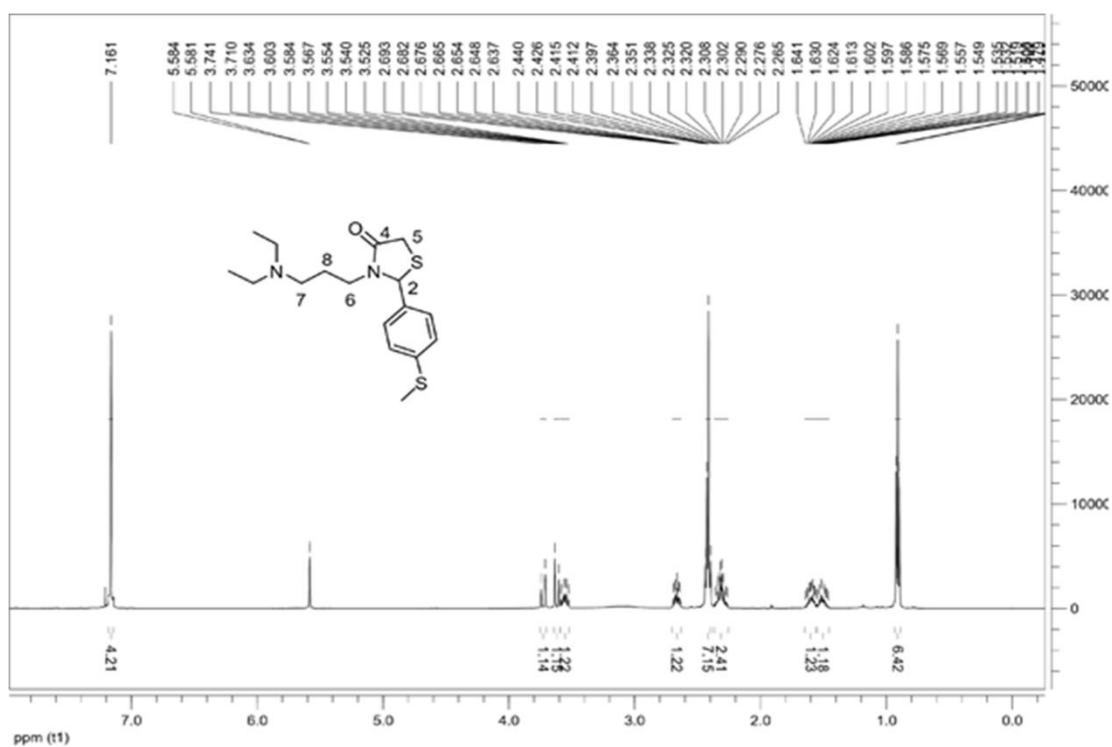


Figure S19. ^1H NMR spectrum of compound 3-(3-(diethylamino)propyl)-2-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one **5c**.

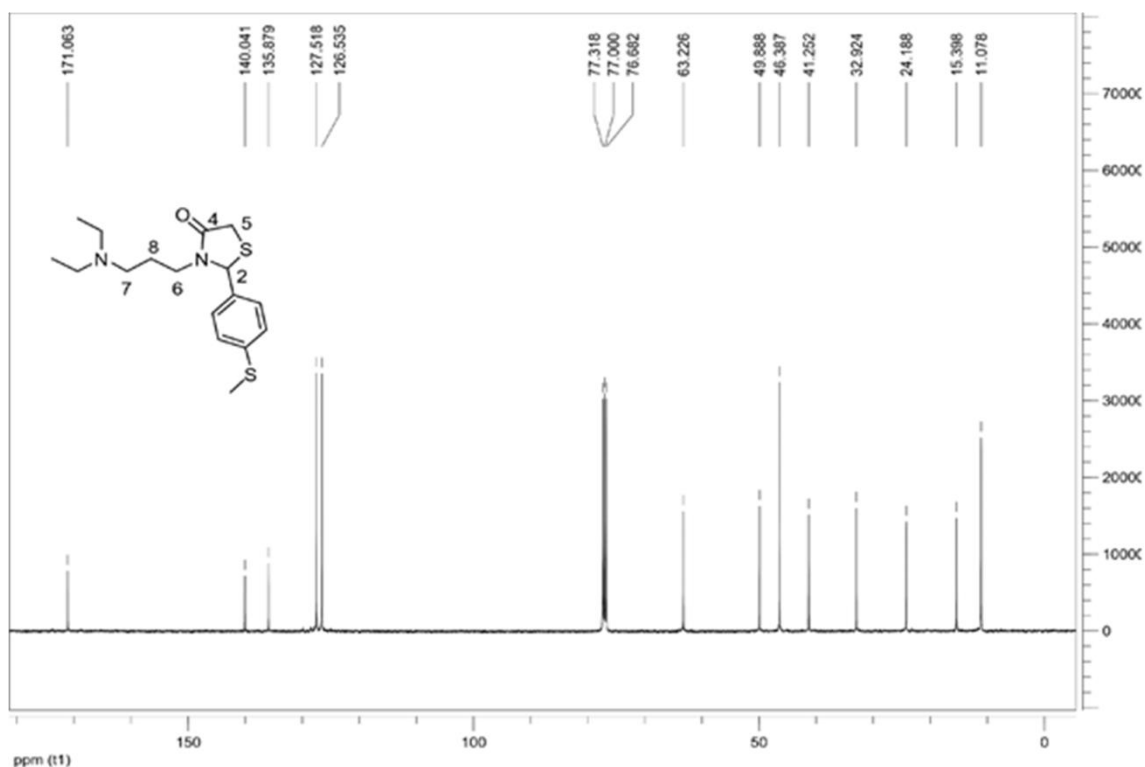


Figure S20. ^{13}C NMR spectrum of compound 3-(3-(diethylamino)propyl)-2-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one **5c**.

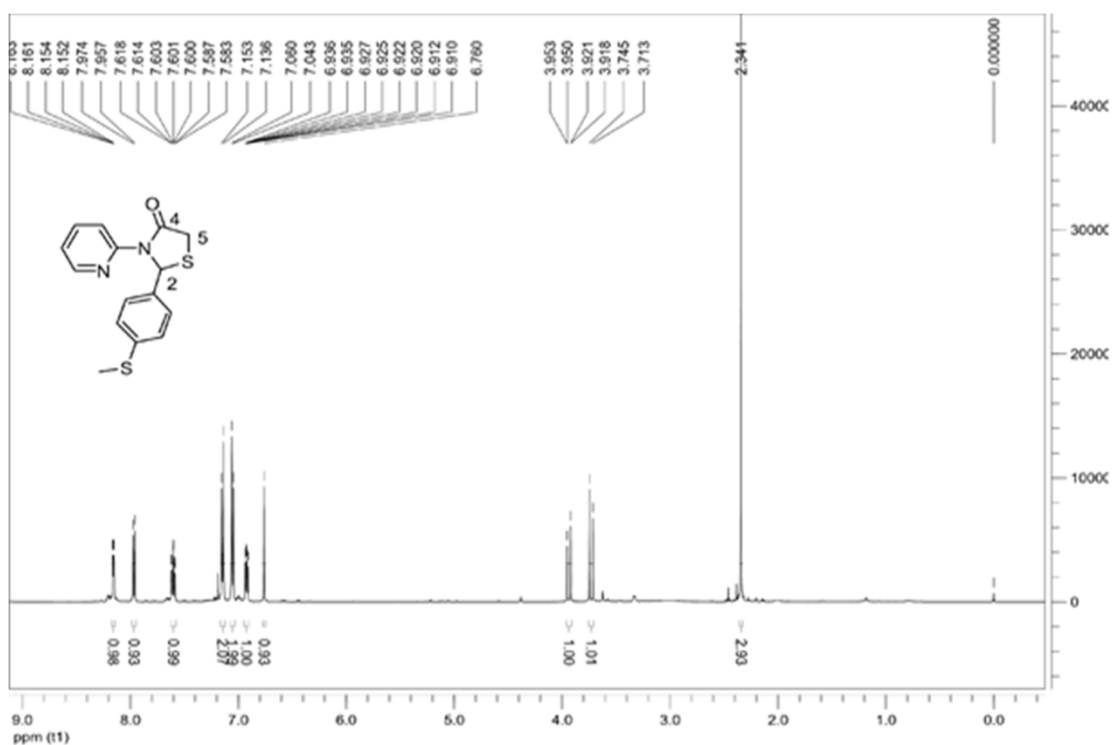


Figure S21. ¹H NMR spectrum of compound 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one **5d**.

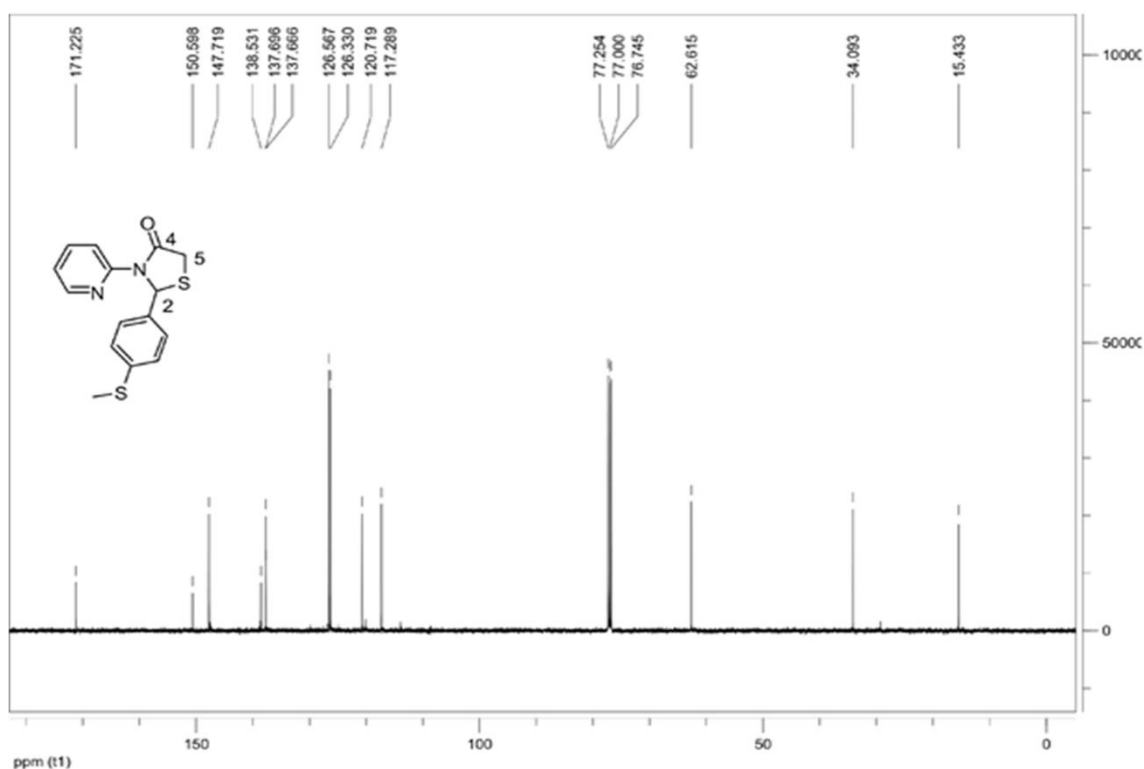


Figure S22. ¹³C NMR spectrum of compound 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one **5d**.

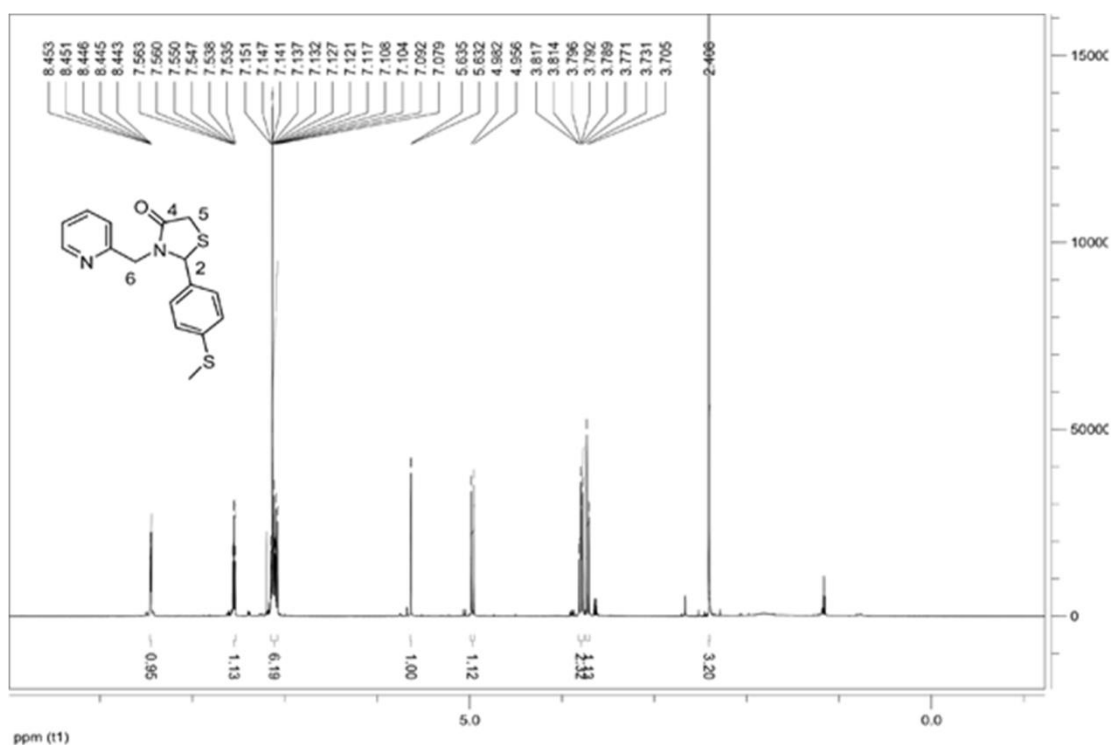


Figure S23. ^1H NMR spectrum of compound 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(pyridin-2-ylmethyl)thiazolidin-4-one **5e**.

