

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE

Silvia Cordeiro das Neves

**Avaliação dos efeitos de um lipídio resorcinólico e de uma norcantarimida
sobre o DNA e suas interferências na ação de quimioterápicos comerciais**

CAMPO GRANDE
2023

Silvia Cordeiro das Neves

Avaliação dos efeitos de um lipídio resorcinólico e de uma norcantarimida sobre o DNA e suas interferências na ação de quimioterápicos comerciais

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de Pesquisa: Tecnologia em Saúde

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

CAMPO GRANDE
2023



Ata de Defesa de Tese
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste
Doutorado

Aos vinte e sete dias do mês de novembro do ano de dois mil e vinte e três, às oito horas e trinta minutos, no Anfiteatro I (Bloco 9 - FAMED), da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Rodrigo Juliano Oliveira (UFMS), Camila do Nascimento Moreira (UFMS), Mariana de Oliveira Mauro (UEMS), Mychelle Vianna Pereira Companhoni (UFMS) e Silvio Assis de Oliveira Junior (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **SILVIA CORDEIRO DAS NEVES**, CPF 28761671827, Área de concentração em Tecnologia e Saúde, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE UM LIPÍDIO RESORCINÓLICO E DE UMA NORCANTARIMIDA SOBRE O DNA E SUAS INTERFERÊNCIAS NA AÇÃO DE QUIMIOTERÁPICOS COMERCIAIS**" e orientação de Rodrigo Juliano Oliveira. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR

ASSINATURA

AValiação

Dr. Rodrigo Juliano Oliveira (Interno)

Aprovado

Dra. Aline Pedrosa Lorenz (Externo) (Suplente)

Dra. Camila do Nascimento Moreira (Externo)

Camila do Nascimento Moreira

Aprovado

Dra. Mariana de Oliveira Mauro (Externo)

Mariana de Oliveira Mauro

Aprovado

Dra. Mychelle Vianna Pereira Companhoni (Externo)

Mychelle Vianna Pereira Companhoni

Aprovado

Dr. Silvio Assis de Oliveira Junior (Interno)

Silvio Assis de Oliveira Junior

Aprovado

Dr. Valter Aragão do Nascimento (Interno) (Suplente)

RESULTADO FINAL:

☒ Aprovação

☐ Aprovação com revisão

☐ Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Presidente da Banca Examinadora

Aluna: _____

Aos meus pais (*in memoriam*) por todo amor, carinho e respeito que sempre tiveram comigo e por sempre me incentivarem a correr atrás dos meus sonhos e nunca desistir. Muito obrigada por tudo. Apesar de não estarem presente fisicamente, sei que de onde estiverem estão torcendo e vibrando com mais essa etapa concluída. Amo vocês.

À Gabriela, meu amor, por sempre estar ao meu lado me incentivando a nunca desistir e acreditar no meu sonho, me apoiando até mesmo nos meus momentos de chatice e entender minha ausência durante todo esse processo. Obrigada por sempre acreditar em mim. Amo você.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre se mostrar presente na minha vida, pois todas as vezes que precisei, Ele estava ao meu lado, suprimindo todas as minhas necessidades.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo pela oportunidade de poder aprender contigo, por toda paciência e disponibilidade de ensinar e acima de tudo de transmitir o seu amor pela ciência que me contagiou e que vou levar para sempre comigo. Te admiro pelo profissional dedicado, por ser um orientador presente em todos os processos. Torço muito pelo seu sucesso.

Aos meus sogros, Vera Lúcia e José Geraldo e minha cunhada Glasi pelo apoio, torcida e incentivo nesse processo e por acreditar no meu sonho.

Às “minhas” IC favoritas Fabricia e Giovana pela ajuda na preparação de material, reagentes e nos experimentos. Pelos momentos de aprendizagem, descontração, desabafos e lanchinhos durante toda essa jornada.

À Thais Farias por tanta troca de conhecimento, pelos momentos de desabafos e por compartilhar o amor pela pesquisa.

Aos amigos de laboratório Diego, Henrique, Luciana, Marcelino, Maria Julia, Mariana, Simone e aos demais colegas e técnicos do CeTroGen por toda ajuda durante esse processo.

Aos professores Silvio Assis de Oliveira Junior, Mychelle Vianna Pereira Companhoni, Camila do Nascimento Moreira, Mariana de Oliveira Mauro, Valter Aragão do Nascimento e Aline Pedroso Lorenz que disponibilizaram seu tempo para contribuir com o meu trabalho aceitando compor minha banca de defesa.

Muito obrigada aos membros do Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste pelo suporte, em especial aos professores do programa. Seus ensinamentos foram muitos e certamente contribuíram positivamente para a minha formação. Ao secretário Ademir Jr., pelo pronto atendimento sempre que solicitado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Quem acredita sempre alcança.
(Renato Russo, 1987)

Resumo

O câncer é a principal causa de óbito, com mais de 19,3 milhões de novos casos, se tornando um impedimento para o aumento da expectativa de vida em todo o mundo. Esses números demonstram que, apesar dos esforços clínicos, os tratamentos não têm o sucesso desejado. Considerando o aumento de novos casos e os altos custos de tratamento dessa doença, é importante destacar a necessidade de estudo de novas moléculas e de conhecimento de terapias associadas para determinar possíveis efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos. Esses conhecimentos podem determinar o desenvolvimento de novas terapias complementares ou adjuvantes e/ou contra indicar a associação de compostos/medicamentos. Por esse motivo, buscou-se avaliar os efeitos de um lipídio resorcinólico e de uma norcantarimida sobre o DNA e suas interferências na ação de quimioterápicos comerciais. O ZIM causa danos genômicos e cromossômicos e ativa a fagocitose esplênica e aumenta a frequência de morte celular no fígado e nos rins. Já a Phthalide é genotóxica, por aumentar a frequência de micronúcleos. Além disso, causa ativação da fagocitose esplênica e aumento da frequência de morte celular no fígado e nos rins. Quando associado, o ZIM tem efeito quimiopreventivo e interfere no mecanismo da cisplatina, doxorrubicina e ciclofosfamida. Já o Phthalide pode ser considerado um adjuvante quimioterápico, pois potencializa os efeitos da cisplatina e ciclofosfamida. Diante dos resultados, pode-se inferir que o ZIM e o Phthalide têm aplicabilidade clínica e podem ser candidatos ao desenvolvimento de uma nova geração de agentes quimioterápicos

Palavras-chave: quimioterápicos; ZIM, camundongos Swiss; câncer.

Abstract

Cancer stands as the main cause of mortality, with over 19.3 million new cases, posing a hindrance to the global increase in life expectancy. These numbers demonstrate that, despite clinical efforts, treatments do not achieve the desired success. Considering the increasing incidence of new cases and the high costs associated of treating this disease, it is important to emphasize the need for the exploration of novel molecules and to understand the effects of associated therapies to determine potential synergistic, additive, or antagonistic effects. This knowledge may determine the development of new complementary or adjunctive therapies and/or contraindicate the combination of compounds/medications. Hence, this study aimed to assess the effects of a resorcinolic lipid and a norcantharimide on DNA and their interference with the action of commercial chemotherapy drugs. ZIM induces genomic and chromosomal damage, activates splenic phagocytosis, and increases the frequency of cell death in the liver and kidneys. Conversely, Phthalide exhibits genotoxicity by increasing micronucleus frequencies. Additionally, it activates splenic phagocytosis and elevates the frequency of cell death in the liver and kidneys. When combined, ZIM demonstrates chemopreventive effects and interferes with the mechanisms of cisplatin, doxorubicin, and cyclophosphamide. Phthalide, on the other hand, can be considered a chemotherapeutic adjuvant as it potentiates the effects of cisplatin and cyclophosphamide. Based on these results, it can be inferred that ZIM and Phthalide hold clinical applicability and may serve as candidates for the development of a new generation of chemotherapeutic agents.

Keywords: chemotherapy drugs; ZIM, Swiss mice; cancer.

Lista de figuras

Figura 1. Grupo farmacofórico 1,4-dioxo-2-butenil e derivados	17
Figura 2. Metabolização da 4-aminoantipirina.	18
Figura 3. Delineamento experimental apresentando a distribuição dos animais de acordo com os diferentes tratamentos.	27
Figura 4. Delineamento experimental apresentando a distribuição dos animais de acordo com os diferentes tratamentos	29
Figura 5. Visualização da Estrutura do B-DNA Dodecamer	32

Artigo 1

Figura 1. Cantaridina e derivados.	36
Figura 2. Comparação do efeito quimiopreventivo de compostos	37
Figura S1: Representação esquemática do projeto experimental <i>in vivo</i> .	42
Figura 3. Visualização da Estrutura do B-DNA Dodecamer	45
Esquema 1. Estratégia Sintética para Obtenção dos Compostos Seleccionados	46
Figura 4. Avaliação de genotoxicidade: dano ao DNA	49
Figura 5. Avaliação de genotoxicidade: Danos cromossômicos	52
Figura 6. Ensaio de morte celular e porcentagem de DR	54
Figura 7. Frequência da porcentagem de fagocitose esplênica de DR	56
Figura 8. Interações entre os compostos	61
Figura 9. Interações de A. 4-aminoantipirina (4 AA); B. composto 1; C. composto 2; e D. ZIM.	62
Esquema 2. Comparação da Abordagem da Literatura (2A) e Nossa Abordagem (2B) para a Estratégia Sintética para Obtenção de ZIM	64

Artigo 2

Figura 1. Estruturas químicas dos análogos do citosporona.	79
Figura 2. Parâmetros biométricos de camundongos tratados com Phthalide 1.	81
Figura 3. Frequência de micronúcleos e porcentagem de redução de dano	84
Figura 4. Frequência da fagocitose esplênica.	86
Figura 5. Frequência de morte celular.	88
Figura 6. Estrutura dos compostos.	89
Figura 7. Interações entre os compostos (pontos vermelhos) e B-DNA: 1 (A), ciclofosfamida (B) e cisplatina (C).	90

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1. Resultados de contagem diferencial de células sanguíneas para tratamentos com 4-AA	58
Tabela 2. Resultados de contagem diferencial de células sanguíneas para tratamentos com ZIM	59
Tabela 3. Energias de interação do complexo ligante-receptor com B-DNA (cristalizado)	61

Artigo 2

Tabela 1. Média $\pm$ erro padrão do peso inicial e peso final de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com diferentes doses de 1.	80
Tabela 2. Média $\pm$ erro padrão dos pesos absolutos dos órgãos de camundongos <i>Swiss</i> , coletados após o período experimental.	82
Tabela 3. Frequência média $\pm$ erro padrão da média e percentual de redução de dano referente a ensaios de micronúcleos em sangue periférico de camundongos <i>Swiss</i> (machos).	85
Tabela 04. Valor absoluto, erro padrão médio e percentual referente ao ensaio de fagocitose esplênica em camundongos <i>Swiss</i> .	87
Tabela 05 - Valor absoluto, erro padrão médio de células hepáticas e renais em apoptose, camundongos <i>Swiss</i> (machos), tratados com diferentes doses de 1, associado a ciclofosfamida e cisplatina.	89

Lista de Abreviações

CEUA – Comitê de Ética no uso de animais em pesquisa e ensino

CIS – Cisplatina

CYP – Ciclofosfamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DOX – Doxorrubicina

GLOBOCAN – Agência Internacional para Pesquisa em Câncer

IAGRO – Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal

ID – Incremento de Dados

IDH – índice de Desenvolvimento Humano

INCA – Instituto Nacional do Câncer

MM – Mecânica Molecular

MNT – Ensaio de Micronúcleo

NMR – Ressonância Magnética Nuclear

OMS – Organização Mundial da Saúde

PDB - Banco de Dados de Proteína

PPT – Sistema de Purificação de Solvente

RD – Redução de Dados

RMN – Ressonância magnética

RNA – Ácido Nucleico

SCGE – Eletroforese em Gel Unicelular

TLC – Cromatografia em Camada Fina

UFMS – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

UV – Ultra Violeta

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Câncer.....	15
1.2 Grupos farmacofóricos 1,4-dioxo-2-butenil e 4-aminoantipirina	17
1.3 Lipídios Resorcinólicos.....	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Síntese do ZIM.....	23
3.2 Síntese da Phthalide	24
3.3 Agentes Químicos	25
3.4 Protótipos quimioterápicos	25
3.4.1 4-AA	25
3.4.2 Phthalide	25
3.5 Delineamento experimental.....	26
3.5.1 ZIM e 4-AA	26
3.5.2 Phthalide	28
3.6 Ensaios Biológicos	29
3.6.1 Ensaio do Cometa.....	29
3.6.2 Ensaio de micronúcleo	30
3.6.3. Morte Celular	30
3.6.4. Ensaio de fagocitose	30
3.6.5 Cálculo da porcentagem de redução ou incremento de danos	31
3.6.6 Contagem Diferencial de Células do Sangue.....	31
3.7. Docking de DNA.....	31
3.7.1. Detalhes Computacionais.....	32
3.7.2. Preparação de Proteína	32
3.7.3. Docagem Molecular.....	32
3.7.4. Seleção de Alvos e Simulações de Docking Molecular	33
3.8 Análise estatística	33
4 Resultados	34
4.1 Artigo 1	34
4.2 Artigo 2	75
5. Conclusão	102
Referências	103
ANEXO A	108
ANEXO B	128

1 INTRODUÇÃO

O câncer é a principal causa de óbito e, portanto, um impedimento para o aumento da expectativa de vida em todo o mundo (Bray *et al.*, 2021). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2019, o câncer foi responsável por ser a principal causa morte de pessoas antes dos 70 anos em 112 países. Segundo dados do relatório da GLOBOCAN, Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, houve, no ano de 2020, mais de 19,3 milhões de novos casos de câncer no mundo, excluindo o carcinoma basocelular. Por isso registrou-se 10 milhões de óbitos em todo mundo (Sung *et al.*, 2021). No Brasil, a estimativa de novos casos de câncer é de 450 mil, excluindo o câncer de pele não melanoma (INCA, 2020).

Entre os cânceres mais incidentes, excetuando os cânceres de pele não melanoma, estão os cânceres de mama feminino (2,3 milhões), pulmão (2,2 milhões), próstata (1,4 milhões), colorretal (1,1 milhões), estômago (1,1 milhões) e fígado (905 mil). Entre os cânceres que mais levaram a óbitos estão o câncer de pulmão (1,8 milhões), colorretal (576 mil), fígado (830 mil), estômago (768 mil) e câncer de mama feminino (684 mil). Nos homens o câncer de pulmão é o mais frequente e o que causa mais morte. Na sequência os cânceres mais incidentes em homens são o câncer de próstata e colorretal e os que causam maior mortalidade são os de fígado e colorretal. Nas mulheres, o câncer de mama é o mais frequente e com a maior letalidade por câncer. Na sequência os mais incidentes são os cânceres colorretal e pulmão e em mortalidade os cânceres de pulmão e colorretal (Sung *et al.*, 2021).