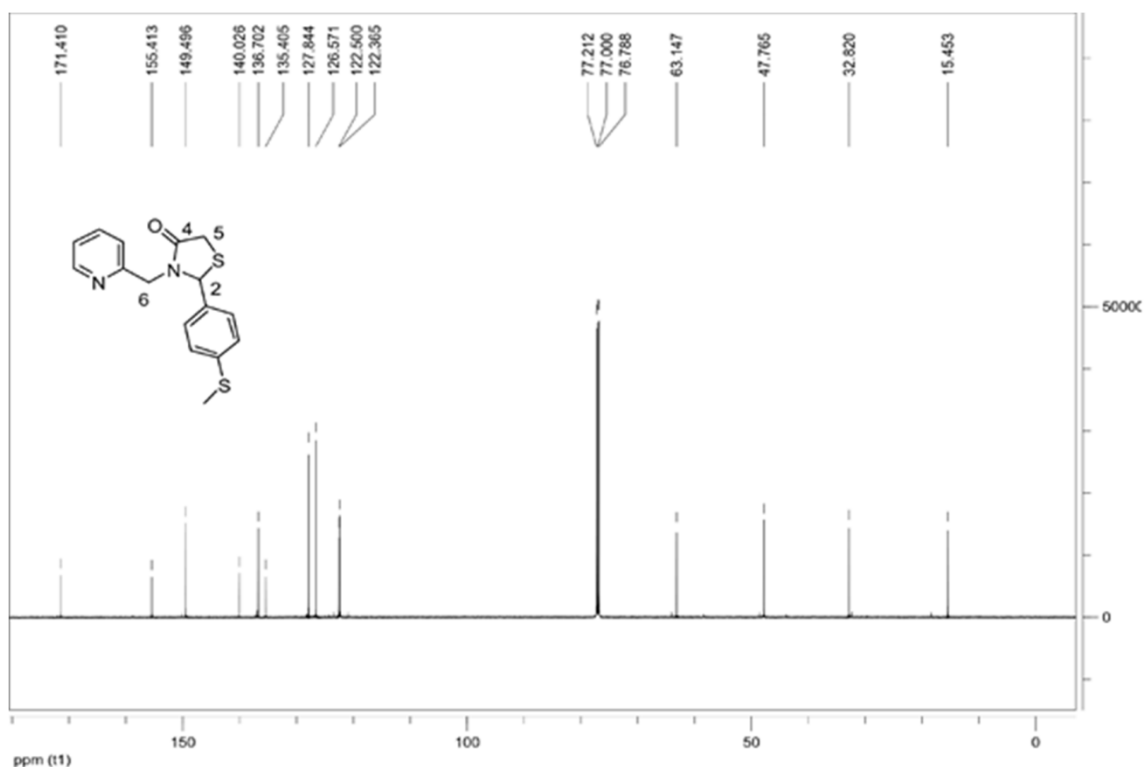


Figure S24. ^{13}C NMR spectrum of compound 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(pyridin-2-ylmethyl)thiazolidin-4-one **5e**.

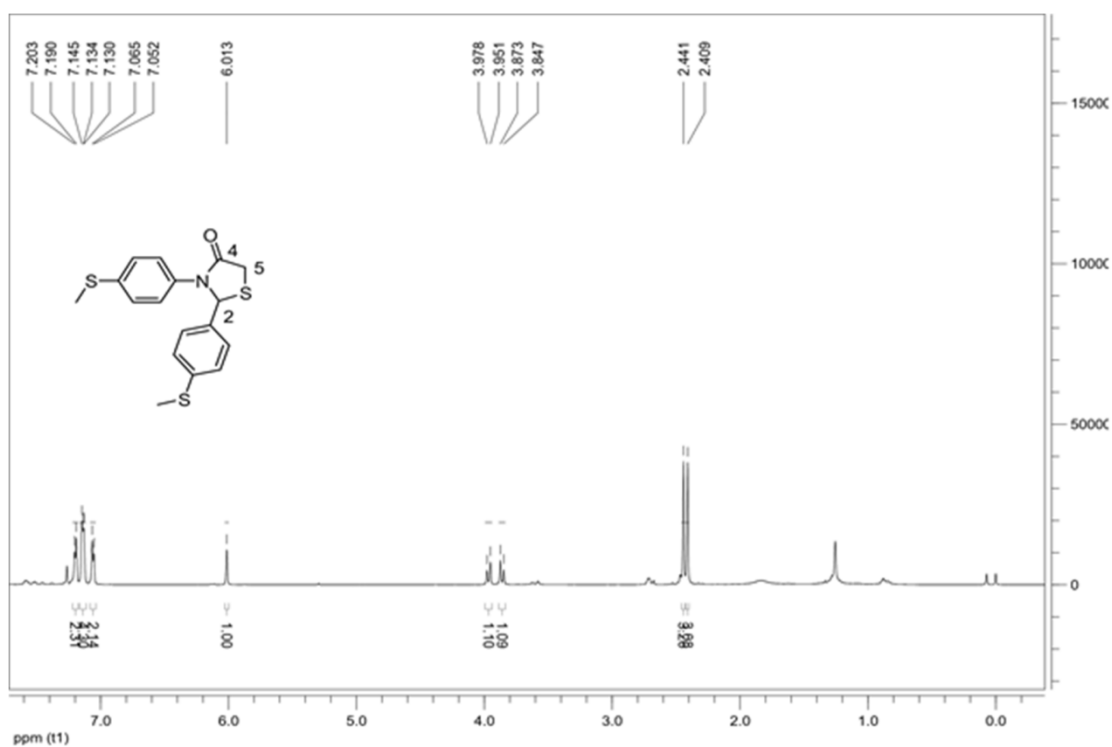


Figure S25. ¹H NMR spectrum of compound 2,3-bis(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one **5f**.

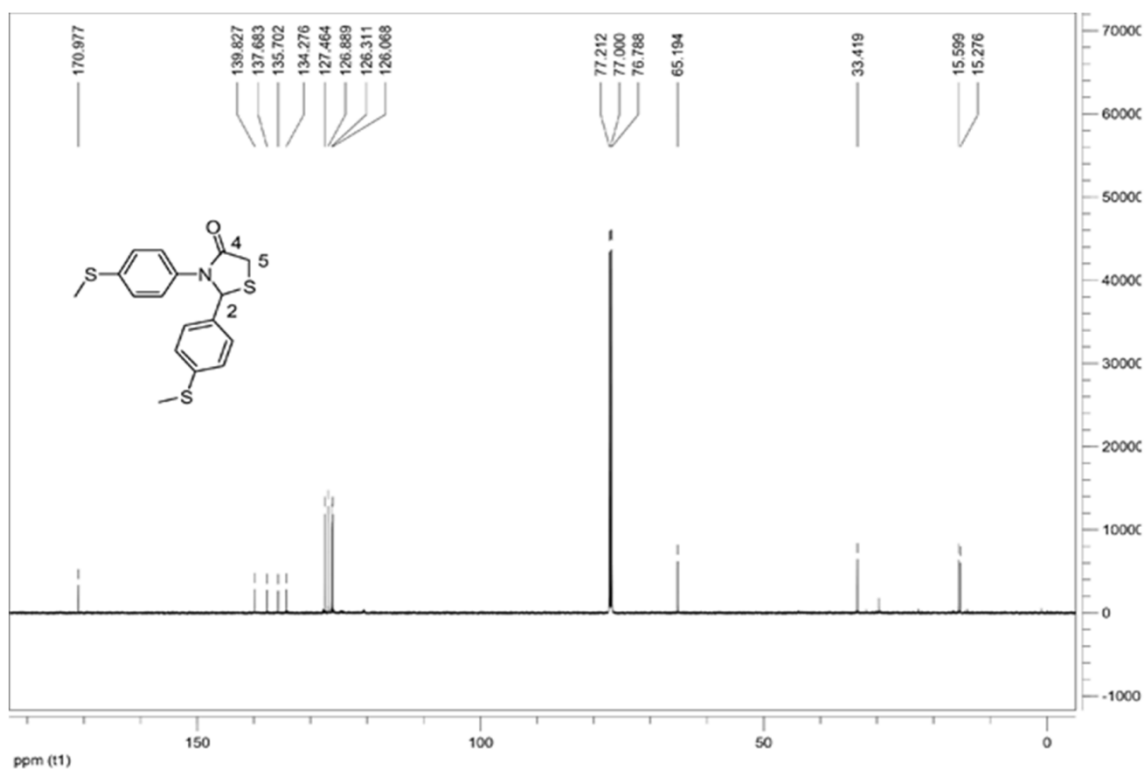


Figure S26. ¹³C NMR spectrum of compound 2,3-bis(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one **5f**.

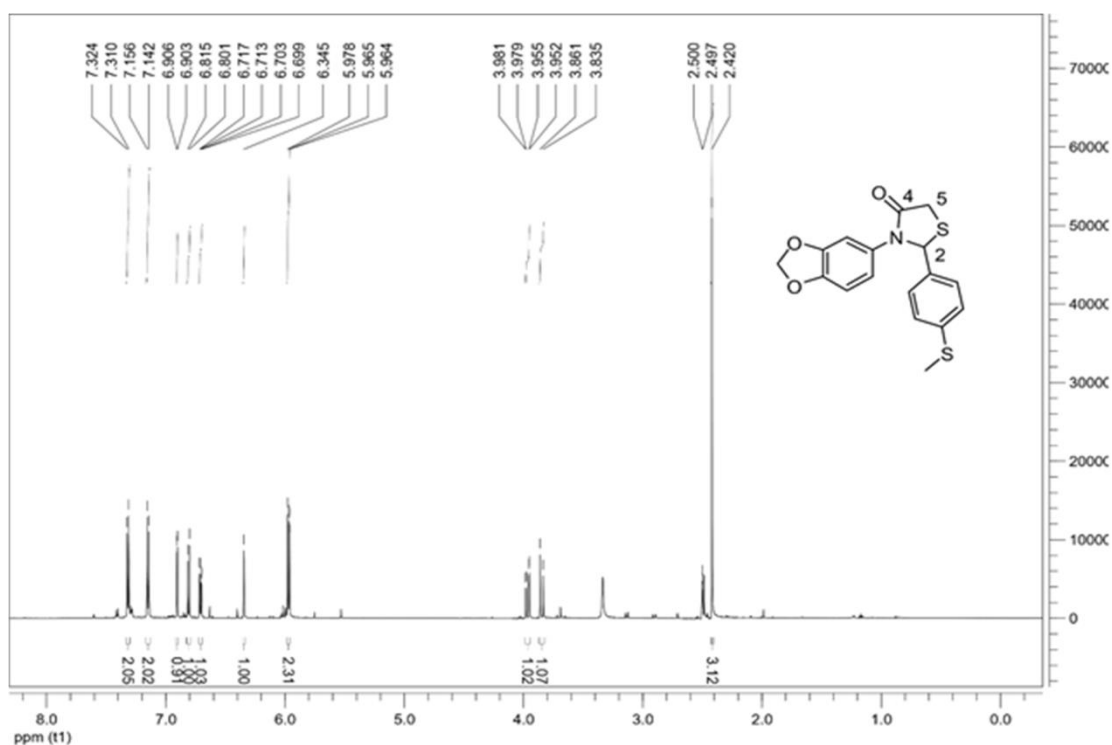


Figure S27. ^1H NMR spectrum of compound 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one **5g**.

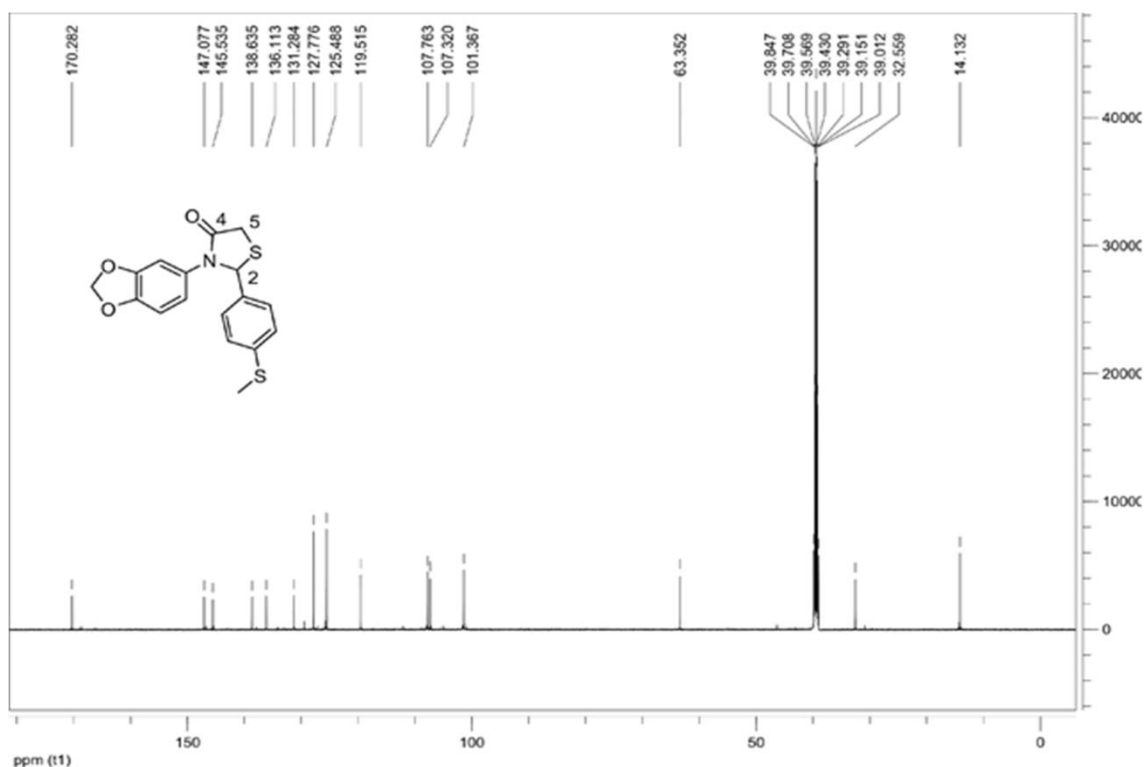


Figure S28. ^{13}C NMR spectrum of compound 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one **5g**.

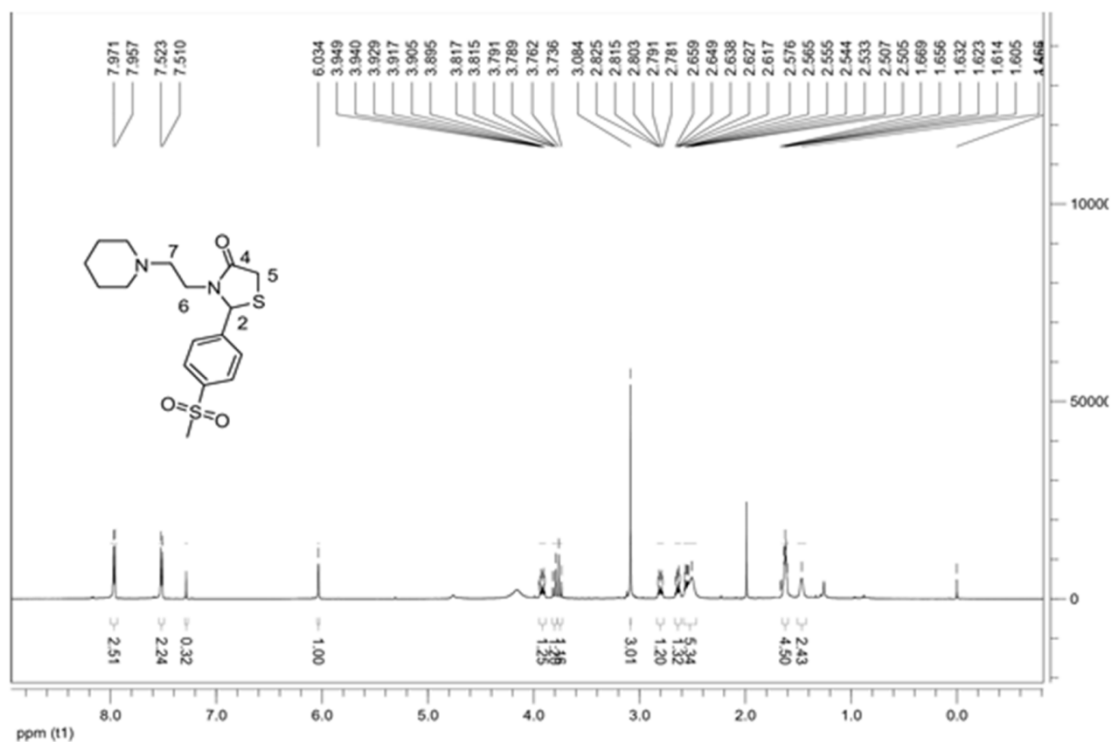


Figure S29. ¹H NMR spectrum of compound 2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidin-4-one **6a**.

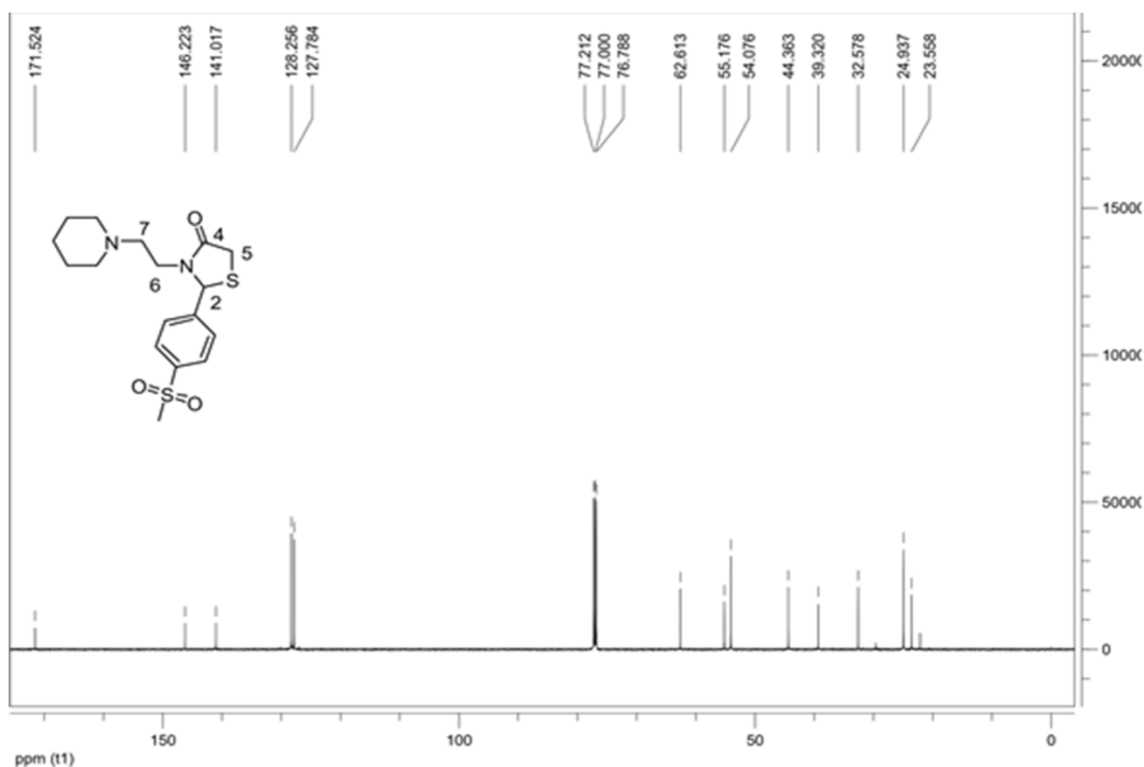


Figure S30. ¹³C NMR spectrum of compound 2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidin-4-one **6a**.

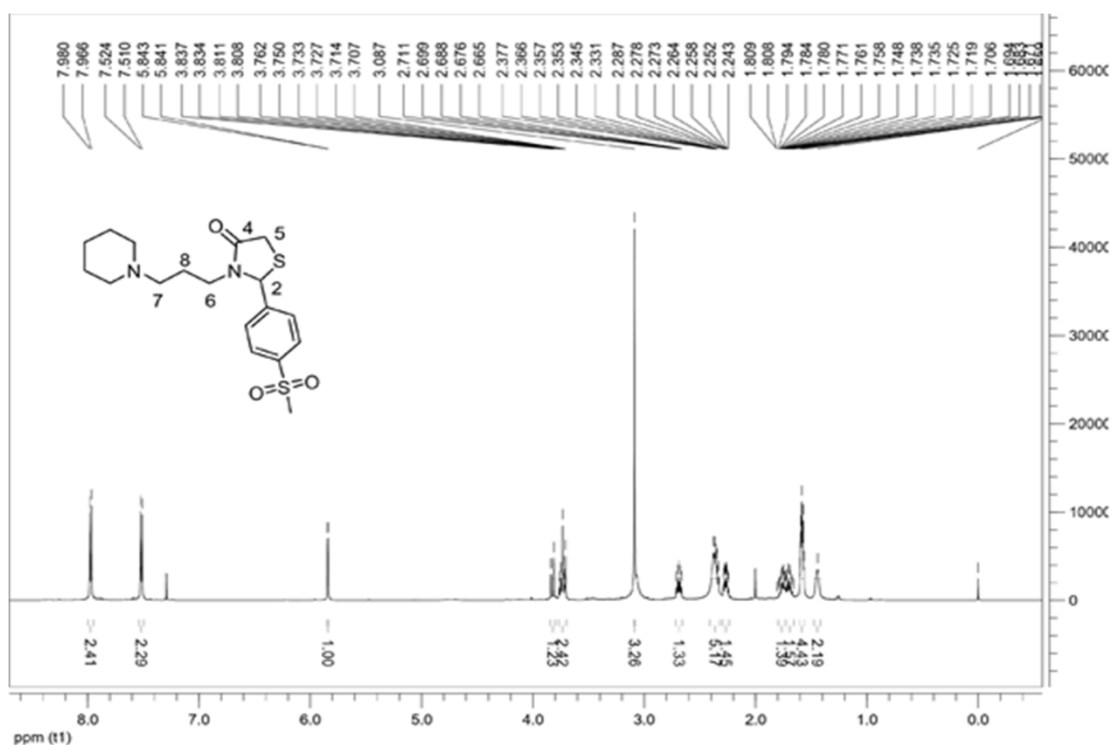


Figure S31. ^1H NMR spectrum of compound 2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one **6b**.