Já no Brasil, entre os cânceres mais incidentes estão o câncer de mama (66 mil) e próstata (66 mil), colorretal (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil). Em homens as maiores incidências são de câncer de próstata (29,2%), colorretal (9,1%), pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%). Nas mulheres destacam-se os cânceres de mama (29,7%), colorretal (9,2%), colo do útero (7,4%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%) (INCA, 2022).

Esses números demonstram que apesar dos esforços clínicos os tratamentos não tem o sucesso desejado e considerando os altos números de

novos casos de câncer e os altos custos de tratamento dessa doença é importante destacar a necessidade de estudo de novas moléculas. Além disso, é importante conhecer o efeito de terapias associados para determinar possíveis efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos. Esses conhecimentos podem determinar o desenvolvimento de novas terapias complementares ou adjuvantes e/ou contra indicar a associação de compostos/medicamentos (Chou, 2006).

1.1 Câncer

O câncer é um importante problema de saúde pública, a sua incidência aumenta regularmente no mundo todo, principalmente em países em desenvolvimento, isso se deve ao envelhecimento e ao crescimento populacional. Os tipos de câncer e as taxas de mortalidade se alteram de acordo com a região em razão das características populacionais, das diferenças socioeconômicas e do Índice de desenvolvimento humano (IDH) do país (Teixeira; Araújo Neto, 2020; Sung *et al.*, 2021). Soma-se a isso o estilo de vida e, em especial, o tipo de alimentação (Yusefi *et al.*, 2018).

O câncer é um termo abrangente que inclui mais de cem tipos diferentes de doenças malignas, que tem como característica comum o crescimento anormal de células que podem invadir tecidos adjacentes ou outros órgãos por meio do processo de metástase (INCA, 2022).

O câncer inicia-se por meio de uma mutação genética, por exemplo, que transmite informações erradas para a célula, causando alterações em especial a liberação da regulação do ciclo celular (Jamasbi *et al.*, 2022). Essas alterações podem afetar o funcionamento de genes-chave para a estabilidade genética e dentre esses destacam-se os proto-oncogenes. Os proto-oncogenes quando mutado tornam-se oncogenes, podem ser responsáveis pela carcinogênese. Esse processo leva uma célula normal a se transformar em célula tumoral (Cooper, 2020; Mukerjee, 2012). O processo de oncogênese pode acontecer de forma lenta, levando vários anos para uma célula tumoral proliferar e dar origem a um tumor detectável (INCA, 2022).

As células tumorais evidenciam uma série de características que as divergem das células não-tumorais como: autonomia nos sinais de crescimento; resistência a sinais inibitórios de crescimento; resistência a morte celular;

possibilitando a imortalidade replicativa e a indução da angiogênese (Yokota, 2000). Além disso, destaca-se o processo de seleção clonal que aumenta a instabilidade cromossômica e cada vez mais, a capacidade proliferativa livre de sinais de indução de morte celular mesmo quando acontece o acúmulo de mutações (Hansford; Huntsman, 2014). Assim, terapias capazes de atuar nessas condições são necessárias e precisam ser desenvolvidas. Além disso, os diagnósticos precisam ser melhorados para os tratamentos serem iniciados mais cedo (Kumar *et al.*, 2020), para o aumento da chance de cura e melhor sobrevida dos pacientes (Moskowitz *et al.*, 2015)

Os avanços no tratamento do câncer nos últimos anos levam a melhores prognósticos, quando a doença é diagnosticada e tratada adequadamente. Dependendo do tipo do câncer e seu estadiamento existem vários métodos de tratamento tais como a quimioterapia, a cirurgia, a radioterapia, a terapia hormonal, a terapia direcionada incluindo imunoterapia, entre outras (Wang; Lei; Han, 2018). Em muitos casos, existe a necessidade de combinar mais de um tipo de modalidade (INCA, 2022).

A quimioterapia destaca-se pois os fármacos são eficientes em eliminar células proliferativas, isto porque agem induzindo danos ao DNA que determinam paradas no ciclo celular e morte celular programada (Goldstein; Kastan, 2015). Porém, o tratamento quimioterápico convencional usa drogas para danificar o DNA (Garnock-Jones *et al.*, 2010; Yoshida; Zhang; Haura, 2010; Collins, 2008) e essas atingem também células não tumorais, mas que estão em proliferação. Essas abordagens de drogas anticancerígenas têm como alvo o DNA/proteína envolvida na etapa de proliferação celular (Porter *et al.*, 2012). No entanto, os agentes indutores de dano ao DNA têm efeitos colaterais, como náuseas, vômitos, diarreia e febre, afetando a qualidade de vida do paciente (Chabner; Roberts, 2005; Vichaya *et al.*, 2015). Portanto, a busca por novos medicamentos com maior eficácia e menos efeitos colaterais é considerada uma prioridade dessa área de pesquisa.

1.2 Grupos farmacofóricos 1,4-dioxo-2-butenil e 4-aminoantipirina

O grupo 1,4-dioxo-2-butenil é bastante estudado como parte constituinte de compostos com potencial aplicação farmacêutica e, em especial, na busca por novos medicamentos anticâncer. Este fragmento apresenta atividade citotóxica e capacidade de redução da proliferação celular. Essas ações biológicas podem ser moduladas pelas diferentes configurações e possibilidades de diferentes substituintes R_1 e R_2 na molécula (Figura 1) (Jha *et al.*, 2010).

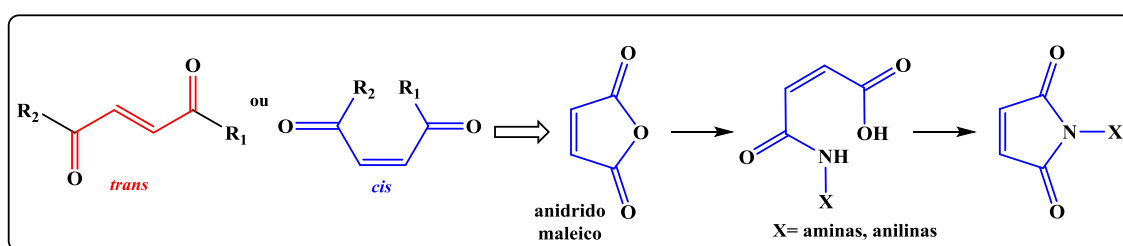


Figura 1. Grupo farmacofórico 1,4-dioxo-2-butenil e derivados

O composto orgânico anidrido maleico (Figura 1) pode ser utilizado como fonte de obtenção do grupo 1,4-dioxo-2-butenil, pois sua cadeia apresenta carbonilas de anidrido, α e β -insaturadas. Essas características permitem transformações químicas por meio de reações de substituição à carbonila (Jha *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2018a; Oliveira *et al.*, 2018b) e também por meio de adições de Michael (Belbekhouche *et al.*, 2016), utilizando essa estrutura como bloco de construção para compostos de interesse.

Reações de substituição à carbonila do anidrido maleico com anilinas aromáticas são relatadas na literatura para formação de ácidos *N*-aril maleamicos e *N*-aril maleimidas, proporcionando a produção de compostos derivados com diferentes substituintes, em diferentes posições no anel aromático dessas anilinas (Jha *et al.*, 2010).

Estudos contendo o grupo 1,4-dioxo-2-butenil complexados com cobre avaliaram a atividade antitumoral em células de adenocarcinoma mamário murinho 4T1, e sua segurança toxicogenética em camundongos *Swiss*. Esse estudo demonstrou potencial terapêutico, pois apresentou citotoxicidade em células de adenocarcinoma mamário murinho 4T1 e baixa frequência de danos cromossômicos em sistema teste *in vivo* (Oliveira *et al.*, 2018a).

Em outro estudo foi testado o ácido IR-04 sintetizado a partir de maleimidas e 1,4-dioxo-2-butenil e comprovaram que esse derivado não é genotóxico e nem mutagênico, o que torna seu uso seguro na prospecção de novos medicamentos contra o câncer. Além disso, o composto apresentou ser mais seletivo, pois causou apoptose sem utilizar a via de danos no DNA (Oliveira *et al.*, 2018b).

As porções 1,4-dioxo-2-butenil e 4-aminoantipirina têm uma variedade de atividades farmacológicas. São candidatos viáveis para a síntese de novos agentes quimioterápicos (Chabner; Roberts, 2005; Vichaya *et al.*, 2015; Bouwman; Jonkers, 2012). Mais especificamente, o grupo 1,4-dioxo-butenil tem apresentado atividades biológicas promissoras no tratamento do câncer (Béthune; Wieland, 2018; Machado *et al.*, 2013).

Outros grupos farmacofóricos de interesse são 4-aminoantipirina e maleimida. Estudos anteriores mostraram que a síntese de compostos que incluem fragmentos de 4-aminoantipirina e maleimida tem propriedades antibacterianas e analgésicas, bem como um perfil de citotoxicidade promissor em modelos pré-clínicos (Oliveira *et al.*, 2018a; Oliveira *et al.*, 2018b; Berno *et al.*, 2016; Cunha *et al.*, 2005; Mahle *et al.*, 2010).

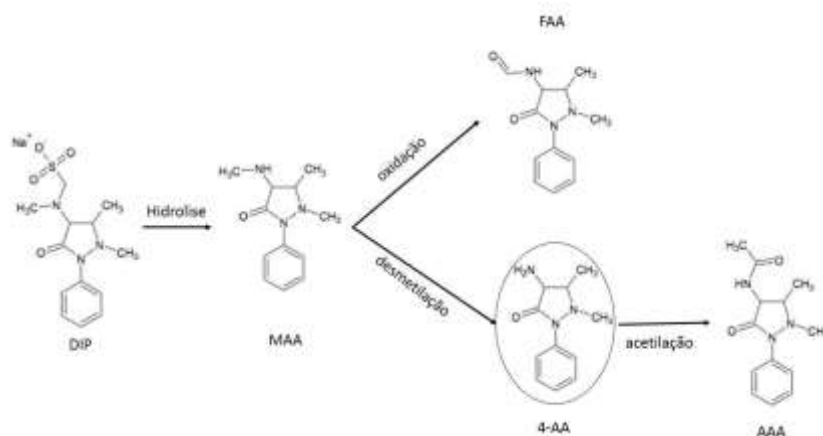


Figura 2. Metabolização da 4-aminoantipirina. Estrutura química da dipirona e conversão em seus metabólitos ativos e inativos (Buitrago-González; Calderón-Ospina; Vallejos-Narváez, 2014).

De acordo com o estudo de Berno *et al.*, (2016) o 4-AA não induz danos no DNA, na fagocitose esplênica ou altera o número de leucócitos. Embora, esse composto aumenta a apoptose tanto nos rins como no fígado. Nesse mesmo

estudo quando o 4-AA foi associado aos quimioterápicos doxorubicina, cisplatina ou ciclofosfamida, o 4-AA interferiu no dano ao DNA, na indução de apoptose e na fagocitose. O que sugere que o 4-AA deve ser evitado durante o tratamento com doxorubicina, cisplatina ou ciclofosfamida devido à sua capacidade de antagonizar os efeitos anticancerígenos destes medicamentos quimioterápicos.

1.3 Lipídios Resorcinólicos

Os lipídios resorcinólicos octacétidos denominados citosporonas possuem atividades biológicas tais como fungicidas, alelopáticas, bactericidas e citotóxicas (Meza *et al.* 2015). Esses compostos são facilmente encontrados no reino vegetal, principalmente nas famílias Anacardiaceae, Poaceae (gramíneas) e Fabaceae (leguminosas). Eles também podem ser isolados de fungos e bactérias. Já em animais, são observados apenas nas esponjas *Haliclona* sp. (Kozubek; Tyman, 1999).

A primeira citosporona isolada, em 1985, foi a partir do fungo fitopatogênico *Phoma* sp., denominada citosporona A (Voblikova *et al.*, 1985). Em 2000, foram isolados mais cinco compostos, nomeados como citosporonas A-E dos fungos endofíticos *Cytospora* sp. e *Diaporthe* sp. Duas dessas citosporonas mostraram-se ativas contra bactérias e fungos (Brady *et al.*, 2000). Outras citosporonas naturais e sintéticas foram sintetizadas, bem como foram identificadas moléculas estruturalmente afins (Meza *et al.*, 2015). Essas novas moléculas denominadas AMS35AA, AMS35BB e AMS049 demonstraram capacidade de aumentar o efeito mutagênico da ciclofosfamida e de aumentar a apoptose em camundongos, o que sugere o seu potencial quimioterápico e neoadjuvante.

Os lipídeos fenólicos, dentre eles os resorcinólicos, tem característica anfipática o que permite atividades biológicas, possibilitando interações com a bicamada lipídica e acarretam processos celulares, como a genotoxicidade e citotoxicidade, por meio de interações com proteínas, enzimas, ácidos nucléicos e outras biomoléculas importantes (Kozubek; Tyman, 1999; Stasiuk; Kozubek, 2010). Além disso, os lipídios resorcinólicos têm capacidade de interligar-se com

a membrana plasmática dos eritrócitos e levar ao espaçamento e ruptura da bicamada lipídica (Heerklotz; Seelig, 2000; Heerklotz; Seelig, 2001), aumentando a permeabilidade de pequenos não-eletrólitos, com o diâmetro molecular de até 1,4 nm, e água (Kozubek, 1985), o que pode causar na hemólise dos eritrócitos (Kozubek; Demel, 1980; Stasiuk; Jaromin; Kozubek, 2004).

Um estudo de pesquisadores chineses evidenciou que a citosporona B age como um ligante fisiológico natural para o receptor nuclear órfão Nur77 em células eucariontes (Zhan *et al.*, 2008). Entre os resultados desse estudo, as respostas biológicas foram comprovadas por teste *in vivo*, em camundongos. Essa ligação agonista com o receptor ativa alguns genes específicos relacionados ao receptor que controla o processo de apoptose (Zhan *et al.*, 2008). Uma vez ativado, nota-se a migração do próprio receptor nuclear em direção ao citoplasma, seguida de interações com as mitocôndrias, resultando na indução de vias moleculares para apoptose. O efeito citotóxico da citosporona B foi testado em modelos *in vitro*. Os resultados indicaram que quando testado em células tumorais como tumor gástrico humano (BCG-823) e de câncer de cólon (SW620) causou inibição da proliferação celular em até 70%. Em células tumorais pulmonares (H1299) e de tumor hepatócito (HepG2) a inibição da proliferação foi cerca de 40%. Já em células de fibroblastos de camundongos (NIH/3T3), hepatócitos (HL-7702) e hepatoblastos humanos (ME-Hep4) o efeito foi muito menor. Esses resultados sugerem que atividade da citosporona B, na ligação com Nur77, o que demonstra um potencial seletivo em diferentes células. O potencial citotóxico em células tumorais abre novas possibilidades de pesquisa já que esse composto tem potencial de causar apoptose em células tumorais, sem causar efeito ou com menos efeito em células de linhagens não tumorais (Zhan *et al.*, 2008).