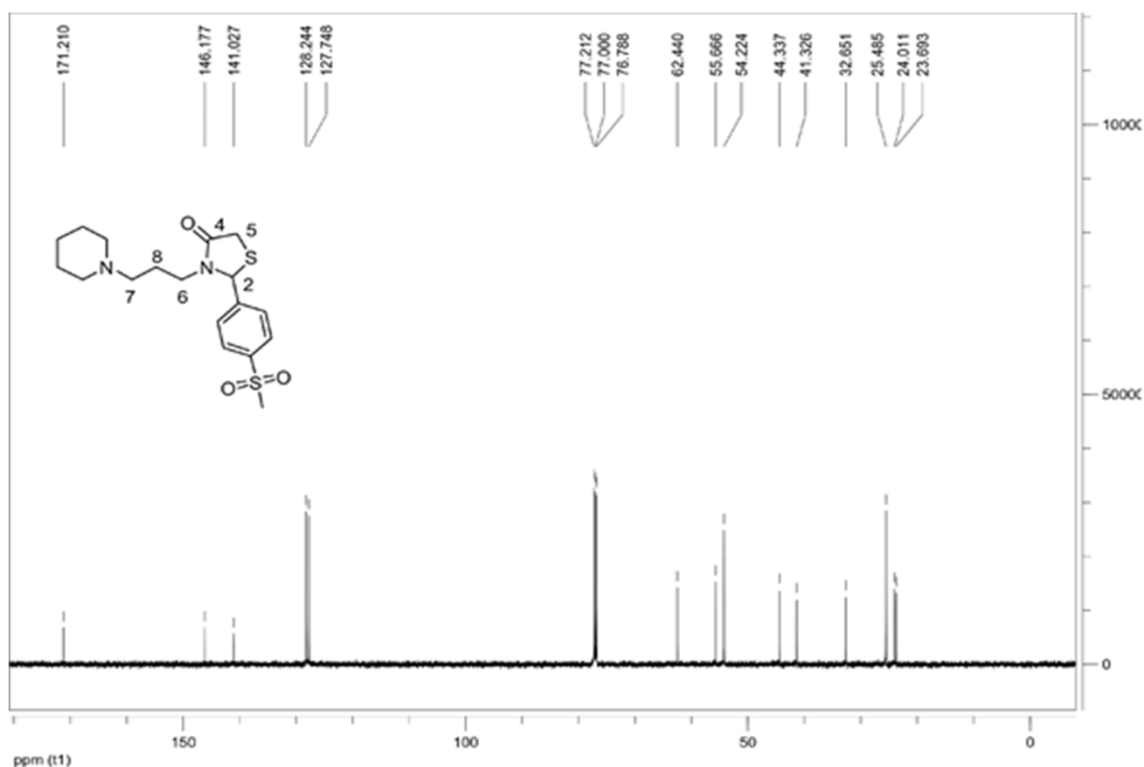
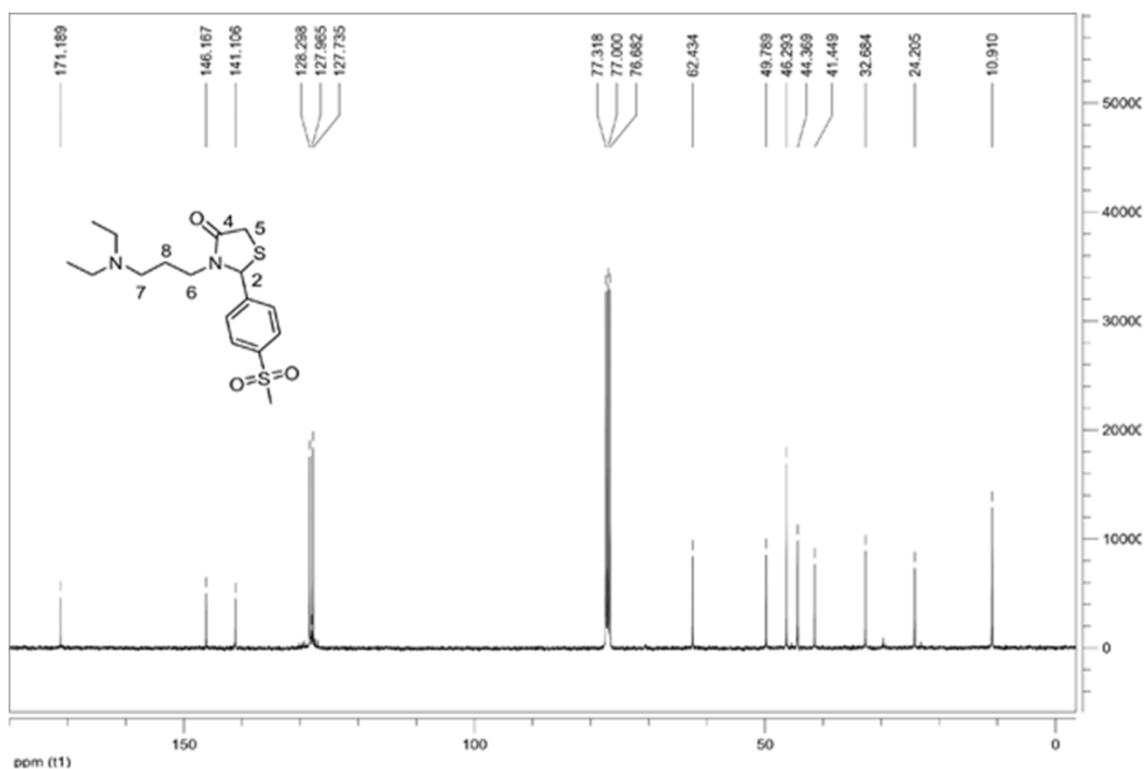
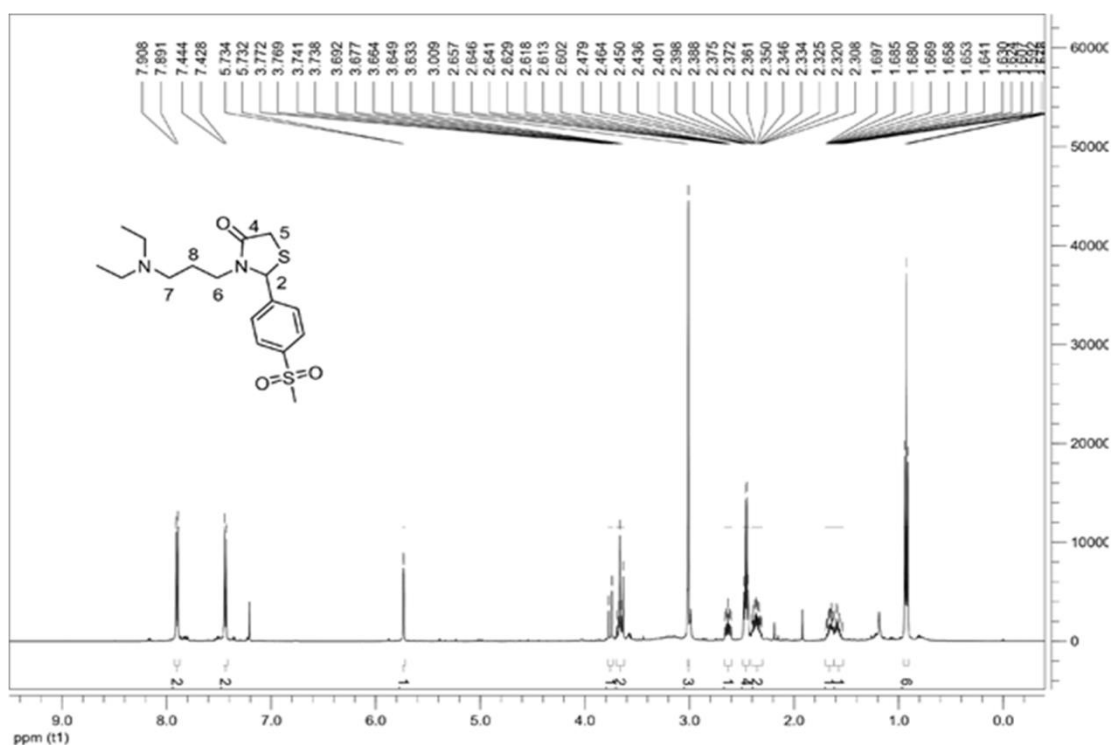


Figure S32. ^{13}C NMR spectrum of compound 2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one **6b**.



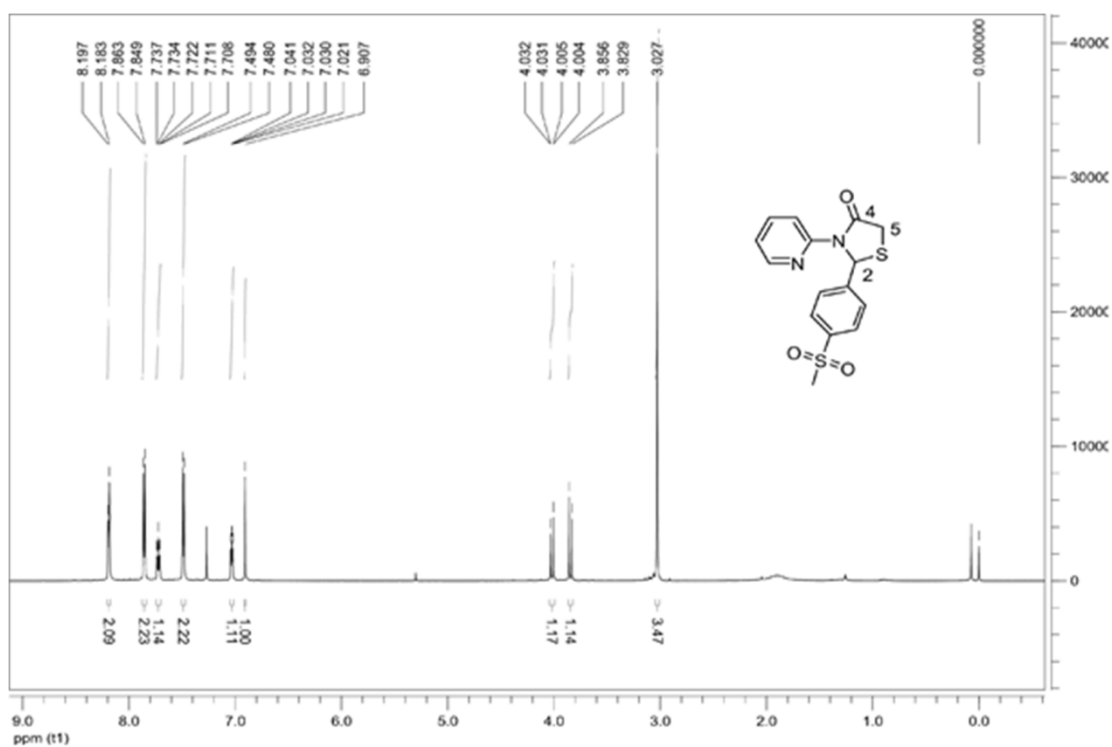


Figure S35. ^1H NMR spectrum of compound 2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one **6d**.

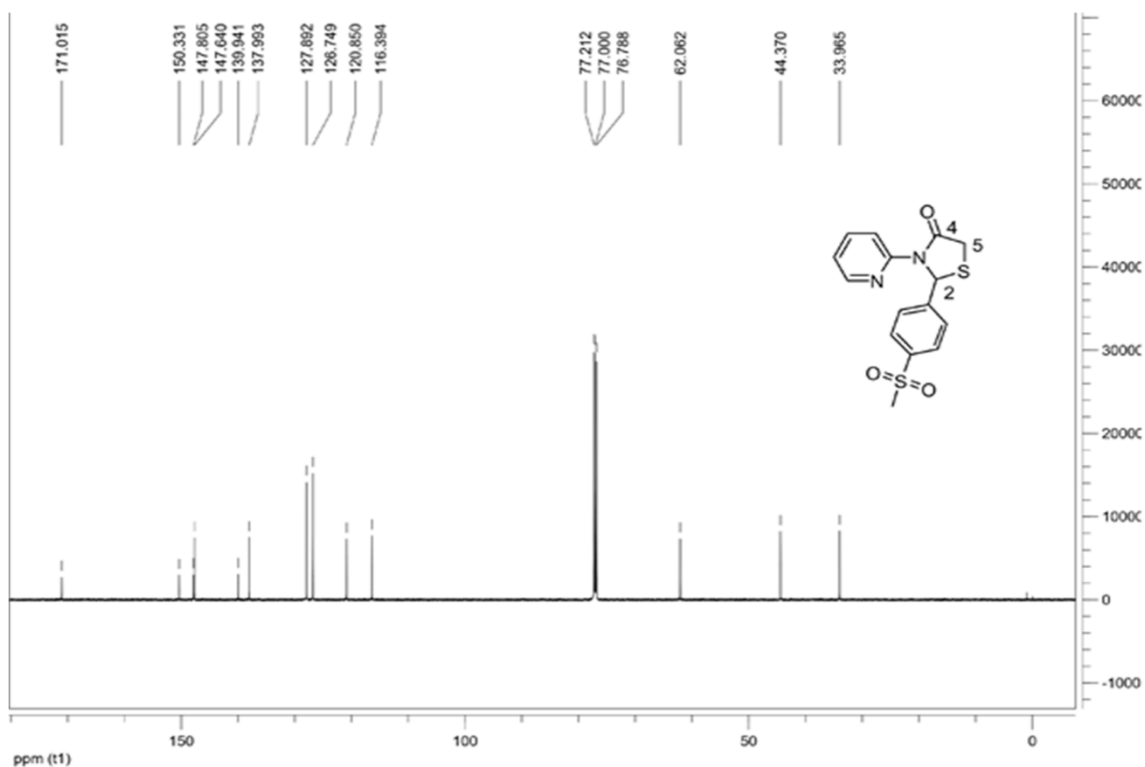


Figure S36. ^{13}C NMR spectrum of compound 2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one **6d**.

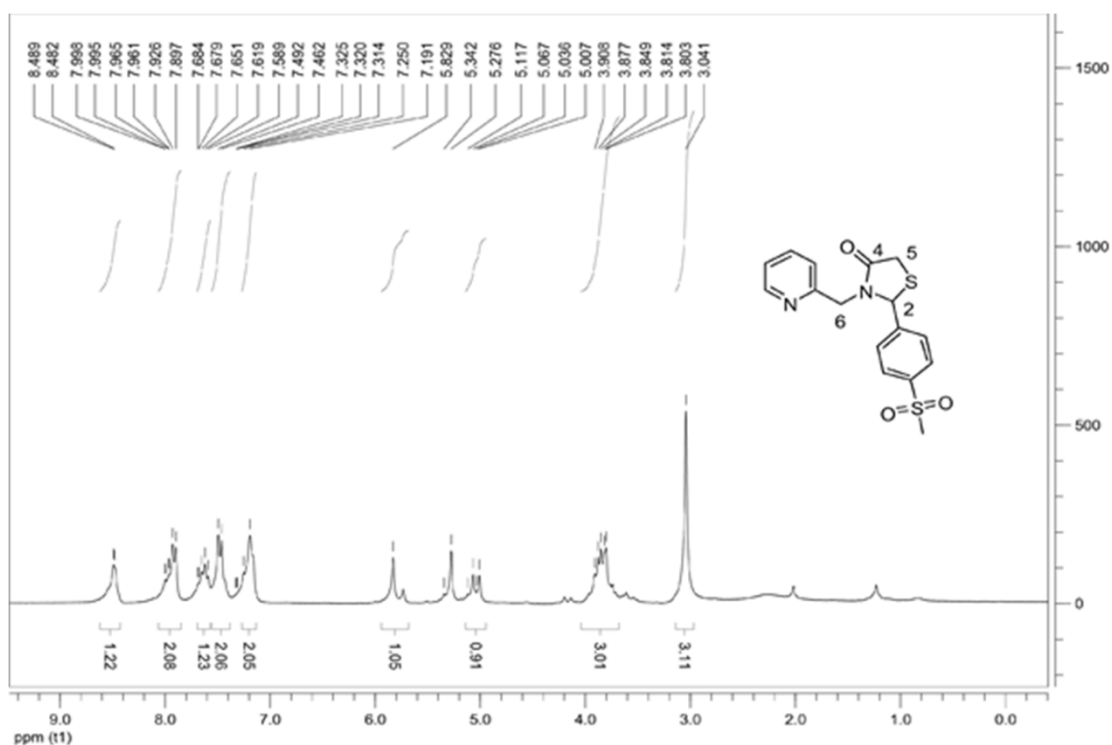


Figure S37. ¹H NMR spectrum of compound 2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(pyridin-2-ylmethyl)thiazolidin-4-one **6e**.

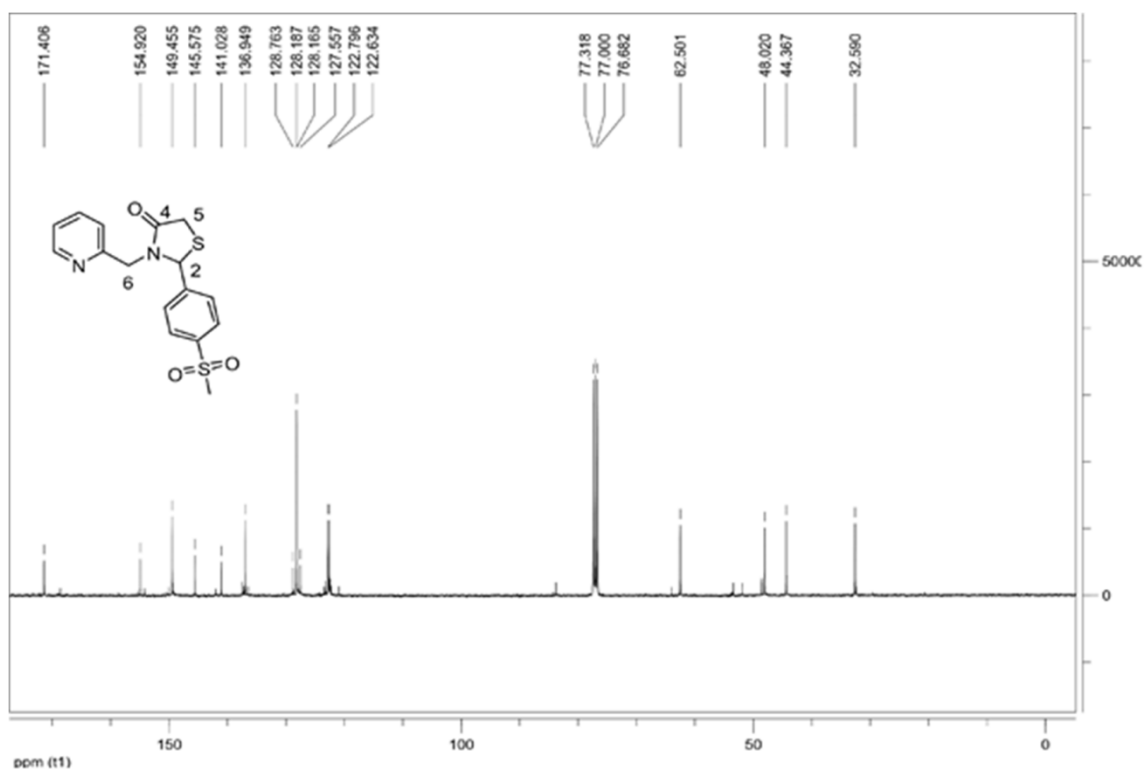


Figure S38. ¹³C NMR spectrum of compound 2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(pyridin-2-ylmethyl)thiazolidin-4-one **6e**.

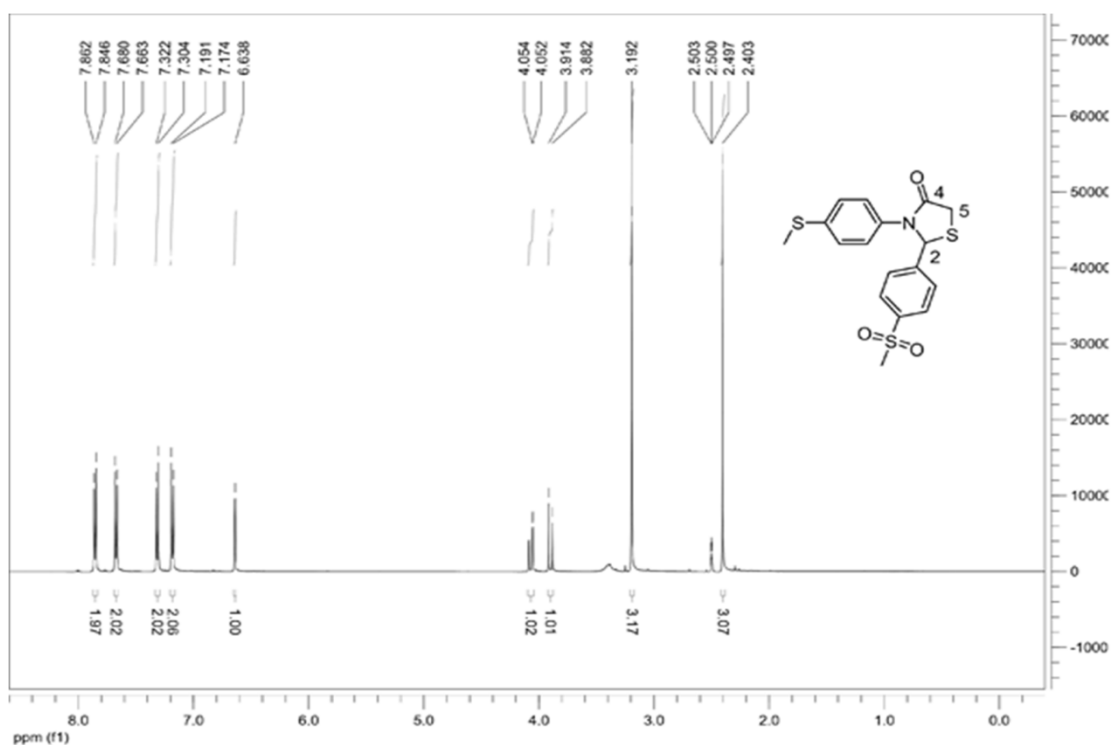


Figure S39. ¹H NMR spectrum of compound 2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one **6f**.

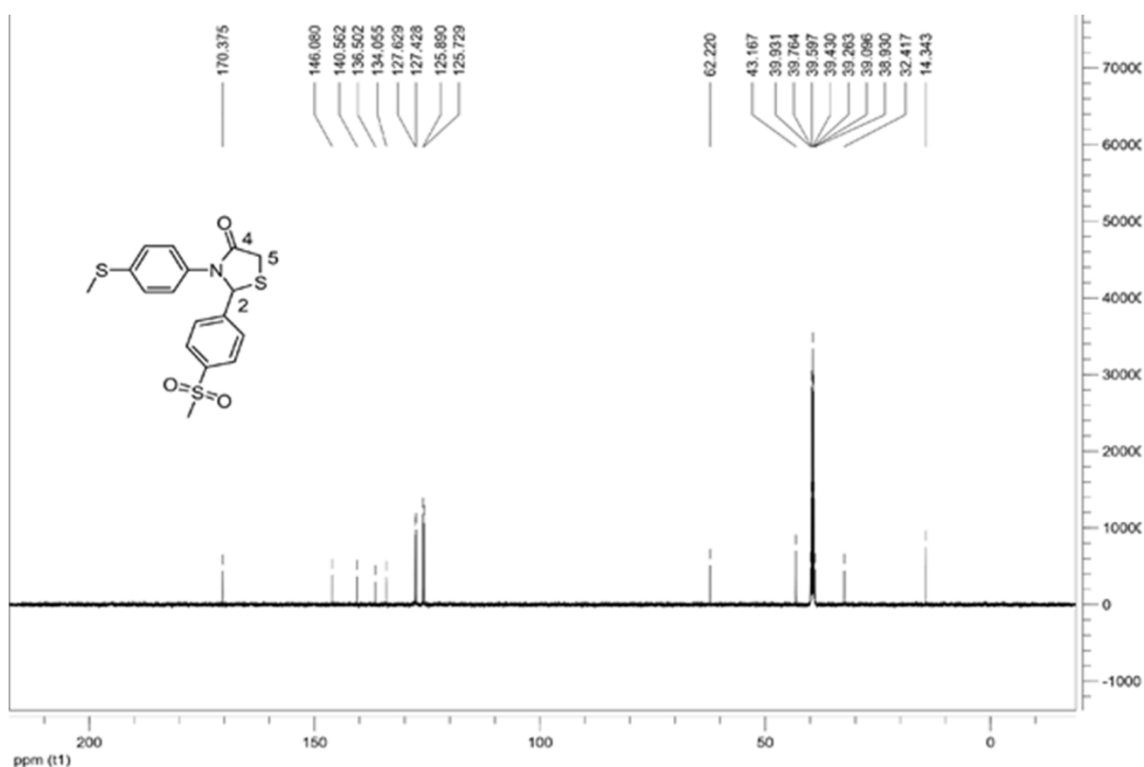


Figure S40. ¹³C NMR spectrum of compound 2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one **6f**.

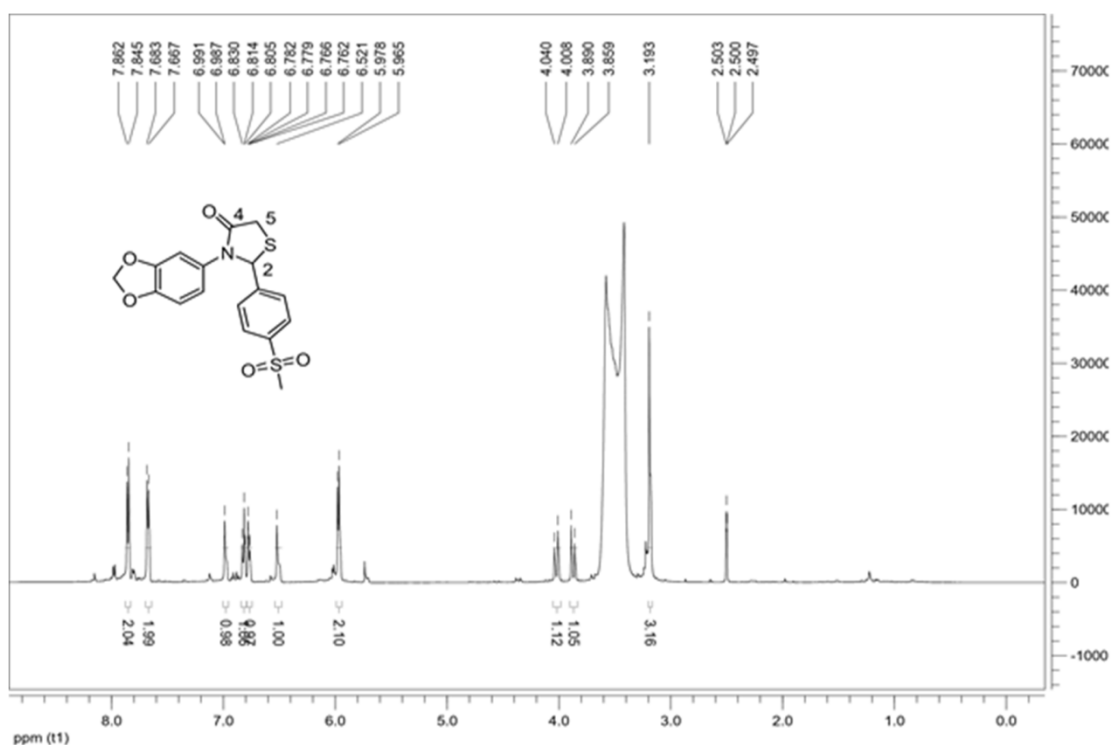


Figure S41. ¹H NMR spectrum of compound 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)thiazolidin-4-one **6g**.