Em outros estudos com lipídios resorcinólicos sintéticos foram feitas análises genotóxicas, e apoptóticas, e demonstrou-se importante atividade apoptótica, possivelmente não mediada somente por danos no DNA. Mas, possivelmente, influenciada com a capacidade de modulação do Nur77. Observou-se ainda que esses compostos podem potencializar os efeitos da ciclofosfamida. Por conseguinte, os autores sugeriram que estes compostos são

capazes de atuar como adjuvantes de quimioterapia eficazes (Navarro *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2015).

Esses resultados sugerem novos estudos com lipídeos resorcinólicos são promissores candidatos ao desenvolvimento de drogas quimioterápicas e/ou coadjuvantes quimioterápicos. Sugere-se ainda testes com outros quimioterápicos que não somente a ciclofosfamida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de um lipídio resorcinólico e de uma norcantarimida sobre o DNA e suas interferências na ação de quimioterápicos comerciais.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos genotóxicos do ZIM e 4-AA na integridade do DNA, indução de morte celular, ativação da fagocitose esplênica e contagem diferencial de células sanguíneas em camundongos *Swiss*.

Avaliar os efeitos do ZIM e 4-AA em associação com quimioterápicos comerciais cisplatina, doxorrubicina e ciclofosfamida.

Avaliar os efeitos genotóxicos da Phthalide na integridade do DNA, indução de morte celular, ativação da fagocitose esplênica em camundongos *Swiss*.

Avaliar os efeitos da Phthalide em associação com quimioterápicos comerciais cisplatina e ciclofosfamida.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Síntese do ZIM

Síntese ZIM.

Salvo indicação em contrário, as reações foram realizadas em vidrarias secas à chama sob uma pressão positiva de nitrogênio usando solventes anidros. CH_2Cl_2 foi purificado através de um Sistema de Purificação de Solvente PPT/Glass Contour sob argônio. Hexano e Et_2O foram recentemente destilados a partir de CaH_2 antes do uso. Outros reagentes e solventes de grau comercial foram usados sem purificação adicional, salvo indicação em contrário. A cromatografia em camada fina (TLC) foi realizada usando placas pré-revestidas Merck sílica gel 60 F254 (0,25 mm) e a visualização foi feita por coloração UV ou I_2 , KMnO_4 , CAM ou PMA. A cromatografia flash foi realizada usando Silicycle SilicaFlash F60 (tamanho de partícula de 40–63 μm). Os espectros de RMN foram registrados em um espectrômetro Bruker Avance de 300 MHz na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Os desvios químicos de ^1H e ^{13}C NMR são relatados como δ usando solvente residual como padrão interno e expressos como simples (s), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q) e multiplete (m). Análises espectrais de massa de alta resolução foram realizadas usando um espectrômetro Bruker microTOFII ESI. Os pontos de fusão (mp) não foram corrigidos e foram registrados em um aparelho de ponto de fusão Fisher-Johns.

2.1.1.

Síntese de **2** - (1,5-Dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-dihidro-1H-pirazol-4-il)-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-metanoisoindole-1,3(2H)-diona (**ZIM**). A uma solução rapidamente agitada de anidrido maleico **1a** (3,00 g, 30,57 mmol) em acetona (15,00 mL) à temperatura ambiente foi adicionada lentamente uma solução de 4-aminoantipirina **4-AA** (6,21 g, 30,57 mmol) em acetona (15 mL). A mistura de reação resultante foi agitada vigorosamente à temperatura ambiente até a conclusão da reação conforme avaliado por TLC. A mistura de reação foi filtrada sob vácuo e o sólido foi lavado com hexano (3×10 mL). O sólido foi seco em vácuo e recristalizado a partir de etanol/ H_2O (1:1) para gerar o ácido maleâmico **1** (8,75 g, 95% de rendimento) como um sólido amarelo pálido. A uma

solução rapidamente agitada de acetato de sódio (0,33 g, 3,96 mmol) e anidrido acético (3,36 mL, 35,73 mmol) adicionou-se lentamente o ácido maleâmico **1** (3,00 g, 9,93 mmol) à temperatura ambiente. O a mistura de reação resultante foi agitada vigorosamente a 80°C até a conclusão da reação conforme avaliado por TLC. O composto orgânico foi extraído com CHCl₃ (15 mL), tratado com solução saturada de NaHCO₃ (15 mL), lavado com salmoura (20 mL), seco sobre Na₂SO₄, filtrado e concentrado in vacuo. O sólido resultante foi purificado por recristalização de hexano para fornecer a maleimida **3** desejada (2,54 g, 95% de rendimento) como um sólido amarelo. Finalmente, a uma solução rapidamente agitada de maleimida **3** (1,00 g, 3,59 mmol) em CH₂Cl₂ (10 mL) foi adicionado lentamente o ciclopentadieno (6,11 mL, 7,27 mmol) à temperatura ambiente. A mistura de reação resultante foi agitada vigorosamente à temperatura ambiente até a conclusão da reação conforme avaliado por TLC. A mistura reaccional foi arrefecida até à temperatura ambiente. O sólido foi filtrado, seco sob vácuo e purificado por recristalização de hexano para fornecer o composto policíclico desejado **ZIM**. (1,00 g, 80% de rendimento) como um sólido branco.

2.1.1.1. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm). 1,60 (d, 1H, J_{cis} = 9,0); 1,76 (d, 1H, J_{cis} = 9,0); 2,02 (s, 3H); 3,12 (s, 3H); 3,43 (m, 2H); 3,46 (m, 2H); 6,26 (s, 2H); 7,30 (m, 5H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 11,1; 35,3; 45,1; 46,4; 52,5; 102,3; 125,0; 127,5; 129,3; 134,1; 135,1; 151,7; 160,3; 176,3. HRMS (ESI): [M + Na]⁺, C₂₀H₁₉N₃O₃, calcd. 349.1426; encontrado: 349.1429. Mp = 247°C.

3.2 Síntese da Phthalide

Síntese de 3,5-dimetoxibenzoato de metila. Ácido sulfúrico concentrado (2,5 mL) foi lentamente adicionado a uma solução de 3,5-dimetoxibenzóico ácido (5 g, 27,46 mmol) em metanol. A reação a mistura foi então aquecida ao refluxo. Depois das 6h, a mistura de reação foi resfriada até a temperatura ambiente temperatura. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi solubilizado em acetato de etila (50 mL), e a fase orgânica neutralizado com solução de bicarbonato de sódio a 8% (2 × 20 mL) e lavado com água destilada (2 × 20 mL) e salmoura (2 × 5 mL). A fase orgânica foi seco sobre MgSO₄, filtrado e o solvente evaporado por pressão reduzida, resultando em éster **12** e usado

sem purificação adicional passos. RMN de ^1H (300 MHz, acetona- d_6) δ : 3,67 (6H,s), 3,71 (^3H , s), 6,54 (t, ^1H , J 2,1), 6,95 (d, ^1H , J 2,1 Hz).

RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona- d_6) δ : 52,5, 55,9, 105,8, 107,8, 133,1, 161,9, 167,0.

3.3 Agentes Químicos

Os quimioterápicos foram obtidos comercialmente e administrados em dose única segundo Berno *et al.* (2016). A Doxorrubicina foi diluída em água destilada e administrada na dose de 16 mg/Kg peso corpóreo (p.c.) pela via intraperitoneal (i.p.). A Cisplatina foi administrada na dose de 6mg/Kg (p.c., i.p.). Já a Ciclofosfamida foi diluída em água destilada e administrada na dose de 100mg/Kg (p.c., i.p.).

3.4 Protótipos quimioterápicos

3.4.1 4-AA

4-AA foi obtido de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (CAS-83-07-8). **4-AA** e **ZIM** foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e depois diluídos em solução salina com 5% de glicose (a concentração final de DMSO foi de 5%). As concentrações de **4-AA** e **ZIM** (para comparação de eficácia) foram 12, 24 , e 48 mg/kg para cada experiência. O veículo de diluição (solução salina com glicose a 5% contendo DMSO na concentração final de 5%) foi utilizado como controle negativo. Todas as administrações foram realizadas simultaneamente pela via intraperitoneal (i.p.), mantendo-se a proporção do veículo de diluição de 0,1 mL/10 g de peso corporal (p.p.).

3.4.2 Phthalide

A Phthalide **1** foi prontamente preparada tratando o ácido 3,5-dimetoxibenzóico com cloreto de octanoíla na presença de AlCl_3 . Este composto foi caracterizado por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C , e os dados coincidem com os relatados na literatura (Vitor *et al.*, 2021).

A Phthalide **1** foi primeiro dissolvida em DMSO (1%) e posteriormente diluída em água Mili-Q (concentração final de 1% de DMSO) e administrada em doses de 5, 10 e 20 mg/kg (p.b.; i.p.) (Araújo *et al.*, 2017).

3.5 Delineamento experimental

3.5.1 ZIM e 4-AA

Cento e quarenta camundongos (*Swiss*) machos, adultos (8-10 semanas de idade) e com peso médio de 35g, provenientes da Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal (IAGRO), foram mantidos em caixas de polipropileno recobertas por sepilho, em *rack* ventilado ALESCO®, sob condições controladas de climatização e luminosidade (12 horas de claro e 12 horas de escuro; temperatura em torno de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$; umidade relativa de $55\pm 10\%$), e alimentados com ração comercial (Nuvital, Nuvilab®) e água filtrada *ad libitum*. O experimento foi conduzido segundo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, observando as diretrizes da Declaração Universal dos Direitos dos Animais e com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMS (Protocolo nº 399/2012).

Os animais foram distribuídos em 28 grupos experimentais (5 animais/grupo) (Figura 3).

Grupo controle: Os animais receberam veículo 1 (DMSO 1%) e (solução fisiológica – NaCl 0,9%) na dose de 0,1 mL/10 g b.w; i.p) simultaneamente.

Grupo CYP: Os animais receberam veículo 1 (0,1 mL/10 g b.w.) e ciclofosfamida (100 mg/kg b.w., i.p.) simultaneamente.

Grupo CIS: Os animais receberam veículo 1 (0,1 mL/10 g p.c.) e cisplatina (6 mg/kg p.c., i.p.) simultaneamente.

Grupo DOX: Os animais receberam veículo 1 (0,1 mL/10 g p.c.) e doxorrubicina (16 mg/kg p.c., i.p.) simultaneamente.

Grupo 4-AA: Os animais receberam 4-AA, em três diferentes doses (12 mg/kg; 24 mg/kg e 48 mg/kg p.w., i.p.) e o veículo (0,1mL/10 g b.w., i.p.) simultaneamente.

Grupo ZIM: Os animais receberam ZIM, em três diferentes doses (12 mg/kg; 24 mg/kg e 48 mg/kg p.w., i.p.) e o veículo (0,1mL/10 g b.w., i.p.) simultaneamente.

Grupo CYP + 4-AA (4-AA + ciclofosfamida): Os animais receberam 1 (em três doses diferentes - 12 mg/kg; 24 mg/kg e 48 mg/kg p.w., i.p.) e ciclofosfamida (100 mg/kg b.w., i.p.) simultaneamente.

Grupo CIS + 4-AA (4-AA + cisplatina): Os animais receberam 1 (em três doses diferentes 12 mg/kg; 24 mg/kg e 48 mg/kg b.w., i.p.) e cisplatina (6 mg/kg b.w., i.p.) simultaneamente.

Grupo DOX + 4-AA (4-AA + doxorubicina): Os animais receberam 1 (em três doses diferentes 12 mg/kg; 24 mg/kg e 48 mg/kg b.w., i.p.) e doxorubicina (16 mg/kg b.w., i.p.) simultaneamente.

Grupo CYP + ZIM (ZIM + ciclofosfamida): Os animais receberam 1 (em três doses diferentes - 12 mg/kg; 24 mg/kg e 48 mg/kg p.w., i.p.) e ciclofosfamida (100 mg/kg b.w., i.p.) simultaneamente.

Grupo CIS + ZIM (ZIM + cisplatina): Os animais receberam 1 (em três doses diferentes 12 mg/kg; 24 mg/kg e 48 mg/kg b.w., i.p.) e cisplatina (6 mg/kg b.w., i.p.) simultaneamente.

Grupo DOX + ZIM (ZIM + doxorubicina): Os animais receberam 1 (em três doses diferentes 12 mg/kg; 24 mg/kg e 48 mg/kg b.w., i.p.) e doxorubicina (16 mg/kg b.w., i.p.) simultaneamente.

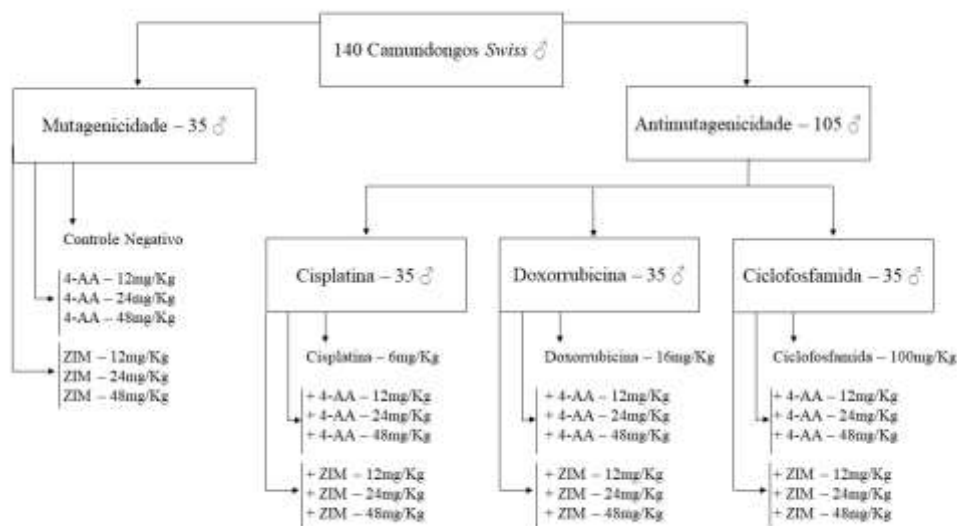


Figura 3. Delineamento experimental apresentando a distribuição dos animais de acordo com os diferentes tratamentos.

3.5.2 Phthalide

Neste experimento, 120 camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos sexualmente maduros (aproximadamente 8–10 semanas) do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) foram divididos em 12 grupos experimentais cada ($n = 10$ animais).