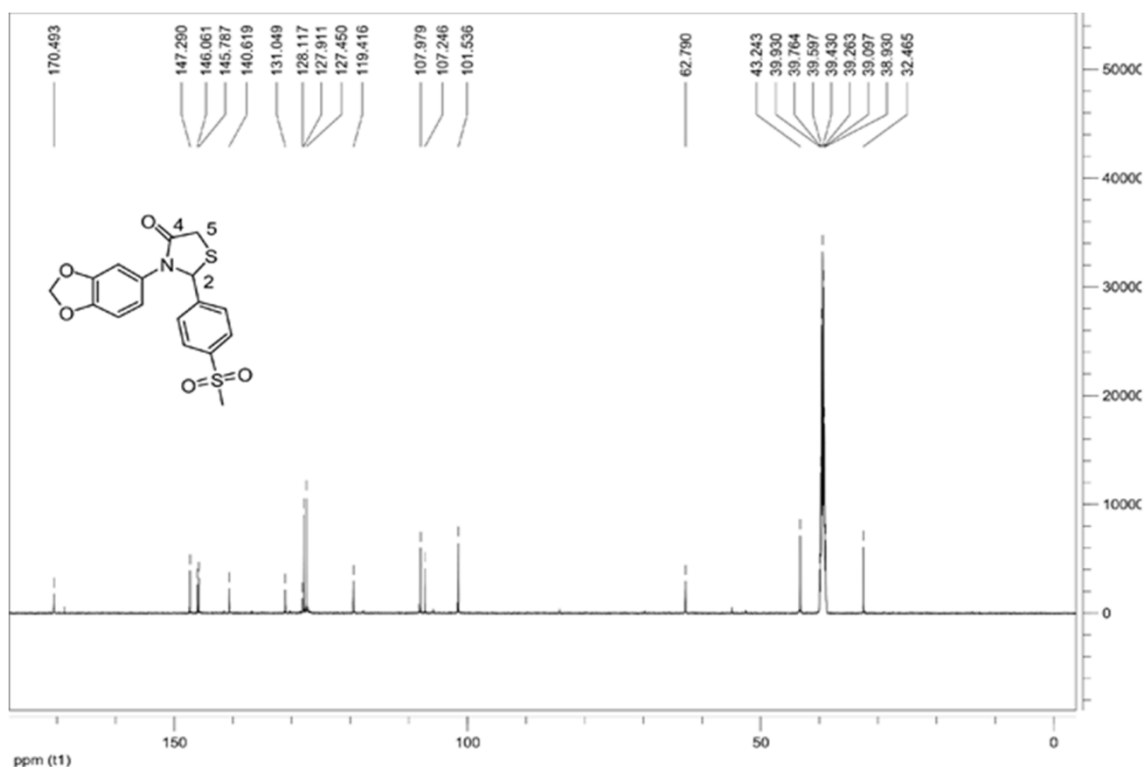
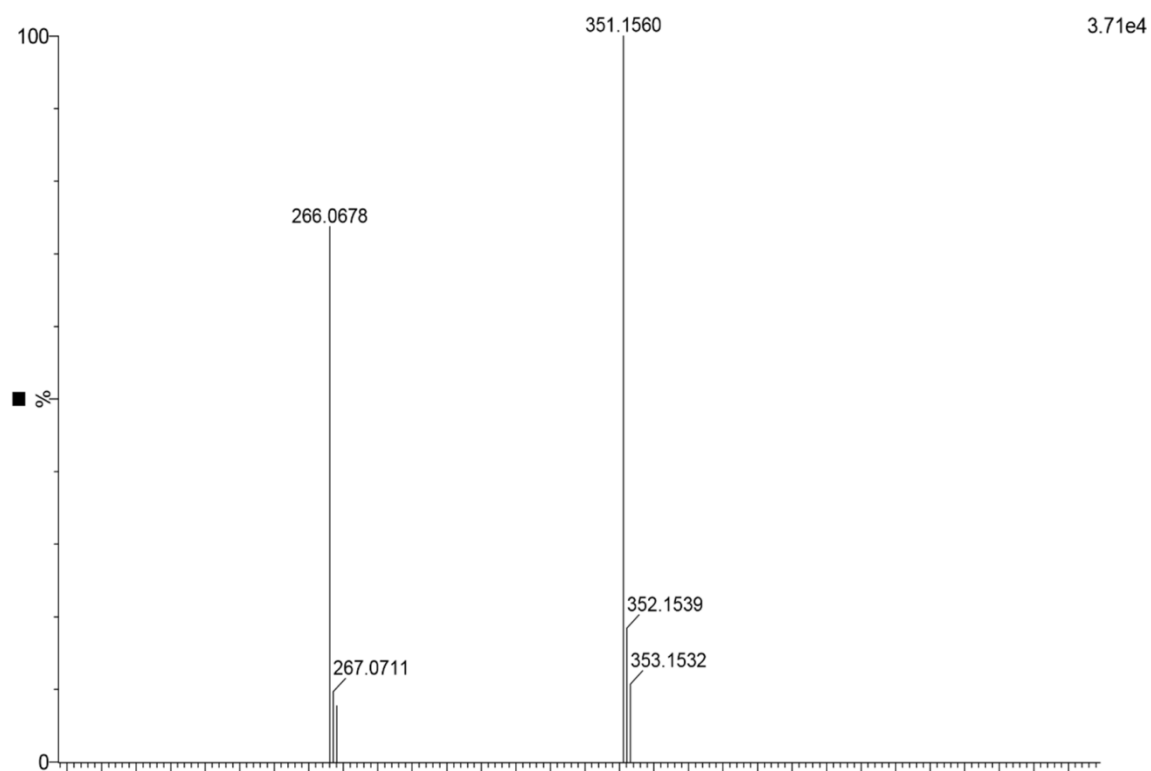


Figure S42. ¹³C NMR spectrum of compound 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)thiazolidin-4-one **6g**.

Found:



Calculated:

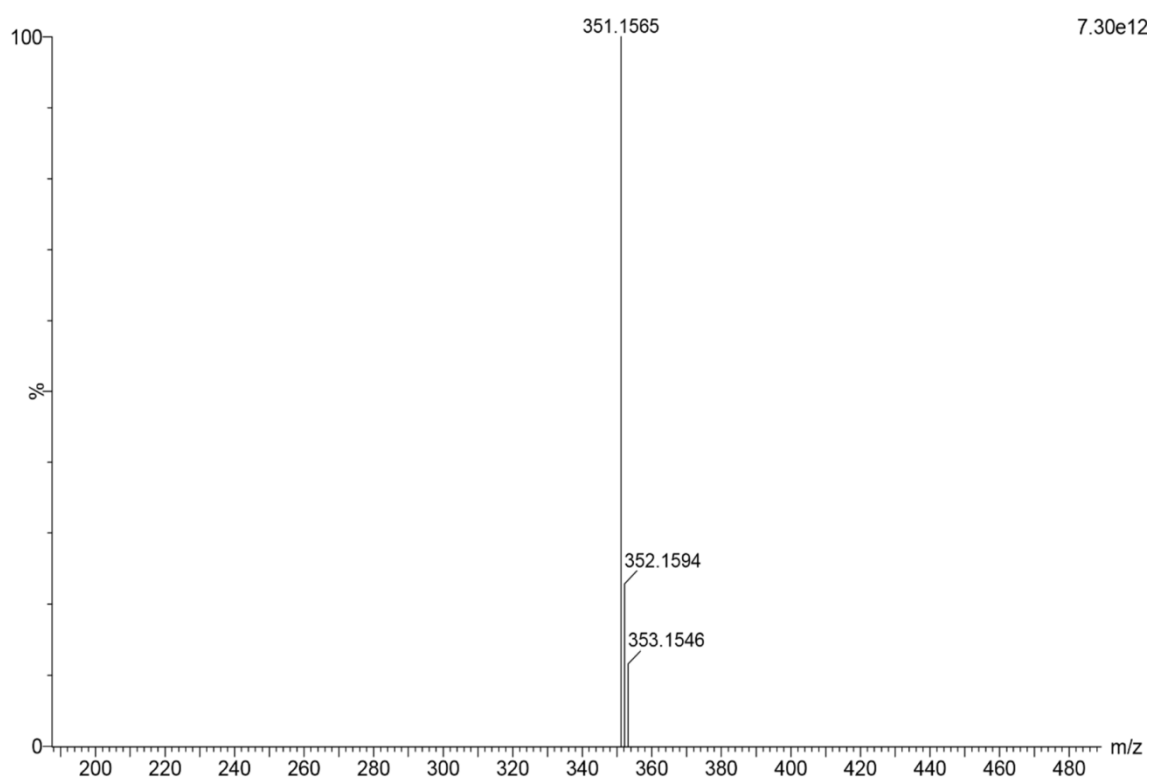
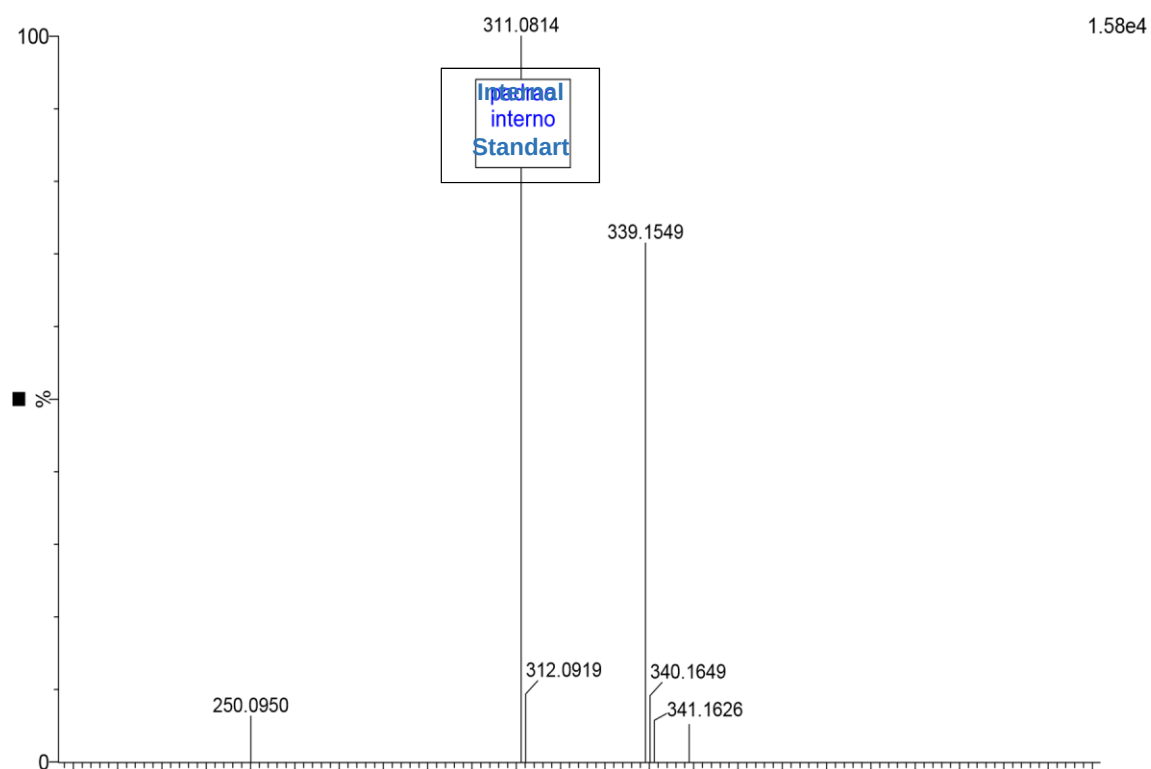


Figure S43. HRMS of compound 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one **5b**.

Found:



Calculated:

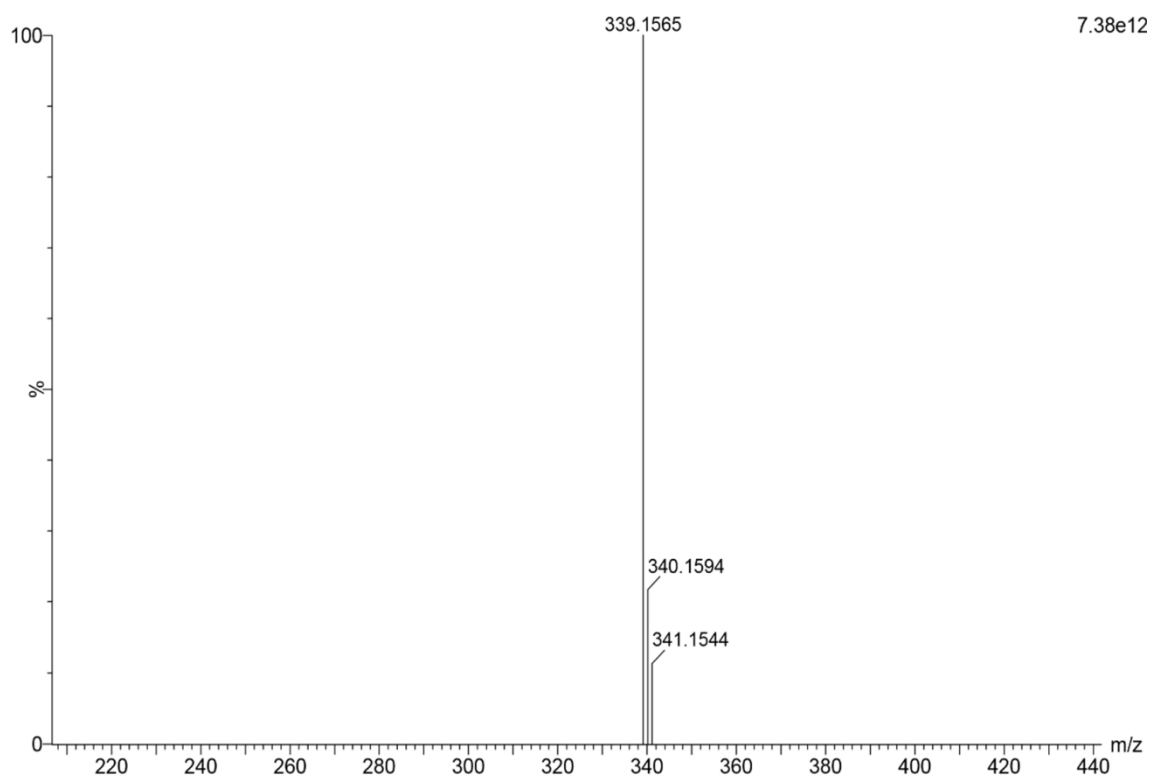
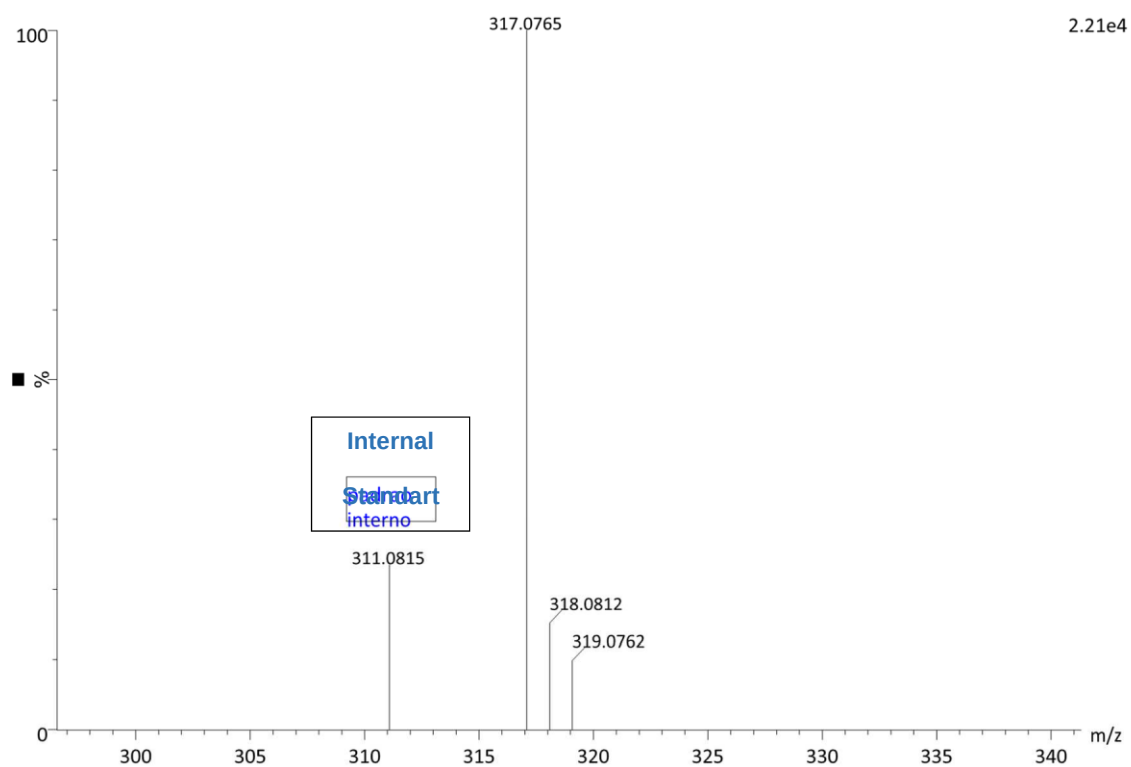


Figure S44. HRMS of compound 3-(3-(diethylamino)propyl)-2-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one **5c**.

Found:



Calculated:

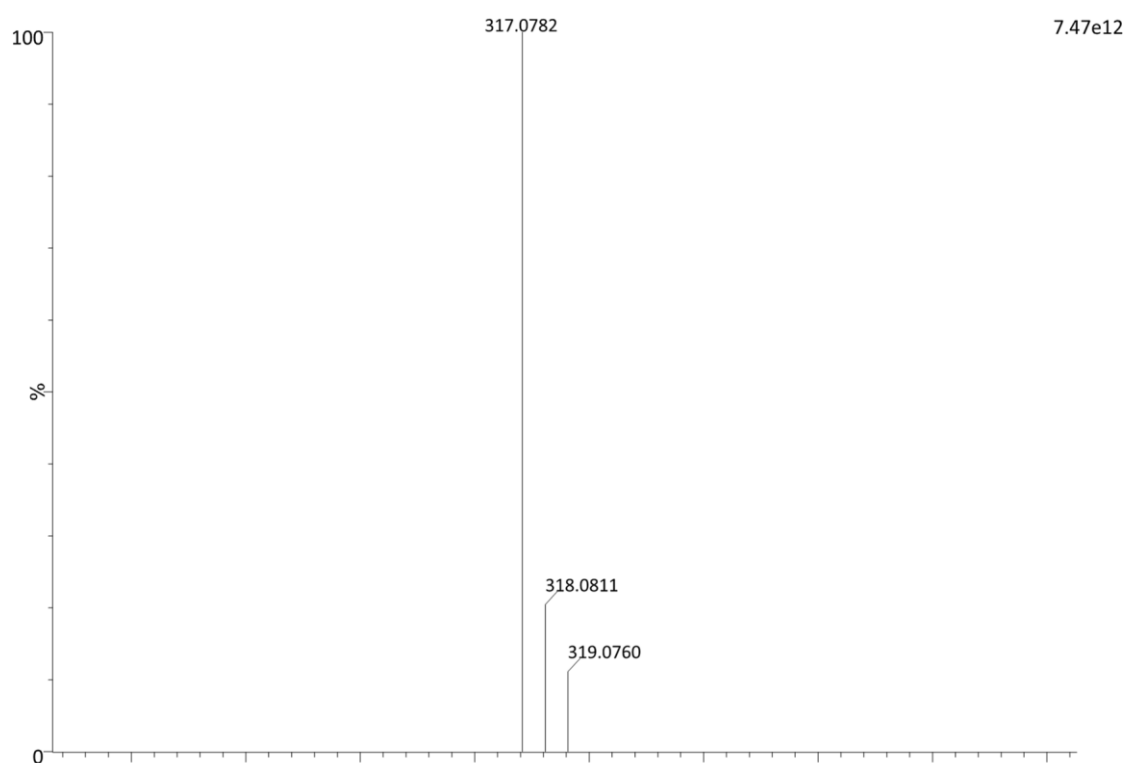
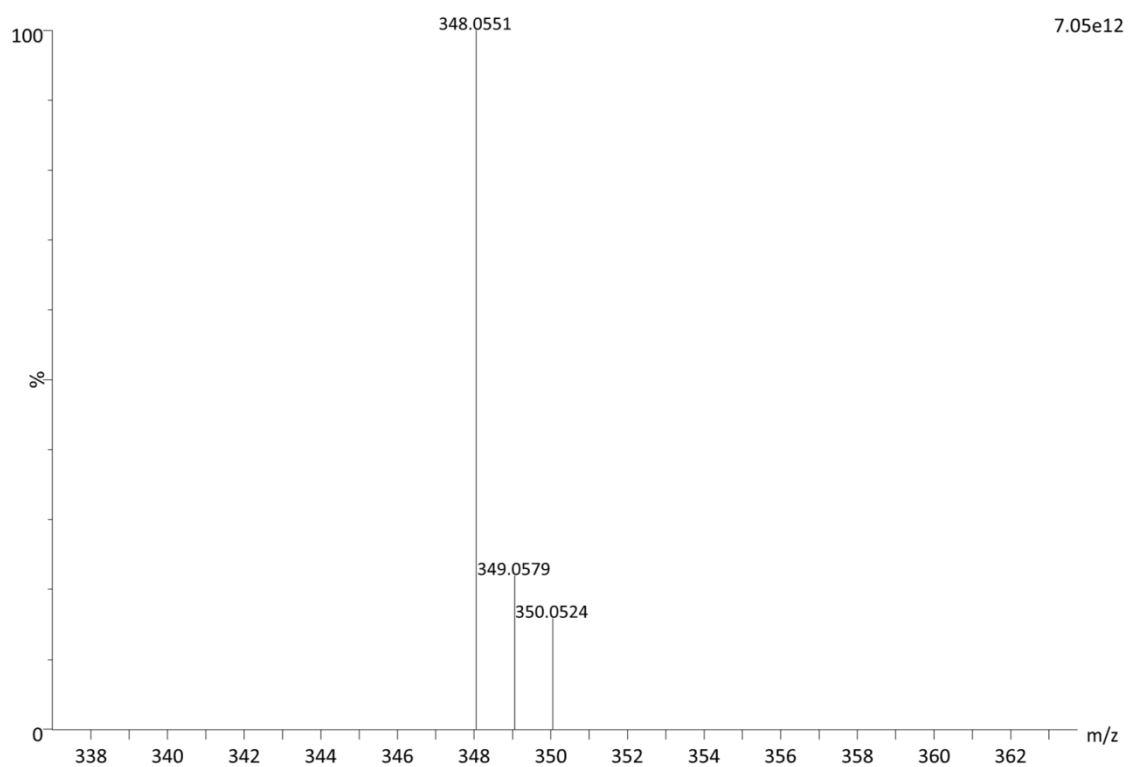


Figure S45. HRMS of compound 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(pyridin-2-ylmethyl)thiazolidin-4-one **5e**.

Found:



Calculated:

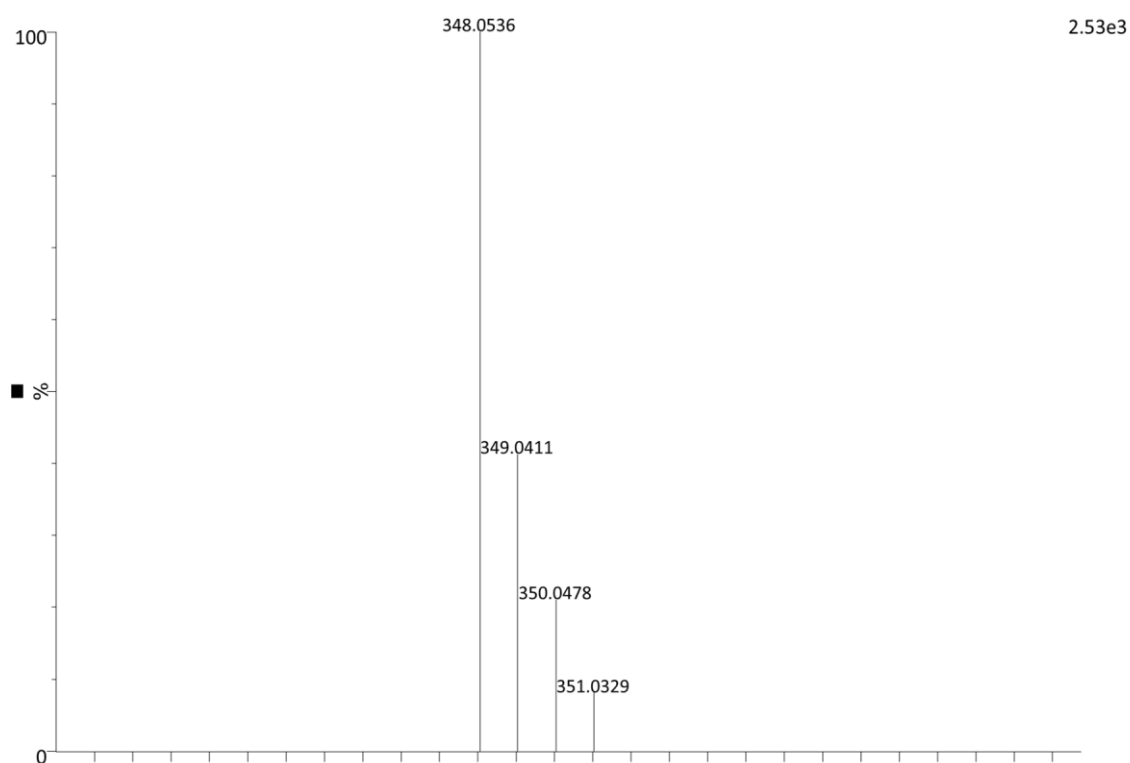
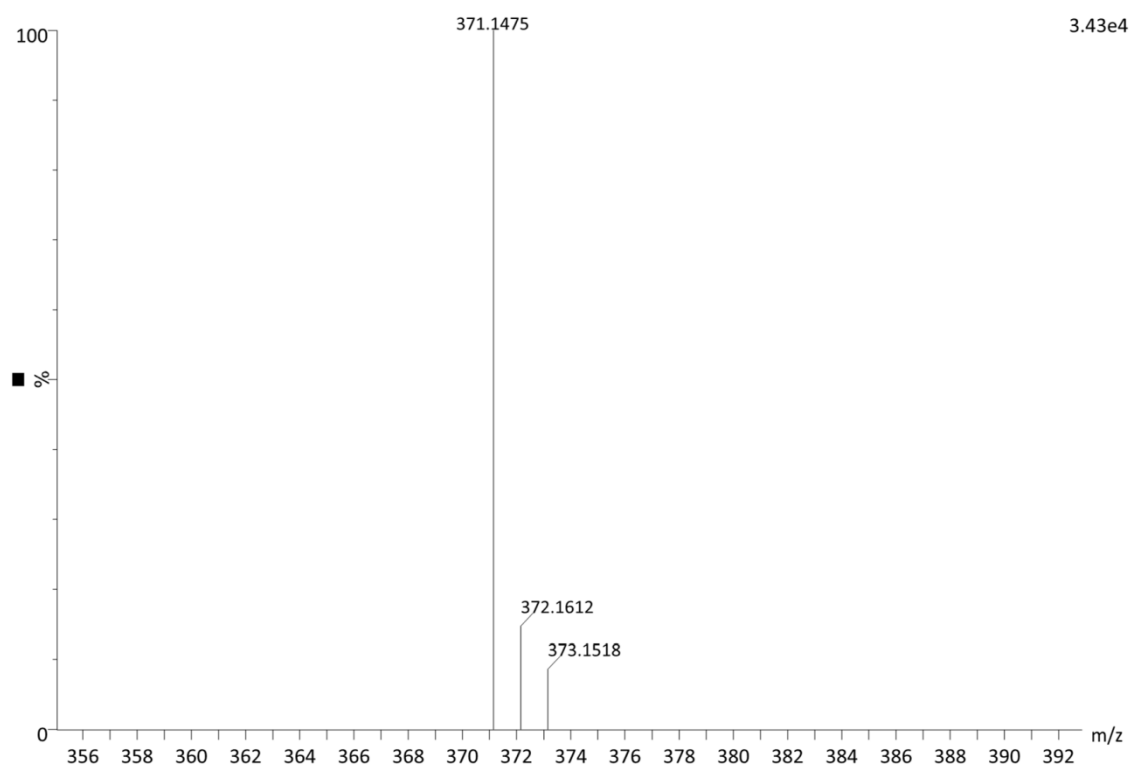


Figure S46. HRMS of compound 2,3-bis(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one **5f**.