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno cobertas com cama e alimentados com ração comercial (Nuvital®, Campo Grande, Brasil) e água filtrada *ad libitum*. A temperatura e a luminosidade foram controladas por fotoperíodo de doze horas (12 h de luz: 12 h de escuridão), com temperatura de 22 ± 2 °C e umidade de $55\% \pm 10$ em estante ventilada (ALESCO®, Campo Grande, Brasil).

O experimento foi conduzido seguindo as diretrizes da Declaração Universal dos Direitos dos Animais com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UFMS) sob protocolo nº 399/2012.

Os 12 grupos experimentais foram divididos conforme listado abaixo:

Grupo controle: Os animais receberam veículo 1 (DMSO 1%) e ciclofosfamida (solução fisiológica – NaCl 0,9%) na dose de 0,1 mL/10 g b.w; i.p) simultaneamente.

Grupo CYP: Os animais receberam veículo 1 (0,1 mL/10 g b.w.) e ciclofosfamida (100 mg/kg b.w., i.p.) simultaneamente.

Grupo CIS: Os animais receberam veículo 1 (0,1 mL/10 g p.c.) e cisplatina (6 mg/kg p.c., i.p.) simultaneamente.

Grupo Phthalide 1: Os animais receberam 1, em três diferentes doses (5mg/kg; 10mg/kg e 20mg/kg p.w., i.p.) e o veículo ciclofosfamida (0,1mL/10 g b.w., i.p.) simultaneamente.

Grupo CYP + Phthalide (Phthalide 1 + ciclofosfamida): Os animais receberam 1 (em três doses diferentes—5 mg/kg; 10 mg/kg e 20 mg/kg p.w., i.p.) e ciclofosfamida (100 mg/kg b.w., i.p.) simultaneamente.

Grupo CIS + Phthalide (Phthalide 1 + cisplatina): Os animais receberam 1 (em três doses diferentes—5 mg/kg; 10 mg/kg e 20 mg/kg b.w., i.p.) e cisplatina (6 mg/kg b.w., i.p.) simultaneamente.

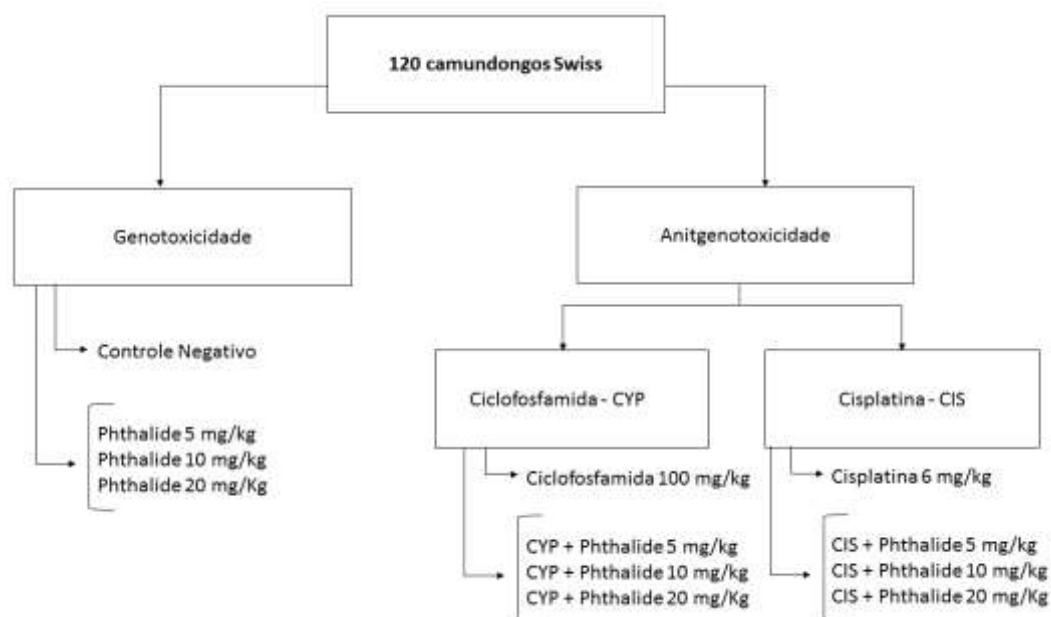


Figura 4. Delineamento experimental apresentando a distribuição dos animais de acordo com os diferentes tratamentos

3.6 Ensaios Biológicos

3.6.1 Ensaio do Cometa

Uma amostra de sangue periférico, coletado 24 horas após os tratamentos, foi usada para a realização do ensaio do cometa segundo Singh *et al.* (1988) com modificações de Carvalho *et al.* (2015). Foram analisadas visualmente (Kobayashi *et al.*, 1995) 100 células/animal, em microscópio de fluorescência (BIOVAL®, Modelo L2000A) em objetiva de 40x com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm.

3.6.2 Ensaio de micronúcleo

Amostras de sangue periférico foram coletadas 24, 48 e 72 horas após os tratamentos para a realização do ensaio de micronúcleo de acordo com o protocolo previamente descrito por Hayashi *et al.*, (1990) com modificações de Carvalho *et al.* (2015). Cerca de 20µL de sangue periférico foi coletado e depositado em uma lâmina previamente coberta com 20µL de Alaranjado de Acridina (1mg/mL). As lâminas foram mantidas em freezer (-20°C), posteriormente, foram analisadas 2.000 células/animal em microscópio de fluorescência (BIOVAL®, Modelo L 2000A), em objetiva de 40x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm, para contabilizar a presença de micronúcleos.

3.6.3. Morte Celular

Fragmentos do fígado e rim foram coletados, macerados em solução fisiológica e 100 µL dessa suspensão foram usados para a confecção de uma extensão em lâmina de vidro. Após secas, as lâminas foram fixadas em Carnoy durante 5 minutos, posteriormente, mergulhadas em diferentes concentrações de etanol (95%, 75%, 50% e 25%), lavadas em tampão McIlvane durante 5 minutos, coradas com Alaranjado de Acridina (1mg/ml) (5 minutos) e novamente lavadas com tampão de McIlvane. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência (BIOVAL® Modelo L 200A) com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm em objetiva de 40x. As células foram classificadas por meio de padrões de fragmentação de DNA e contabilizaram-se 200 células/animais (Navarro *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2015).

3.6.4. Ensaio de fagocitose

Cerca de 1/3 do baço foi macerado em solução fisiológica. Em seguida, 100µL da suspensão celular foram depositados em uma lâmina previamente corada com 20µL de Alaranjado de Acridina (1mg/ml) e recoberta com lamínula (Hayashi *et al.*, 1990). A análise foi feita em microscópio de fluorescência em objetiva de 40x com filtro de 420-490nm e filtro de barreira de 520nm. Para este ensaio foram analisadas 200 células/animal, segundo Carvalho *et al.* (2015), de acordo com a presença e ausência de evidência de fagocitose.

3.6.5 Cálculo da porcentagem de redução ou incremento de danos

A porcentagem de redução dos danos é utilizada para avaliar a capacidade quimiopreventiva de uma substância quando essa é associada a uma substância sabiamente indutora de danos. Para tanto foi utilizada a fórmula proposta por Manoharan e Banerjee (1985) e Waters *et al.* (1990):

$$RD \text{ ou } ID (\%) = \left(\frac{\text{Média controle positivo} - \text{média grupo associado}}{\text{Média controle positivo} - \text{média controle negativo}} \right) \times 100$$

A porcentagem de incremento de danos trata-se da porcentagem de redução de danos com sinal negativo. No entanto, ao invés de apresentar o sinal negativo entende-se como incremento de danos.

A porcentagem de redução de danos foi adaptada também para os ensaios de fagocitose e morte celular. As porcentagens de redução de danos negativas são interpretadas como incremento de danos como descrito por Navarro *et al.* (2014). Nesse estudo optou-se por apresentar as porcentagens de redução de danos somente para parâmetros com diferenças estatisticamente significativas.

3.6.6 Contagem Diferencial de Células do Sangue

Cerca de 20µL de sangue periférico, coletados 72 horas após os tratamentos foi utilizado para a confecção de uma extensão sanguínea. Analisou-se 100 células/animal, as quais foram diferenciadas em linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos (Ishii *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2014).

3.7. Docking de DNA

3.7.1. Detalhes Computacionais

O protocolo virtual, incluindo docking molecular, foi realizado no computador DELL Workstation, com processador Intel Xeon E5-1660, 3,3 GHz, 4 CPUs, placa de vídeo NVIDIA GeForce RTX 2060, RAM 8 GB, sob o sistema operacional Windows.

3.7.2. Preparação de Proteína

A estrutura cristalina baseada em difração de raios X de um B-DNA Dodecamer foi recuperada do Protein Data Bank³⁰ (PDB ID: 1BNA) com 1,9 Å de resolução para a estrutura cristalina do DNA sintético dodecamer d (CpGpCpGpApApTpTpCpGpCpG). As moléculas de água foram removidas operando o BIOVIA Discovery Studio v4.5 (Accelrys) (Figura 4).

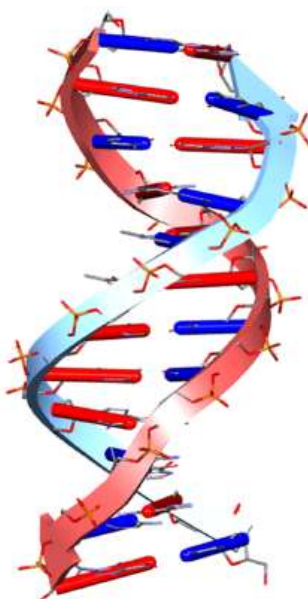


Figura 5. Visualização da Estrutura do B-DNA Dodecamer (1BNA) depois de remover as moléculas de água usando o Discovery Studio BIOVIA. Cores diferentes representam as cadeias de DNA: azul (cadeia A), laranja (bases da cadeia A), vermelho (cadeia B) e ciano (bases da cadeia B).

3.7.3. Docagem Molecular

4-AA, 1, 2 e ZIM foram construídos no ChemDraw. Todas as geometrias foram virtualmente construídas e otimizadas em mecânica molecular (MM+) e métodos semiempíricos Austin Model 1 (AM1) usando o programa HyperChem

7. Os arquivos de saída foram convertidos em arquivos de entrada (.mol2) do programa Discovery Studio BIOVIA usando Open Babel (OPEN BABEL SOFTWARE, 2021), e depois convertidos em arquivos (.pdb) como arquivos de entrada em HDock (YAN *et al.*, 2017). O programa de servidor web HDock foi usado para prever *in silico* a melhor orientação e conformação dos compostos para o BDNA.

3.7.4. Seleção de Alvos e Simulações de Docking Molecular

A estrutura cristalizada de Dodecâmero de β -DNA sintético foi obtida do Protein Data Bank30 (PDB ID: 1BNA). Em seguida, simulações de docking foram realizadas para cada candidato a inibidor no alvo correspondente. Este procedimento foi realizado usando o servidor web HDock33 e a pontuação de docking resultante foi avaliada. Antes do encaixe usando HDock, o B-DNA e os compostos foram carregados como arquivos (.pdb) no servidor web. Os complexos gerados pelo HDock foram selecionados usando o melhor modelo entre os resultados, que apresentou o melhor escore de docking. As estruturas complexas do sítio da proteína (.pdb) e dos ligantes (.pdb) foram inseridas no programa visualizador BIOVIA Discovery Studio para detalhar as interações entre os ligantes e as bases de DNA participantes.

3.8 Análise estatística

Os valores apresentados foram expressos em média $\pm$ erro padrão ou porcentagem. Os dados paramétricos foram analisados por Student *t*-test, segundo a natureza e distribuição (*GraphPad Prism (Version 3.02; Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA)*). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4 Resultados

Os resultados serão apresentados na forma de artigo. As versões apresentadas estão em língua portuguesa. No entanto, os artigos já foram publicados em língua inglesa.

4.1 Artigo 1



pubs.acs.org/crt

Article

ZIM, a Norbornene Derived from 4-Aminoantipyrine, Induces DNA Damage and Cell Death but in Association Reduces the Effect of Commercial Chemotherapeutics

Rodrigo Juliano Oliveira,^{*,†} Ingridhy Ostaciana Maia Freitas da Silveira,[‡] Silvia C. das Neves, Barbara Mitsuyasu, Allana C. Martins, Claudia Berno, Jiyan Mohammad, Halie Raj, Flavio H. S. de Araujo, Cristiane Regina Hortelan, Luana Machado, Eufrânio N. da Silva Júnior, Marcelo L. B. Vilela, Valter Aragão Nascimento, Adilson Beatriz, and Roberto da Silva Gomes^{*}

ZIM, um norborneno derivado de 4-Aminoantipirina, induz danos ao DNA e morte celular, mas em associação reduz o efeito de quimioterápicos comerciais

Rodrigo Juliano Oliveira, Ingridhy Ostaciana Maia Freitas da Silveira, Silvia Cordeiro das Neves, Barbara Mitsuyasu, Allana C. Martins, Claudia Berno, Jiyen Mohammad, Halie Raj, Flavio H. S. de Araujo, Cristiane Regina Hortelan, Luana Machado, Eufrânio N. da Silva Júnior, Marcelo L. B. Vilela, Valter Aragão Nascimento, Adilson Beatriz, and Roberto da Silva Gomes.

Resumo: A incidência de câncer está aumentando e os medicamentos não são muito seletivos. Essas drogas causam efeitos adversos e as células tornam-se resistentes. Portanto, novas drogas são necessárias. Aqui, avaliamos os efeitos do ZIM, candidato à quimioterapia, e do 4-AA isoladamente e em associação com quimioterápicos comerciais. Posteriormente, os resultados do ZIM e 4-AA foram comparados. Camundongos Swiss machos foram tratados com doses de 12, 24 ou 48 mg/kg de ZIM ou 4-AA isoladamente ou em associação com cisplatina (6 mg/kg), doxorrubicina (16 mg/kg) e ciclofosfamida (100 mg/kg). Parâmetros biométricos, dano ao DNA (cometa e micronúcleos), morte celular e fagocitose esplênica foram avaliados. O DNA docking também foi realizado para confirmar as possíveis interações de ZIM e 4-AA com o DNA. O 4-AA demonstrou ter baixo potencial genotóxico, aumentou a frequência de morte celular e ativou a fagocitose. O ZIM causa danos genômicos e cromossômicos, além de causar morte celular e ativar a fagocitose. Em associação com agentes quimioterápicos, tanto o 4-AA quanto o ZIM têm efeito quimiopreventivo e, portanto, reduzem a frequência de danos ao DNA, morte celular e fagocitose esplênica. A associação de 4-AA e ZIM com quimioterápicos comerciais aumentou a frequência de linfócitos em comparação com apenas agentes quimioterápicos. O docking molecular demonstrou que o ZIM tem mais afinidade com o DNA do que o 4-AA e seus precursores (1 e 2). Isso foi confirmado pela menor energia de interação do complexo (-119,83 kcal/mol). O ZIM pode quebrar a molécula de DNA e, portanto, seu efeito quimioterápico pode estar relacionado a danos no DNA. Considera-se que ZIM tem potencial quimioterapêutico. No entanto, não deve ser usado em combinação com cisplatina, doxorrubicina e ciclofosfamida, pois reduz os efeitos dessas drogas.