Found:



Calculated:

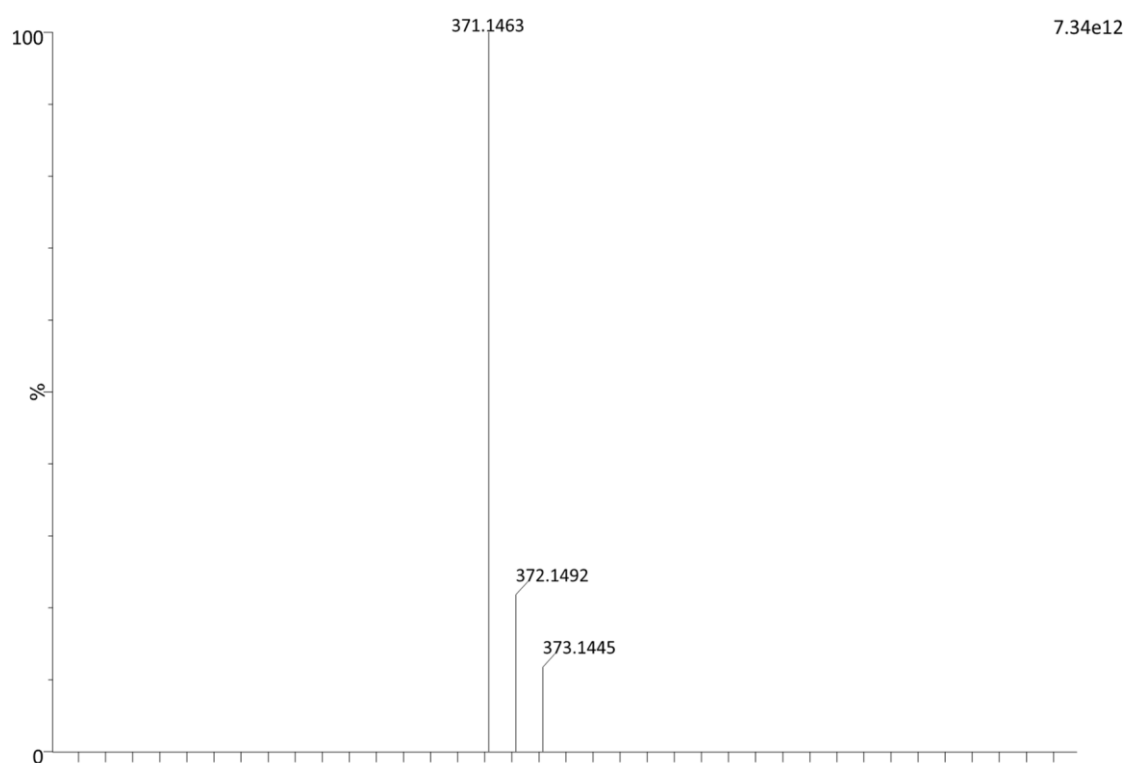


Figure S47. HRMS of compound 2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(pyridin-2-yl)thiazolidin-4-one **6d**.

5. Conclusão

É importante destacar a obtenção de quatorze novas tiazolidinonas devidamente identificadas e caracterizadas. Todas as condições reacionais apresentaram-se eficientes na síntese dos compostos propostos. Considerando os melhores resultados das tiazolidinonas na inibição da AChE em linfócitos e no ensaio do MTT em células CHO, três compostos (**5c**, **6b**, **6c**) foram considerados potenciais inibidores da acetilcolinesterase e seguros, com possibilidade de tornarem-se agentes anti-inflamatórios. Poucos compostos apresentaram efeito inibitório no ensaio da enzima ADA, no entanto apenas em altas concentrações. Levando em conta os resultados obtidos na avaliação antitumoral, pelo menos quatro compostos (**5b**, **5e**, **5g**, **6e**) podem ser considerados potenciais agentes para o tratamento de gliomas. O prognóstico e a quimioresistência à terapia do GBM tornam a pesquisa por novos agentes terapêuticos extremamente relevante, incluindo dentre esses as tiazolidinonas, e os compostos sintetizados demonstraram excelente potencial anti glioma com inibição significativa em baixas doses.

Finalmente, novos estudos são necessários para a avaliação do mecanismo correto de inibição da AChE e de morte celular. Adicionalmente, a relação estrutura-atividade deve ser melhor avaliada a fim de tentar definir grupamentos importantes para a atividade. Ainda, ressalta-se que novos estudos têm sido fundamentados, incluindo ensaios *in vivo* a fim de confirmar o potencial dessas tiazolidinonas como agentes terapêuticos seguros com atividade anticolinesterásica e/ou antitumoral.

6. Referências Bibliográficas

ARMSTRONG, T.S. et al. A case of soft tissue metastasis from glioblastoma and review of the literature. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 103, p. 167-172, 2011.

ASTHAGIRI, A.R. et al. Advances in Brain Tumor Surgery. **Neurologic Clinics**, v. 25, p. 975-1003, 2007.

BEHIN, A. et al. Primary brain tumours in adults. **The Lancet**, v. 361, p. 323-331, 2003.

BOSENBECKER, J. et al. Synthesis and Antioxidant Activity of 3-(Pyridin-2-ylmethyl)-1,3-thiazinan(thiazolidin)-4-ones. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 28, n. 9, p. 425-432, 2014.

BOTOS, I.; SEGAL, D.M.; DAVIES, D.R. The Structural Biology of Toll-Like Receptors. **Structure**, v. 19, n. 4, p. 447-459, 2011.

BOURS, M.J. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12.ed. Porto Alegre: MacGraw-Hill Brasil, 2012. 2079 p.

BRUZZESE, L. et al. NF- κ B enhances hypoxia-driven T-cell immunosuppression via upregulation of adenosine A2A receptors. **Cellular Signalling**, v. 26, p. 1060–1067, 2014.

BURGER, P.C. et al. Pathology of diencephalic astrocytomas. **Pediatric Neurosurgery**, v. 32, n. 4, p. 214-219., 2000.

BURNSTOCK, G. Purinergic Signaling and Vascular Cell Proliferation and Death. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, p. 364-373, 2002.

CHEN, R. et al. Cancers take their Toll—the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. **Oncogene**, v. 27, p. 225–233, 2008.

COLOTTA, F. et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 7, p.1073–1081, 2009.

COSTA, M.M. et al. Cholinesterase as inflammatory markers in a experimental infection by *Trypanosoma evansi* in rabbits. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 4, p. 1105-1113, 2012.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, p. 860-867, 2002.

DEEP, A. et al. Synthesis of 2-(aryl)-5-(arylidene)-4-thiazolidinone derivatives with potential analgesic and anti-inflammatory activity. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, p. 1652-1659, 2012.

ERICSON-NEILSEN, W.; KAYE, A.D. Steroids: Pharmacology, Complications, and Practice Delivery Issues. **The Ochsner Journal**, v.14, p. 203-207, 2014.

FERREIRA, L.M. et al. Ketoprofen-loaded pomegranate seed oil nanoemulsion stabilized by pullulan: Selective anti-glioma formulation for intravenous administration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 130, p. 272–277, 2015.

FIRESTEIN, G.S. et al. **Kelley's Textbook of Rheumatology**. 9.ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2013. 2292p.

FITZGERALD, G.A. Coxibs and Cardiovascular Disease. **The New England Journal of Medicine**, v.351, n.17, p. 1709-1711, 2004.

GOUVÊA, D.P. et al. Ultrasonics promoted synthesis of thiazolidinones from 2-aminopyridine and 2-picolilamine. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 1127–1131, 2012.

HANDA, O. et al. The impact of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the small intestinal epithelium. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 54, p. 2-6, 2014.

HARRIS, R.E.; CASTO, B.C.; HARRIS, Z.M. Cyclooxygenase-2 and the inflammation of breast cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 4, p. 677-692, 2014.

HOLLAND, E.C. Progenitor cells and glioma formation. **Current Opinion in Neurology**, v. 14, n. 6, p. 683-688, 2001.

HU, J. et al. Synthesis and biological evaluation of novel thiazolidinone derivatives as potential anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 292-301, 2013.

HUANG, B. et al. TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. **Oncogene**, v. 27, p. 218-224, 2008.

JAIN, A.K. et al. Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2012.

JUNQUERA, E.C. et al. Recent Advances in the Development of Anti-Infective Prophylactic and/or Therapeutic Agents Based on Toll-Like Receptor (TLRs). **Recent patents on Anti-infective Drug Discovery**, v. 9, p. 14-24, 2014.

JUNTILA, M.R.; SAUVAGE, F.J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. **Nature**, v. 501, p. 346-354, 2013.

KAMAL, M.A.; GREIG, N.H.; REALE, M. Anti-Inflammatory Properties of Acetylcholinesterase Inhibitors Administered in Alzheimer's Disease. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 85-100, 2009.

KANU, O.O. et al. Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. **Clinical Medicine Oncology**, v. 3, p. 39-52, 2009.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life Sciences**, v. 74, p. 675–696, 2003.

KAWASHIMA, K. et al. Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. **Life Sciences**, v. 91, p. 1027–1032, 2012.

KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. **Toxicologic Pathology**, v. 28, n. 1, p. 164-170, 2000.

KOEBERLE, A.; WERZ, O. Multi-target approach for natural products in inflammation. **Drug Discovery Today**, 2014.

KUMAR, V. Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: where to go? **Purinergic Signalling**, v. 9, p. 145–165, 2013.

KUNZLER, A. et al. Synthesis, antifungal and cytotoxic activities of 2-aryl-3-((piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidinones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 74-80, 2013.

LAWS JR, E.R.; SHAFFREY, M.E. The inherent invasiveness of cerebral gliomas: implications for clinical management. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 17, n. 5-6, p. 413-420, 1999.

LIU, Y. et al. Association between nonsteroidal anti-inflammatory drug use and brain tumour risk: a meta-analysis. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 78, n. 1, p. 58–68, 2013.

LOUIS, D.N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97-109, 2007.

MARQUES, G.H. et al. Antifungal Activity of 3-(heteroaryl-2-ylmethyl)thiazolidinone Derivatives. **Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 355-360, 2014.

MASTELOTO, H.G. 3,4-(Methylenedioxy)aniline as precursor to the synthesis of thiazolidin-4-ones. **Monatshefte für Chemie**, v. 146, p. 327–334, 2015.

MRUGALA, M.M. Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. **Discovery Medicine**, v. 15, n. 83, p. 221-230, 2013.

NANDAGOKULA, C. et al. Synthesis, characterization, and biological evaluation of some N-aryl hydrazones and their 2,3-disubstituted-4-thiazolidinone derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, p. 253-266, 2013.

NEUENFELDT, P.D. et al. Efficient sonochemical synthesis of thiazolidinones from piperonilamine. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 65-67, 2011.

NEVES, A.M. et al. Thiazolidin-4-ones from 3-(Aminomethyl)pyridine, Arenealdehydes and Mercaptoacetic Acid: Synthesis and Radical Scavenger Activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 2, p. 381-388, 2015.

NEWLANDS, E.S. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. **Cancer Treatment Reviews**, v. 23, n. 1, p. 35-61, 1997.

OLIVA, C.R. et al. Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 39759–39767, 2010.

PATRICK, G.L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 4.ed. New York: Oxford University Press, 2009. 752 p.

PATRIGNANI, P.; PATRONO, C. Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2014.

POLACHINI, C.R.N. et al. Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis. **Neuroscience**, v. 266, p. 266-274, 2014.

RADMARK, O. et al. 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2014.

RAYBURN, E.R.; EZELL, S.J.; ZHANG, R. Anti-Inflammatory Agents for Cancer Therapy. **Molecular and Cellular Pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 29–43, 2009.

ROBINS, I.H. et al. Therapeutic Advance for Glioblastoma Multiforme: Current Status and Future Prospects. **Current Oncology**, v. 9, p. 66-70, 2007.

RODRIGUES, R. et al. Alterations of ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in lymphocytes of Down syndrome subjects: Relation with inflammatory parameters. **Clinica Chimica Acta**, v. 433, p. 105-110, 2014.

SANAI, N.; ALVAREZ-BUYLLA, A.; BERGER, M.S. Neural stem cells and the origin of gliomas. **New England Journal of Medicine**, p. 353-811, 2005.

SATHORNSUMETEE, S. et al. Tumor Angiogenic and Hypoxic Profiles Predict Radiographic Response and Survival in Malignant Astrocytoma Patients Treated With Bevacizumab and Irinotecan. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 2, p. 271-278, 2008 A.

SATHORNSUMETEE, S.; RICH, J.N. Designer Therapies for Glioblastoma Multiforme. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1142, p. 108–132, 2008 B.

SHAIKH, P.Z. Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: A review. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**, v. 2, n. 11, p. 1247-1263, 2011.

SHELKE, S.H. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of a novel series of 3-aryl-2-(2-substituted-4-methylthiazole-5-yl)thiazolidin-4-one as possible anti-inflammatory and antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 6373-6376, 2012.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 1325 p.

SILVEIRA, E.F. et al. Ketoprofen-loaded polymeric nanocapsules selectively inhibit cancer cell growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma multiforme. **Investigational New Drugs**, v. 31, p. 1424–1435, 2013.

SINGH, S.K., et al. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature**, v. 432, p. 396-401, 2004.

STUPP, R. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 10, p. 987-996, 2005.

STUPP, R.; HEGI, M.E.; GILBERT, M.R.A. Chakravarti Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, p. 4127-4136, 2007.

STUPP, R. et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide *versus* radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-Year analysis of the EORTC-NCIC trial. **The Lancet Oncology**, v. 10, p. 459–466, 2009.

TRIPATHI, A.C. et al. 4-Thiazolidinones: The advances continue... **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 72, p. 52-77, 2014.

ULRICH, C.M.; BIGLER, J.; POTTER, J.D. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. **Nature**, v. 6, p. 130-140, 2006.

VREDENBURGH, J.J. et al. Experience with irinotecan for the treatment of malignant glioma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 11, p. 80-89, 2009.

YAMAMOTO, M.; TAKEDA, K. Current Views of Toll-Like Receptor Signaling Pathways. **Gastroenterology Research and Practice**, 2010.

YIN, L.T. et al. Potential biochemical therapy of glioma cancer. **Biochemical and Biophysical**, v. 362, p. 225-229, 2007.

ZAVIALOV, A.V. et al. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, p. 279-290, 2010.

ZOU, W.; RESTIFO, N.P. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 4, p. 248-256, 2010.