1. INTRODUÇÃO

A alta taxa de mortalidade do câncer está relacionada às limitações que a doença e seus tratamentos impõem devido à alta heterogeneidade molecular e ao desenvolvimento de mecanismos de resistência das células cancerígenas durante o tratamento com antineoplásicos¹. O acúmulo de mutações no DNA pode gerar características diferenciadas das células normais, resultando em proliferação descontrolada². O tratamento quimioterápico convencional usa drogas para danificar o DNA³⁻⁵. Essas abordagens de drogas anticancerígenas têm como alvo o DNA/proteína envolvida na etapa de proliferação celular⁶. No entanto, os agentes indutores de dano ao DNA têm efeitos colaterais, como náuseas, vômitos, diarreia e febre, afetando a qualidade de vida do paciente^{7,8}. Portanto, a busca por novos medicamentos com maior eficácia e menos efeitos colaterais é considerada uma prioridade de pesquisa. As porções 1,4-dioxobutenil e 4-aminoantipirina têm uma variedade de atividades farmacológicas. São candidatos viáveis para a síntese de novos agentes quimioterápicos^{7,9}. Mais especificamente, o grupo 1,4-dioxo-butenil tem apresentado atividades biológicas promissoras no tratamento do câncer^{10,11}. De fato, estudos anteriores mostraram que o a síntese de compostos que incluem fragmentos de 4-aminoantipirina e maleimida tem propriedades antibacterianas e analgésicas, bem como um perfil de citotoxicidade promissor em modelos pré-clínicos¹²⁻¹⁶. Além disso, estudos anteriores mostraram o uso de cantaridina, um terpenoide secretado por muitas espécies de besouros da bolha¹⁷, e seus derivados para tratar leucemia, melanoma, fígado, pulmão e câncer de mama (Figura 1)^{18,19}.

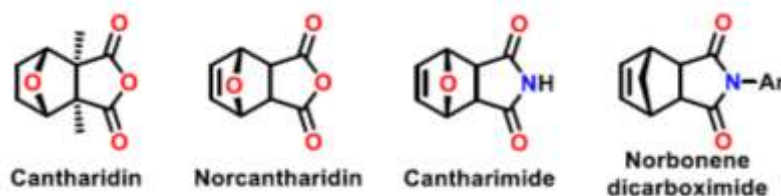


Figura 1. Cantaridina e derivados.

Com base em nosso trabalho anterior^{13,20,21}, primeiro sintetizamos o ZIM, uma dicarboximida de norborneno baseada no andaime 1,4-dioxo-butenil/4-

aminoantipirina. Em seguida, avaliamos o ZIM sintetizado em um modelo de camundongo quanto ao seu potencial genotóxico e apoptótico sozinho e em combinação com três agentes quimioterápicos atualmente usados em ambientes clínicos (cisplatina-CIS, doxorrubicina-DOX e ciclofosfamida-CYP). Também estudamos e comparamos virtualmente a capacidade de 4-AA, 2, 3 e ZIM (Figura 2) de induzir danos ao DNA. Em seguida, avaliamos o ZIM sintetizado em um modelo de camundongo *swiss*. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de ZIM e 4-AA na integridade do DNA, indução de morte celular, ativação da fagocitose esplênica e contagem diferencial de células sanguíneas. Também foram avaliados os efeitos desses compostos em associação com quimioterápicos comerciais (cisplatina-CIS, doxorrubicina-DOX e ciclofosfamida-CYP). Finalmente, a possível interação de 4-AA, ZIM e seus precursores (1 e 2) com o DNA foi avaliada por docking molecular para descrever o possível mecanismo de ação.

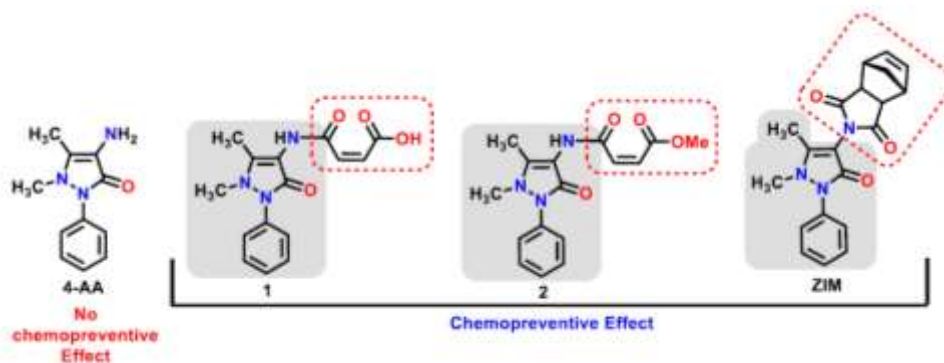


Figura 2. Comparação do efeito quimiopreventivo de compostos contendo porções **4-AA** e 1,4-dioxo-butenil. Cinza: porção 4 aminoantipirina; vermelho: frações 1,4-dioxobutenil. O composto **1** refere-se à ref 13 e o composto **2** refere-se à ref 20.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Síntese do ZIM

Salvo indicação em contrário, as reações foram realizadas em vidrarias secas à chama sob uma pressão positiva de nitrogênio usando solventes anidros. CH_2Cl_2 foi purificado através de um Sistema de Purificação de Solvente PPT/Glass Contour sob argônio. Hexano e Et_2O foram recentemente destilados a partir de CaH_2 antes do uso. Outros reagentes e solventes de grau comercial foram usados sem purificação adicional, salvo indicação em contrário. A

cromatografia em camada fina (TLC) foi realizada usando placas pré-revestidas Merck sílica gel 60 F254 (0,25 mm) e a visualização foi feita por coloração UV ou I₂, KMnO₄, CAM ou PMA. A cromatografia flash foi realizada usando Silicycle SilicaFlash F60 (tamanho de partícula de 40–63 µm). Os espectros de RMN foram registrados em um espectrômetro Bruker Avance de 300 MHz na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Os desvios químicos de ¹H e ¹³C NMR são relatados como δ usando solvente residual como padrão interno e expressos como simples (s), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q) e multiplete (m). Análises espectrais de massa de alta resolução foram realizadas usando um espectrômetro Bruker micro TOFII ESI. Os pontos de fusão (mp) não foram corrigidos e foram registrados em um aparelho de ponto de fusão Fisher-Johns.

2.1.1. Síntese de 2-(1,5-Dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-dihidro-1H-pirazol-4-il)-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7- metanoisindole-1,3(2H)-diona (ZIM).

A uma solução rapidamente agitada de anidrido maleico 1a (3,00 g, 30,57 mmol) em acetona (15,00 mL) à temperatura ambiente foi adicionada lentamente uma solução de 4-aminoantipirina 4-AA (6,21 g, 30,57 mmol) em acetona (15 mL). A mistura de reação resultante foi agitada vigorosamente à temperatura ambiente até a conclusão da reação conforme avaliado por TLC. A mistura de reação foi filtrada sob vácuo e o sólido foi lavado com hexano (3 × 10 mL). O sólido foi seco em vácuo e recristalizado a partir de etanol/H₂O (1:1) para gerar o ácido maleâmico **1** (8,75 g, 95% de rendimento) como um sólido amarelo pálido. A uma solução rapidamente agitada de acetato de sódio (0,33 g, 3,96 mmol) e anidrido acético (3,36 mL, 35,73 mmol) adicionou-se lentamente o ácido maleâmico **1** (3,00 g, 9,93 mmol) à temperatura ambiente. O a mistura de reação resultante foi agitada vigorosamente a 80°C até a conclusão da reação conforme avaliado por TLC. O composto orgânico foi extraído com CHCl₃ (15 mL), tratado com solução saturada de NaHCO₃ (15 mL), lavado com salmoura (20 mL), seco sobre Na₂SO₄, filtrado e concentrado in vacuo. O sólido resultante foi purificado por recristalização de hexano para fornecer a maleimida **3** desejada (2,54 g, 95% de rendimento) como um sólido amarelo.

Finalmente, a uma solução rapidamente agitada de maleimida **3** (1,00 g, 3,59 mmol) em CH₂Cl₂ (10 mL) foi adicionado lentamente o ciclopentadieno (6,11

mL, 7,27 mmol) à temperatura ambiente. A mistura de reação resultante foi agitada vigorosamente à temperatura ambiente até a conclusão da reação conforme avaliado por TLC. A mistura reaccional foi arrefecida até à temperatura ambiente. O sólido foi filtrado, seco sob vácuo e purificado por recristalização de hexano para fornecer o composto policíclico desejado ZIM. (1,00 g, 80% de rendimento) como um sólido branco.

2.1.1.1. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm). 1,60 (d, 1H, $J_{\text{cis}} = 9,0$); 1,76 (d, 1H, $J_{\text{cis}} = 9,0$); 2,02 (s, 3H); 3,12 (s, 3H); 3,43 (m, 2H); 3,46 (m, 2H); 6,26 (s, 2H); 7,30 (m, 5H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 11,1; 35,3; 45,1; 46,4; 52,5; 102,3; 125,0; 127,5; 129,3; 134,1; 135,1; 151,7; 160,3; 176,3. HRMS (ESI): $[\text{M} + \text{Na}]^+$, $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$, calcd. 349.1426; encontrado: 349.1429. Pf = 247°C.

2.2. Medicamentos quimioterápicos

2.2.1. Quimioterápicos

Os quimioterápicos foram obtidos comercialmente e administrados em dose única, segundo Berno *et al.* A doxorubicina (DOX) (Glenmark Farmacêutica Ltda, N° REG MS 1.1013.0232.002-4, Brasil) foi diluída em água destilada e administrada na dose de 16 mg/kg de peso corporal (p.c.) por via intraperitoneal (i.p.). A cisplatina (CIS) (ACCORD Farmacêutica, N° REG MS 1.5537.0002.003-7, Brasil) foi administrada na dose de 6 mg/kg (p.c., i.p.). Este composto foi obtido na forma líquida e não exigiu diluição. A ciclofosfamida (CYP) (Genuxal, Baxter Hospitalar Ltda, N° REG MS 1.00683.0168.003-1, Brasil) foi diluída em água destilada e administrada na dose de 100 mg/kg (p.c., i.p.).

2.2.2. Protótipos quimioterápicos

O 4-AA foi obtido da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (CAS-83-07-8). 4-AA e ZIM foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e depois diluídos em solução salina com glicose a 5% (a concentração final de DMSO foi de 5%).¹⁴ As concentrações de 4-AA e ZIM (para comparação de eficácia) foram 12, 24 e 48 mg/kg para cada experimento. O veículo de diluição (solução salina com glicose a 5% contendo DMSO na concentração final de 5%) foi utilizado como controle negativo. Todas as administrações foram realizadas simultaneamente pela via intraperitoneal (i.p.), e a proporção do veículo de diluição de 0,1 mL/10 g de peso corporal (p.c.) foi mantida.

2.3. Design experimental

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil (protocolo nº 966/2018) e conduzido de acordo com as diretrizes da Declaração Universal sobre Bem-Estar Animal.

Cento e quarenta camundongos Swiss machos adultos (8 a 10 semanas de idade; peso médio de 35 g) foram obtidos da Agência Estadual de Vigilância Sanitária (conhecida no Brasil pela sigla IAGRO) e mantidos em caixas de polipropileno com cama de maravalha. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada (22 ± 2 °C), umidade relativa de $55 \pm 10\%$ e ciclos claro-

escuro de 12:12h. Os animais foram alimentados com ração comercial (Nuvital, Nuvilab, Brasil) e água filtrada *ad libitum*.

Os camundongos foram aclimatados durante 7 dias antes de serem divididos aleatoriamente em 28 grupos experimentais ($n = 5$). Cada grupo foi designado para um tratamento quimioterápico diferente (CHEMO); protótipos quimioterápicos (CHEM-P); associação de quimioterápicos e protótipos quimioterápicos (ASSOC) ou veículo de diluição (CONTROL) (Figura S1A).

Os tratamentos foram administrados em dose única por meio de injeção intraperitoneal (i.p.). Os grupos ¹⁴CHEMO receberam DOX, CIS ou CYP a 16, 6 ou 100 mg/kg de peso corporal (p.c.), respectivamente. CHEM-P recebeu 4-AA ou ZIM em três dosagens diferentes: 12, 24 ou 48 mg/kg (p.c.). O veículo de diluição de CHEM-P foi administrado a 0,1 mL/10 g (peso corporal, ip) como substituto do tratamento no grupo de controle negativo (Figura S1A).

Sangue periférico foi coletado a cada 24 horas durante o período experimental até a eutanásia 72 horas após o tratamento. Amostras de fígado, rim e baço foram colhidas (Figura S1B).

2.4. Ensaios de Biologia

2.4.1. Ensaio do Cometa

A eletroforese em gel unicelular (SCGE) foi realizada utilizando uma amostra de sangue periférico coletada 24 horas após o tratamento de acordo com o protocolo²² com modificações²³. Resumidamente, 100 células/camundongo foram analisadas visualmente sob um microscópio de fluorescência BIOVAL L2000A (BIOVAL, China) com 40× lente objetiva e uma combinação de filtro de excitação azul (420-490 nm) e filtro de barreira de 520 nm²⁴.

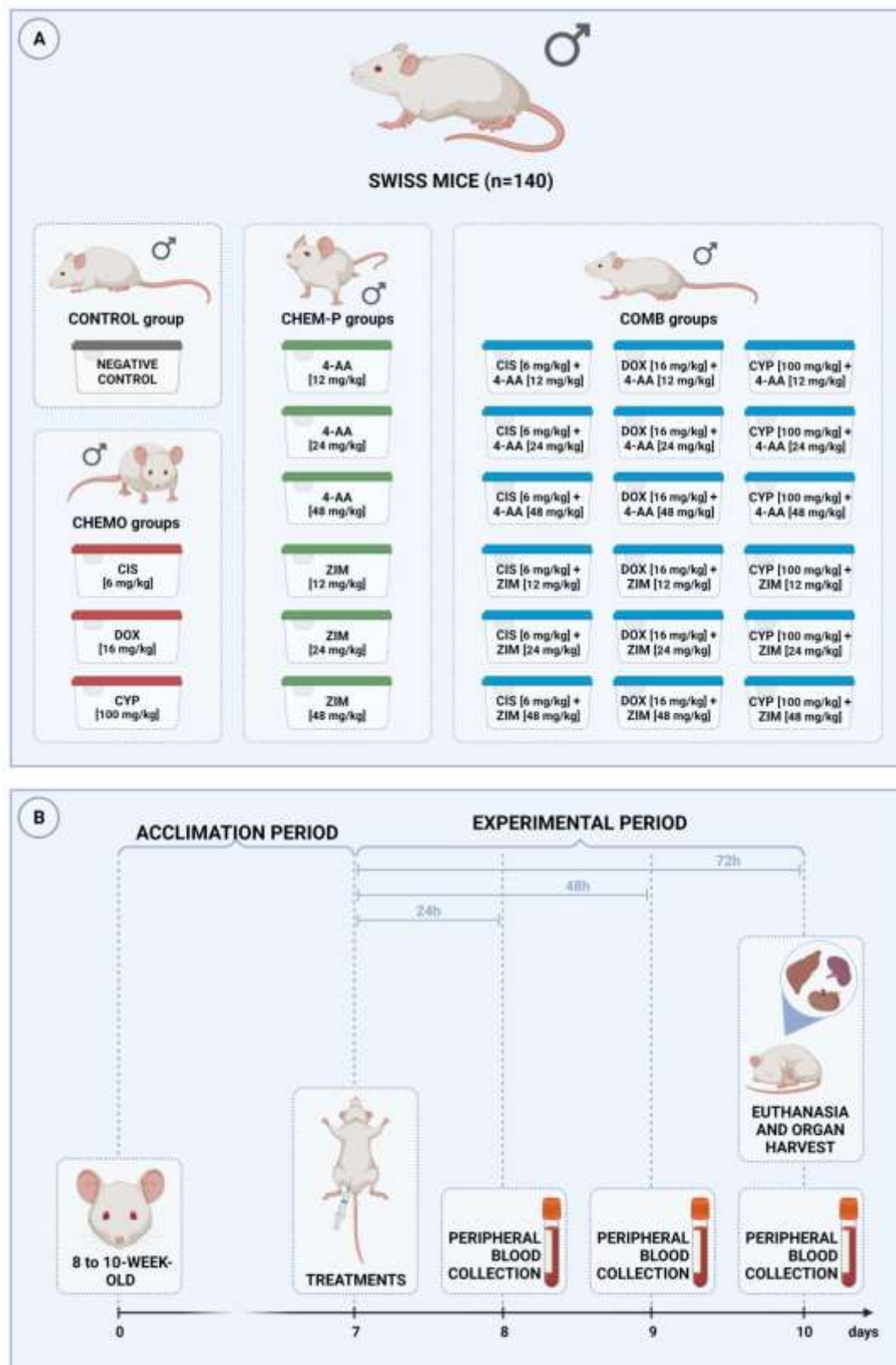


Figura S1: Representação esquemática do projeto experimental *in vivo*. A. Distribuição dos 28 grupos experimentais (n=5) e sua categoria de tratamento: quimioterápicos (CHEMO); protótipos quimioterapêuticos (CHEM-P); associação de quimioterápicos e protótipos quimioterápicos (ASSOC) ou o veículo de diluição (CONTROL). B. Linha do tempo do experimento do dia 0 ao 10 (eutanásia) e coleta de amostras.

2.4.2. Ensaio de Micronúcleo (MNT)

Amostras de sangue periférico coletadas 24, 48 e 72 horas após os tratamentos foram utilizadas para verificar a presença de micronúcleos no sangue periférico de camundongos de acordo com o protocolo previamente descrito com modificações²⁵. Em resumo, 20 µL da amostra foram depositados em uma lâmina previamente coberto por 20 µL de alaranjado de acridina [1 mg/mL] e mantido em freezer (-20 °C) até o dia da análise. Um total de 2.000 células / camundongo foram analisadas sob um microscópio de fluorescência BIOVAL L2000A (BIOVAL, China) com lente objetiva de 40x e uma combinação de filtro de excitação azul (420-490 nm) e filtro de barreira de 520 nm.

2.4.3. Ensaio de Morte Celular

Amostras de fígado e rim foram colhidas após eutanásia dos ratos e maceradas em solução salina; 100 µL desta suspensão de amostra foram espalhados em uma lâmina. Após a secagem, as lâminas foram fixadas em solução de Carnoy por 5 min e imersas em gradiente decrescente de etanol (95% > 75% > 50% > 25%) antes de serem lavadas com tampão McIlvaine por 5 min. As lâminas foram coradas com alaranjado de acridina [1 mg/mL] por 5 min e lavadas com tampão McIlvaine. Padrões de fragmentação de DNA de 200 células/camundongos foram usados para identificar células apoptóticas sob um microscópio de fluorescência BIOVAL L2000A (BIOVAL, China) com lente objetiva de 40× e uma combinação de filtro de excitação azul (420-490 nm) e filtro de barreira de 520 nm^{26,27}.

2.4.4. Ensaio de Fagocitose

Um fragmento de aproximadamente um terço do tamanho total do baço foi colhido após eutanásia e macerado em solução salina; 100 µL dessa suspensão foram aplicados em lâmina previamente coberta com 20 µL de alaranjado de acridina [1 mg/mL]²⁵.

Um total de 200 células/camundongos foram analisados sob um microscópio de fluorescência BIOVAL L2000A (BIOVAL, China) com lente objetiva de 40× e uma combinação de filtro de excitação azul (420-490 nm) e

filtro de barreira de 520 nm para determinar a presença e/ou ausência de fagocitose²³.

2.4.5. Porcentagem de redução de danos (RD)

A RD é utilizada para avaliar a capacidade quimiopreventiva de um composto associado a um agente genotóxico conhecido^{28,29}. No presente estudo, a RD, além do estudo de eficácia quimiopreventiva, foi calculada para parâmetros estatisticamente significativos de ensaio de fagocitose e apoptose de acordo com a equação abaixo:

$$RD \text{ ou } ID (\%) = \left(\frac{\text{Média controle positivo} - \text{média grupo associado}}{\text{Média controle positivo} - \text{média controle negativo}} \right) \times 100$$

A RD negativa foi interpretada como um aumento do dano, conforme descrito anteriormente²⁷.

2.4.6. Análise Estatística

O teste t de Student determinou a significância estatística dos dados paramétricos e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. O nível de significância foi $p < 0,05$ e o teste estatístico foi realizado no software GraphPad Prism 3.02 (GraphPad Software, Inc.).

2.5. Acoplamento de DNA

2.5.1. Detalhes Computacionais

O protocolo virtual, incluindo docking molecular, foi realizado no computador DELL Workstation, com processador Intel Xeon E5-1660, 3,3 GHz, 4 CPUs, placa de vídeo NVIDIA GeForce RTX 2060, RAM 8 GB, sob o sistema operacional Windows.

2.5.2. Preparação de Proteína.

A estrutura cristalina baseada em difração de raios X de um B-DNA Dodecamer foi recuperada do Protein Data Bank³⁰ (PDB ID: 1BNA) com 1,9 Å de resolução para a estrutura cristalina do DNA sintético dodecamer d

(CpGpCpGpApApTpTpCpGpCpG). As moléculas de água foram removidas operando o BIOVIA Discovery Studio v4.5 (Accelrys) (Figura 3).

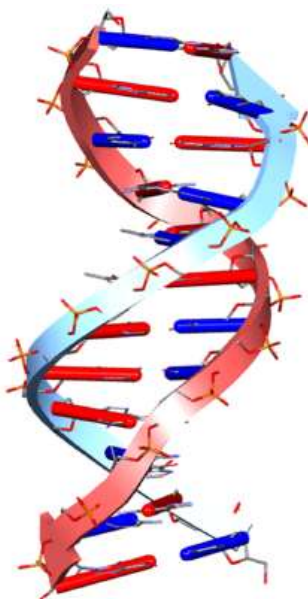


Figura 3. Visualização da Estrutura do B-DNA Dodecamer (1BNA) depois de remover as moléculas de água usando o Discovery Studio BIOVIA. Cores diferentes representam as cadeias de DNA: azul (cadeia A), laranja (bases da cadeia A), vermelho (cadeia B) e ciano (bases da cadeia B).

2.5.3. Docagem Molecular.

4-AA, 1, 2 e ZIM foram construídos no ChemDraw. Todas as geometrias foram virtualmente construídas e otimizadas em mecânica molecular (MM+) e métodos semiempíricos Austin Model 1 (AM1) usando o programa HyperChem 7.31 Os arquivos de saída foram convertidos em arquivos de entrada.mol2 do programa Discovery Studio BIOVIA usando Open Babel³², e depois convertidos em arquivos .pdb como arquivos de entrada em HDOCK³³. O programa de servidor web HDOCK foi usado para prever *in silico* a melhor orientação e conformação dos compostos para o BDNA.

2.5.4. Seleção de Alvos e Simulações de Docking Molecular.

A estrutura cristalizada do β -DNA sintético Dodecamer foi obtida do Protein Data Bank³⁰ (PDB ID: 1BNA). Então, simulações de encaixe foram realizadas para cada candidato a inibidor no alvo. Este procedimento foi

realizado usando o servidor web HDock33 e a pontuação de docking resultante foi avaliada. Antes do encaixe usando HDock, o B-DNA e os compostos foram carregados como arquivos .pdb no servidor web. Os complexos gerados pelo HDock foram selecionados usando o melhor modelo entre os resultados, que apresentou o melhor escore de docking. As estruturas complexas do sítio da proteína (.pdb) e dos ligantes (.pdb) foram inseridas no programa visualizador BIOVIA Discovery Studio para detalhar as interações entre os ligantes e as bases de DNA participantes.

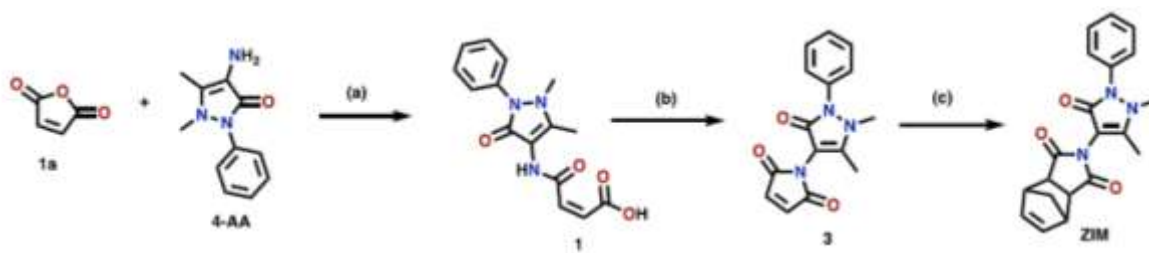
3. Resultados

3.1 Síntese de 2-(1,5-Dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-dihidro-1H-pirazol-4-yl)-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-metanoisoindole-1,3(2H)-diona (ZIM).

Esquema 1 mostra a rota sintética do ZIM.

O ácido maleico **1** foi obtido pela reação de abertura do anel do anidrido maleico **1a** e 4-AA. A reação de **1** com acetato de sódio e anidrido acético forneceu a maleimida **3**. Finalmente, a reação de cicloadição 4 + 2 de **3** e ciclopentadieno forneceu o ZIM policíclico.

Esquema 1. Estratégia Sintética para Obtenção dos Compostos Seleccionados



(a) acetona, rt, 1 h, 95% de rendimento; (b) anidrido acético, acetato de sódio, rt, 1 h, 95% de rendimento; (c, d) ciclopentadieno, rt, 30 min, 80% de rendimento.

3.2. Ensaios de Biologia

3.2.1. Avaliação de genotoxicidade: danos ao DNA

O CIS não aumentou significativamente ($p > 0,05$) a frequência de células danificadas (aumento de apenas 1,5x) ou no escore de dano ao DNA (aumento de apenas 1,61x). DOX e CYP aumentaram ($p < 0,05$) a frequência das células danificadas e o escore de danos ao DNA. O aumento na frequência de células

danificadas foi de $2,58\times$ e $4,53\times$, e o escore de dano ao DNA foi de $3,11\times$ e $5,32\times$ para DOX e CYP, respectivamente (Figura 4A). O 4-AA não aumentou ($p > 0,05$) a frequência de células danificadas. No entanto, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na pontuação de danos no DNA na dose mais elevada (48 mg/kg). ZIM aumentou ($p < 0,05$) a frequência de dano genômico para as três doses testadas. O aumento observado foi de $4,03\times$, $4,67\times$ e $3,55\times$ para 12, 24 e 48 mg/kg, respectivamente. Para o escore de dano, o aumento foi de $4,41\times$, $5,16\times$ e $3,78\times$ para as mesmas doses, respectivamente (Figura 4A).

Em associação com CIS, o 4-AA não alterou significativamente ($p > 0,05$) a frequência de células danificadas. Porém, foi observado aumento ($p < 0,05$) no escore para a dose mais elevada (48 mg/kg) (Figura 4B). Para esta dose, o incremento de dano foi de 67,74% (Figura 4C). O ZIM, em associação com o CIS, não alterou ($p > 0,05$) a frequência de células danificadas ou o escore de dano ao DNA para nenhuma das doses testadas (Figura 4B). A associação não apresentou percentual significativo de redução/aumento do dano, uma vez que o número de células danificadas não variou significativamente.

Em associação com DOX, o 4-AA reduziu ($p < 0,05$) a frequência de danos às células para a dose mais elevada (48 mg/kg). O 4-AA também reduziu ($p < 0,05$) a pontuação de danos ao DNA para as duas doses mais altas (24 e 48 mg/kg) (Figura 4D). Os percentuais de redução de danos foram de 34,69 e 55,10% para 24 e 48 mg/kg, respectivamente (Figura 4E). Na associação de ZIM com DOX, foi observada redução ($p < 0,05$) na frequência de células danificadas para doses de 24 e 48 mg/kg, e redução no escore de dano ao DNA apenas para 48 mg/kg (Figura 4D). Os percentuais de redução de danos foram de 26,94 e 47,35% para 24 e 48 mg/kg, respectivamente (Figura 4E).

Em associação com o CYP, o 4-AA reduziu ($p < 0,05$) a frequência de danos às células e o escore de danos ao DNA para todas as doses (Figura 4F). O percentual de redução de danos foi de 52,97, 58,90 e 46,12% para 12, 24 e 48 mg/kg, respectivamente (Figura 4G). O ZIM não alterou ($p > 0,05$) a frequência de células danificadas ou o escore de dano ao DNA em nenhuma das doses (Figura 4F).

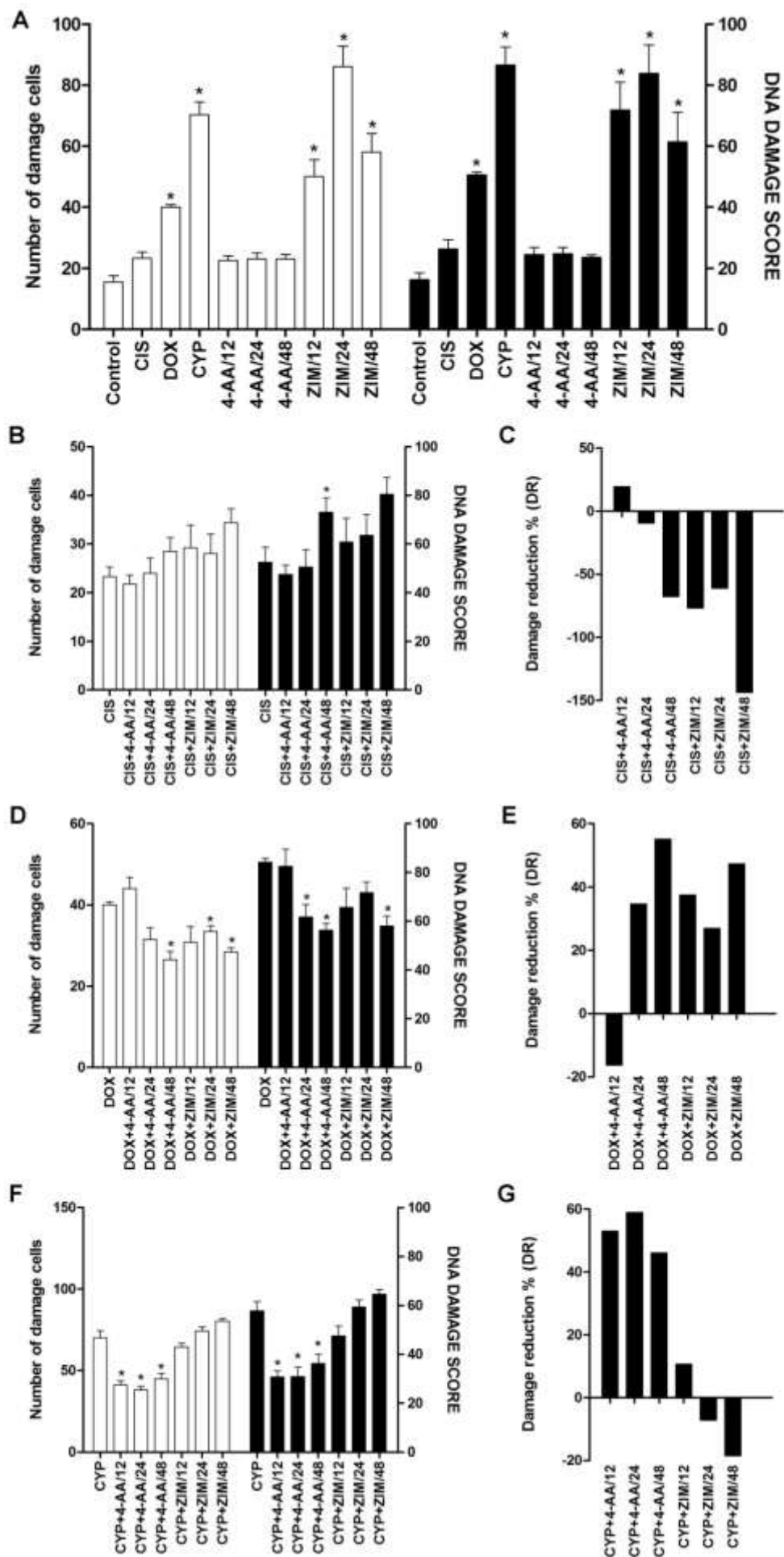


Figura 4. Avaliação de genotoxicidade: dano ao DNA (ensaio cometa e porcentagem de DR). A. Número de células danificadas e pontuação de danos ao DNA para tratamentos quimioterápicos (CIS, DOX ou CYP) e protótipos quimioterapêuticos (4-AA ou ZIM) com o tratamento de diluição do veículo como controle. B. Número de células danificadas e a pontuação de danos no DNA para CIS combinado com tratamentos de protótipos quimioterapêuticos (CIS+4-AA ou CIS+ZIM) com grupo CIS como controle. C. Porcentagem de redução de danos dos grupos CIS combinados com protótipos quimioterápicos (CIS+4-AA ou CIS+ZIM). D. Número de células danificadas e pontuação de danos no DNA para DOX combinado com tratamentos de protótipos quimioterapêuticos (DOX+4-AA ou DOX+ZIM) com o grupo DOX como controle. E. Porcentagem de redução de dano de grupos DOX combinados com protótipos quimioterápicos (DOX+4-AA ou DOX+ZIM). F. Número de células danificadas e pontuação de danos no DNA para CYP combinado com tratamentos de protótipos quimioterapêuticos (CYP+4-AA ou CYP+ZIM) com grupo CYP como controle. G. Porcentagem de Redução de Danos dos grupos CYP combinados com protótipos quimioterápicos (CYP+4-AA ou CYP+ZIM). Legenda: CIS = cisplatina; DOX = doxorubicina; CYP = ciclofosfamida; * = $p < 0,05$ (T-Student).

3.2.2. Avaliação de genotoxicidade: danos cromossômicos

CIS, DOX e CYP aumentaram a frequência de micronúcleos em 8,05×, 4,16× e 8,37× por 24 h; 5,50×, 3,26× e 4,81× por 48 h; e 2,18×, 9,76× e 13,23× por 72 h, respectivamente (Figura 5A). O 4-AA aumentou ($p < 0,05$) a frequência de micronúcleos para a dose mais alta (48 mg/kg) em 24 horas (1,79x) e as duas doses mais baixas (12 e 24 mg/kg) em 72 horas (1,82× e 1,94×, respectivamente). Após 48 h, foi observada redução (2,07×; $p < 0,05$) na frequência de micronúcleos para 12 mg/kg. O ZIM aumentou ($p < 0,05$) a frequência de micronúcleos para as três doses em todos os tempos de avaliação, exceto para a dose de 48 mg/kg na avaliação de 48h. No período de 24 horas, os aumentos foram de 1,60×, 2,78× e 2,61×; para 48 horas, os aumentos foram de 1,45×, 2,15× e 1,41×; e por 72 h, os aumentos foram de 4,71×, 4,05× e 4,47× para doses de 12, 24 e 48 mg/kg, respectivamente (Figura 5A).

Em associação com o CIS, o 4-AA reduziu ($p < 0,05$) a frequência de micronúcleos para todas as doses em todos os momentos avaliados (Figura 5B), e os percentuais de redução de danos variaram de 46,09 a 58,21% (Figura 5C). Estes resultados demonstram os efeitos quimiopreventivos do 4-AA sobre o CIS em todas as doses. Por outro lado, o ZIM apresentou efeito quimiopreventivo através da redução ($p < 0,05$) da frequência de micronúcleos para todas as doses em 24 e 72 h (Figura 5B), e os percentuais de redução de danos variaram de 38,36 a 83,26% (Figura 5B). 5C). As 48h, foi observada atividade quimiopreventiva ($p < 0,05$) apenas para a dose intermediária (Figura 5B), e o percentual de redução de danos foi de 42,39% (Figura 5C). Em associação com

DOX, o 4-AA reduziu ($p < 0,05$) a frequência de micronúcleos apenas para as doses mais baixas e mais altas as 24h (Figura 5D), e os percentuais de redução de danos foram de 40,00 e 24,17% para 12 e 48 mg/kg, respectivamente (Figura 5E). O ZIM reduziu ($p < 0,05$) a frequência de micronúcleos apenas na dose mais alta em 24 e 48 h (Figura 5D), e os percentuais de redução de danos foram 52,33 e 45,90, respectivamente (Figura 5E). Em associação com o CYP, o 4-AA apresentou efeito quimiopreventivo ($p < 0,05$) para todas as doses em todos os momentos avaliados (Figura 5F), e os percentuais de redução de danos variaram de 38,35 a 87,98% (Figura 5G).

O ZIM teve o mesmo efeito (Figura 5F), e os percentuais de redução de danos variaram de 51,21 a 109,90% (Figura 5G). A porcentagem de redução de danos acima de 100% indica que ZIM para 12 mg/kg às 48 h também reduziu o dano basal, o que significa que reduziu a frequência basal dos micronúcleos em comparação com a frequência do grupo controle negativo (Figura 5G).

3.2.3. Ensaio de Morte Celular

CIS, DOX e CYP aumentaram ($p < 0,05$) a frequência de morte celular no fígado e nos rins. O aumento da morte celular no fígado foi de 2,16×, 2,35× e 1,53×, e no rim foi de 2,06×, 2,03× e 2,17× para CIS, DOX e CYP, respectivamente (Figura 6A).

O 4-AA aumentou ($p < 0,05$) a frequência de morte celular no fígado e nos rins para todas as doses. O aumento do fígado foi de 1,67×, 1,57× e 1,61×, e o aumento do rim foi de 1,69×, 1,73× e 1,50× para doses de 12, 24 e 48 mg/kg, respectivamente. O ZIM também aumentou ($p < 0,05$) a frequência de morte celular no fígado e nos rins para todas as concentrações, exceto para a dose de 24 mg/kg no rim. O aumento do fígado foi de 1,75×, 1,24× e 1,54×, e do rim foi de 1,26×, 1,23× e 1,24× para 12, 24 e 48 mg/kg, respectivamente (Figura 6A).

O 4-AA reduziu ($p < 0,05$) a frequência de morte celular no fígado induzida por CIS, DOX e no rim induzida por CIS, DOX e CYP (Figura 6B, D, F). A porcentagem de redução de danos para CIS no fígado foi de 40,65, 66,06 e 41,67% (Figura 6C) e para DOX foi de 62,06, 59,44 e 77,80% (Figura 6E) para 12, 24 e 48 mg/kg, respectivamente. A porcentagem de redução de danos para CYP foi 0, -24,23 e -19,82%. Esses valores não possuem significância estatística

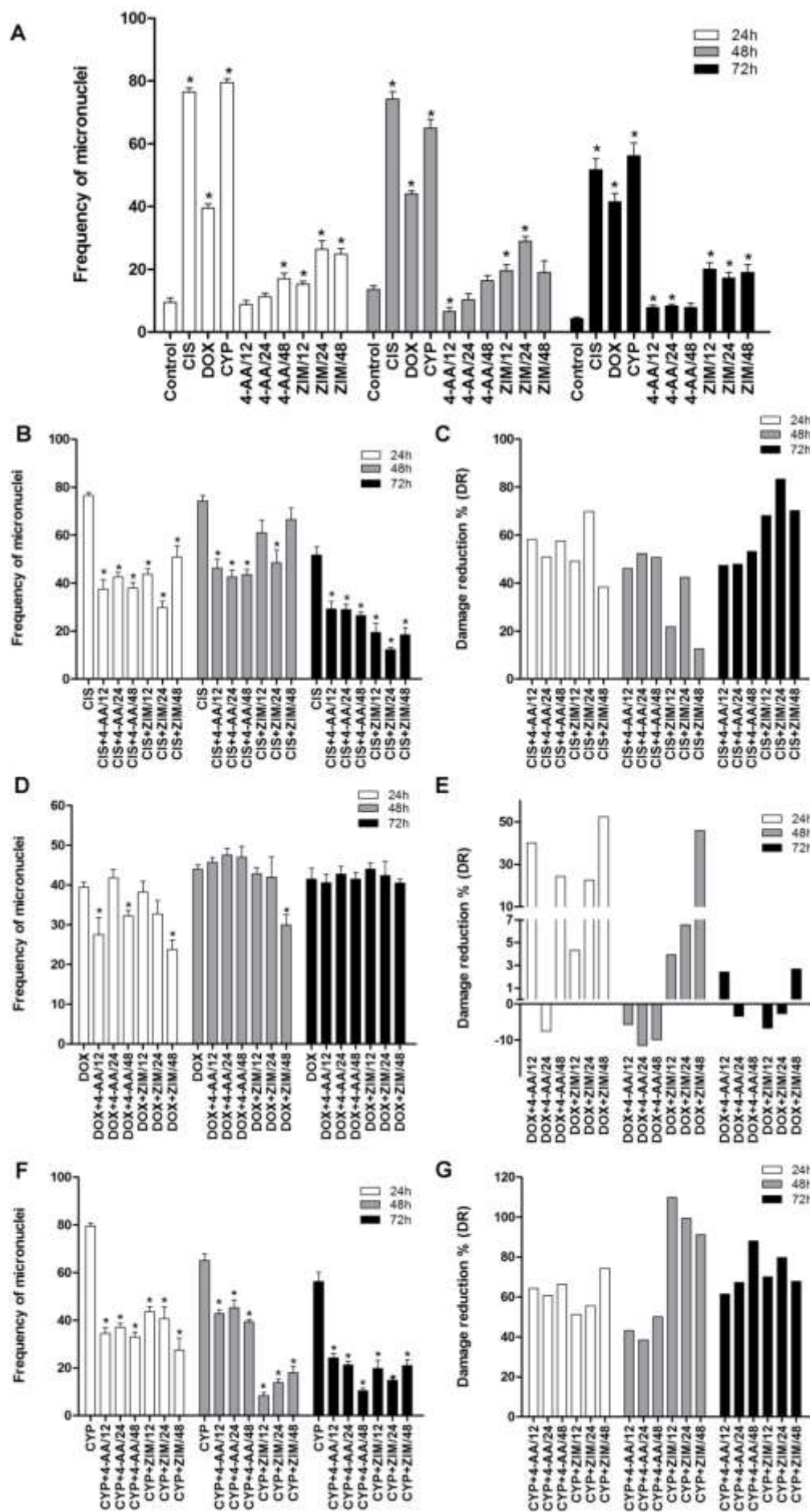


Figura 5. Avaliação de genotoxicidade: Danos cromossômicos (ensaio MNT e porcentagem de DR). A. Frequência de micronúcleos para quimioterápicos (CIS, DOX ou CYP) e protótipos quimioterapêuticos (4-AA ou ZIM) com o tratamento de diluição do veículo como controle. B, Frequência de micronúcleos para tratamentos CIS combinados com protótipos quimioterápicos (CIS+4-AA ou CIS+ZIM) com grupo CIS como controle. C. Danos Porcentagem de redução dos grupos CIS combinados com protótipos quimioterápicos (CIS+4-AA ou CIS+ZIM). D. Frequência de micronúcleos para DOX combinados com tratamentos protótipos quimioterápicos (DOX+4-AA ou DOX+ZIM) com grupo DOX como controle. E. Porcentagem de Redução de Dano grupos de DOX combinados com protótipos quimioterápicos (DOX+4-AA ou DOX+ZIM). F. Frequência de micronúcleos para CYP combinada com protótipos quimioterápicos (CYP+4-AA ou CYP+ZIM) tratamentos com grupo CYP como controle. G. Porcentagem de redução de dano de CYP combinada com grupos de protótipos quimioterápicos (CYP+4-AA ou CYP+ZIM). Legenda: CIS = cisplatina; DOX= doxorubicina; CYP = ciclofosfamida; * = $p < 0,05$ (T-Student).

($p > 0,05$) (Figura 6G). A porcentagem de redução de danos para CIS no rim foi 49,42, 50,57 e 45,98% (Figura 6C); a do DOX foi de 29,41, 23,53 e 22,35% (Figura 6E); e para CYP foi de 20,83, 27,08 e 31,25% (Figura 6G) para 12, 24 e 48 mg/kg, respectivamente.

ZIM reduziu ($p < 0,05$) a frequência de morte celular no fígado induzida por CIS e DOX, e no rim induzida por CIS, DOX e CYP (Figura 6 B, D, F). A porcentagem de redução de danos para CIS no fígado foi de 79,27, 75,20 e 52,84% (Figura 6C), e para DOX foi de 62,06, 59,44 e 77,80% (Figura 6E) para 12, 24 e 48 mg/kg, respectivamente. A porcentagem de redução de danos para CYP foi -33,04, 0 e 35,24%. Porém, não houve redução significativa ($p > 0,05$) (Figura 6G). A porcentagem de redução de danos para CIS no rim foi 45,29, 36,09 e 41,61% (Figura 6C); para DOX foi 28,00, 21,41 e 30,82% (Figura 6E); e para CYP foi 72,08, 77,08 e 70,42% (Figura 6G) para 12, 24 e 48 mg/kg, respectivamente.

3.2.4. Fagocitose Esplênica

CIS, DOX e CYP aumentaram ($p < 0,05$) a frequência de fagocitose esplênica em 2,4×, 2,11× e 1,94× para 12, 24 e 48 mg/kg, respectivamente (Figura 7A). O 4-AA aumentou ($p < 0,05$) a fagocitose esplênica em 2,18×, 2,20× e 2,10× para 12, 24 e 48 mg/kg, respectivamente. O ZIM também aumentou ($p < 0,05$) em 2,12×, 2,11× e 2,16× para as mesmas doses, respectivamente (Figura 7A). O 4-AA não interferiu ($p > 0,05$) na frequência de fagocitose esplênica induzida por CIS (Figura 7 B, C). A dose de 48 mg/kg de 4-AA aumentou ($p < 0,05$) a fagocitose esplênica quando associada à DOX (Figura

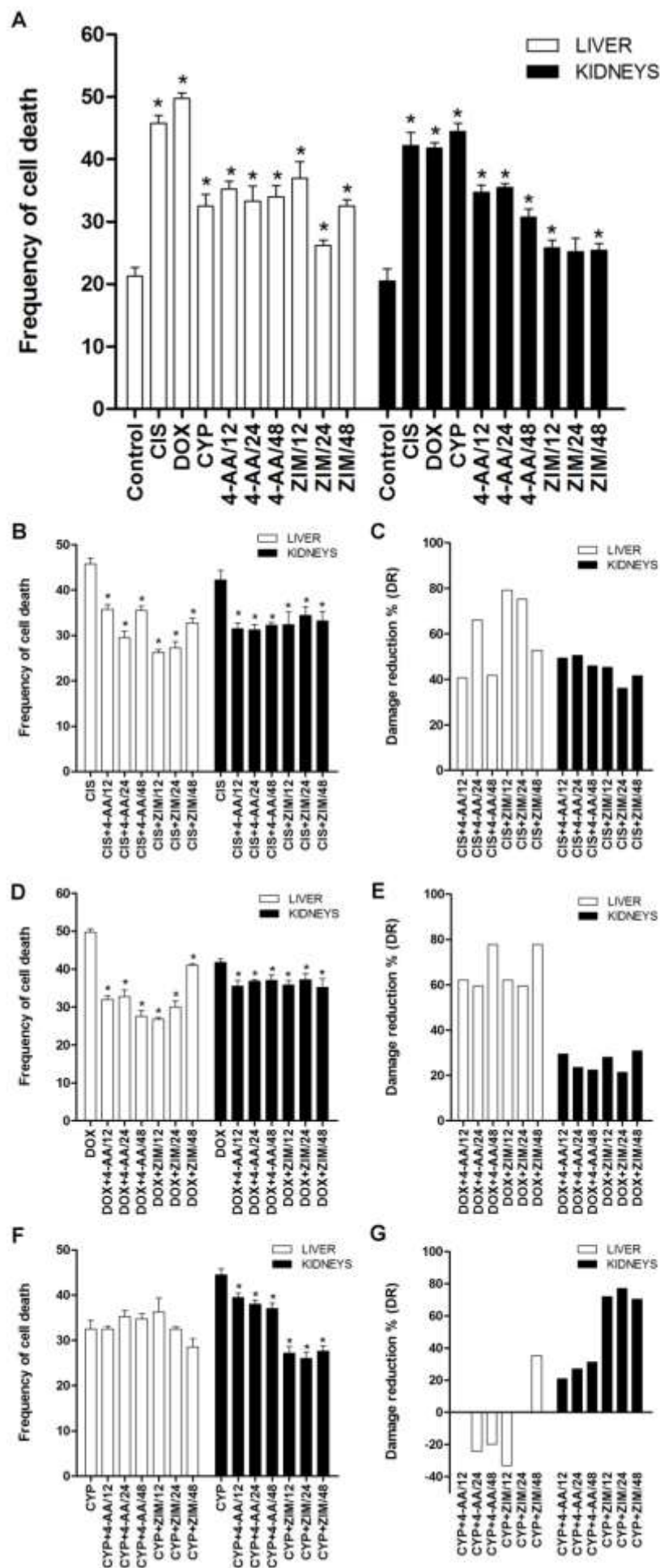


Figura 6. Ensaio de morte celular e porcentagem de DR. A. Frequência de morte celular para quimioterápicos (CIS, DOX ou CYP) e quimioterápicos tratamentos protótipos (4-AA ou ZIM) com o tratamento de diluição do veículo como controle. B. Frequência de morte celular para CIS combinada com protótipos quimioterápicos (CIS+4-AA ou CIS+ZIM) com grupo CIS como controle. C. Porcentagem de Redução de Danos do CIS combinado com grupos de protótipos quimioterápicos (CIS+4-AA ou CIS+ZIM). D. Frequência de morte celular para DOX combinada com quimioterápicos tratamentos protótipos (DOX+4-AA ou DOX+ZIM) com grupo DOX como controle. E. Porcentagem de redução de dano de DOX combinada com protótipos quimioterápicos (DOX+4-AA ou DOX+ZIM). F. Frequência de morte celular para CYP combinada com protótipos quimioterápicos (CYP+4-AA ou CYP+ZIM) com grupo CYP como controle. G. Porcentagem de redução de danos do CYP combinado com quimioterápicos grupos protótipos (CYP+4-AA ou CYP+ZIM). Legenda: CIS = cisplatina; DOX = doxorubicina; CYP = ciclofosfamida; * = $p < 0,05$ (T-Student).

7D). O incremento de dano foi de 23,33% (Figura 7E). Todas as concentrações de 4-AA associadas ao CYP reduziram ($p < 0,05$) a frequência de fagocitose esplênica (Figura 7F), e os percentuais de redução de danos foram 37,01, 54,33 e 62,99% para 12, 24 e 48 mg/kg, respectivamente (Figura 7G).

Apenas a maior dose de ZIM reduziu ($p < 0,05$) a frequência de fagocitose esplênica quando associada ao CIS (Figura 7B,C) e aumentou ($p < 0,05$) quando associada a DOX (Figura 7D). A redução de danos e o aumento percentual foram em torno de 29,21 e 23,33% para CIS e DOX, respectivamente (Figura 7C, E). Em associação com CYP, foi observada redução ($p < 0,05$) da fagocitose esplênica (Figura 7F) em 31,49, 50,71 e 59,53% para 12, 24 e 48mg/kg, respectivamente (Figura 7G).

3.2.5. Contagem diferencial de células sanguíneas

Uma análise preliminar mostrou que o grupo controle negativo apresentava basófilos e eosinófilos acima dos valores de referência. O mesmo resultado foi observado para 4-AA quando os animais foram tratados com CIS e 48 mg/kg de 4-AA quando os animais foram tratados com DOX e 48 mg/kg de 4-AA. Os animais tratados com CYP e a associação de CYP com as duas doses mais baixas de 4-AA (12 e 24 mg/kg) também apresentaram frequência de basófilos acima do valor de referência. Contudo, não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos quando aplicada a análise estatística. Observou-se também que todos os animais dos diferentes grupos experimentais apresentaram frequência de basófilos acima dos valores de referência, inclusive o controle negativo. Não foram encontradas diferenças

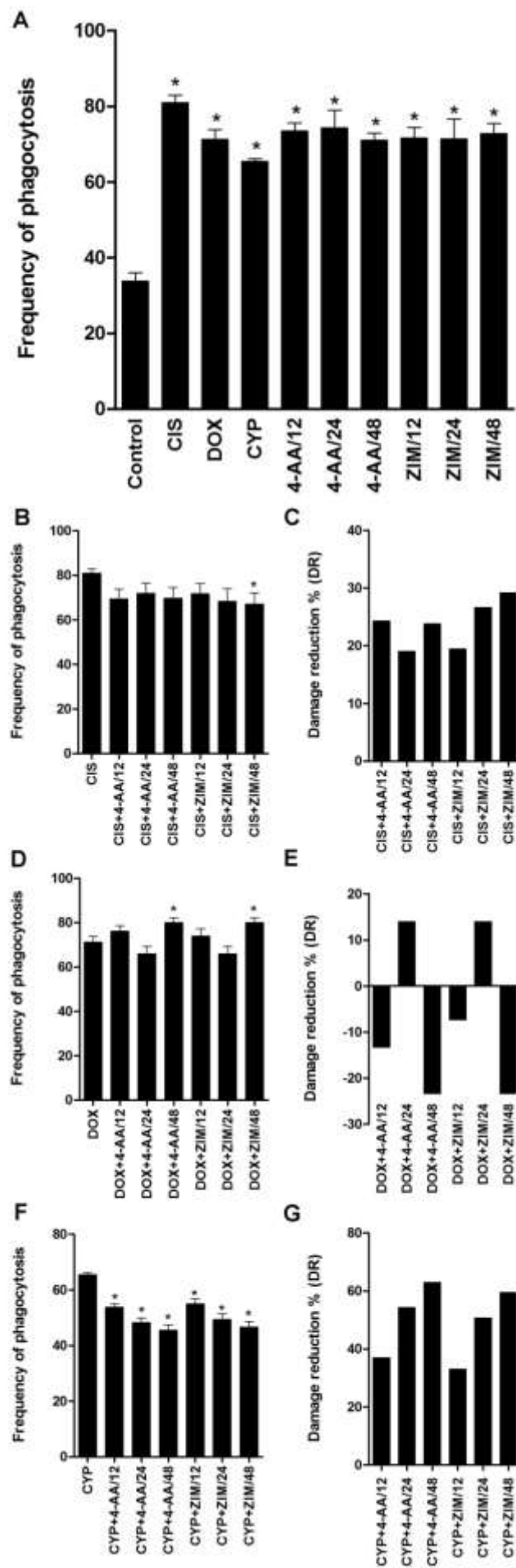


Figura 7. Frequência da porcentagem de fagocitose esplênica de DR. A. Frequência de fagocitose para quimioterápicos (CIS, DOX ou CYP) e protótipos quimioterapêuticos (4-AA ou ZIM) com o tratamento de diluição do veículo como controle. B. Frequência de morte celular para CIS combinada com protótipos quimioterápicos (CIS+4-AA ou CIS+ZIM) tratamentos com grupo CIS como controle. C. Porcentagem de redução de dano do CIS combinados com grupos de protótipos quimioterápicos (CIS+4-AA ou CIS+ZIM). D. Frequência de fagocitose para DOX combinada com protótipos quimioterápicos (DOX+4-AA ou DOX+ZIM) com grupo DOX como controle. E. Porcentagem de redução de dano de DOX combinados com grupos protótipos quimioterápicos (DOX+4-AA ou DOX+ZIM). F. Frequência de fagocitose para CYP combinada com protótipos quimioterápicos (CYP+4-AA ou CYP+ZIM) com grupo CYP como controle. G. Porcentagem de redução de dano do CYP combinado com grupos de protótipos quimioterápicos (CYP+4-AA ou CYP+ZIM). Legenda: CIS = cisplatina; DOX= doxorubicina; CYP = ciclofosfamida; * = $p < 0,05$ (T-Student).

significativas ($p > 0,05$) na aplicação da análise estatística. Esses fatos sugerem que essas alterações não estão relacionadas aos tratamentos (Tabela 1).

Além do aumento de basófilos e eosinófilos no grupo controle negativo, o tratamento dos animais com ZIM em associação com CIS, DOX e CYP, independente da dose de ZIM, também apresentou frequência de basófilos acima dos valores de referência. Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) após análise estatística, o que sugere que este resultado não se deve aos tratamentos. Para eosinófilos, todos os grupos apresentaram frequência acima dos valores de referência, exceto DOX associada à menor dose de ZIM (12 mg/kg) e CYP associada a ZIM (48 mg/kg). Após análise estatística, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$). Para ZIM sozinho (12 mg/kg), CIS associado a ZIM (48 mg/kg) e DOX associado a ZIM (24 mg/kg), os resultados mostraram que as frequências de monócitos foram superiores aos valores de referência (Tabela 2).

Para os linfócitos, observou-se que CIS, DOX e CYP reduzem ($p < 0,05$) suas frequências. Porém, quando o CIS é administrado em associação com 4-AA, foi observado aumento ($p < 0,05$) na frequência de linfócitos nas duas concentrações mais baixas (12 e 24 mg/kg). Também foi observado aumento ($p < 0,05$) quando a DOX foi associada a 12 e 48 mg/kg de 4-AA e na associação de CYP com 24 e 48 mg/kg de 4-AA. Houve redução significativa ($p < 0,05$) na frequência de neutrófilos na associação de CIS com 12 mg/kg de 4-AA e na associação de CYP com 24 e 48 mg/kg de 4-AA. Para os demais parâmetros não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados de contagem diferencial de células sanguíneas para tratamentos com 4-AA

Experimental groups	Cell types				
	55-95%	10-40%	0.0-0.3%	0.0-0.4%	0.1-3.5%
	Lymphocytes	Neutrophils	Basophils	Eosinophils	Monocytes
CHEM-P					
Control	78,50±3,23	23,75±5,12	0,50±0,29	1,50±0,65	2,25±0,85
4-AA/12	76,25±2,14 ^a	15,75±2,46 ^a	0,00±0,00 ^a	1,75±0,75 ^a	1,00±0,71 ^a
4-AA/24	81,50±0,87 ^a	13,50±1,44 ^a	0,00±0,00 ^a	1,00±0,71 ^a	2,00±0,71 ^a
4-AA/48	70,50±1,66 ^a	24,25±1,65 ^a	0,00±0,00 ^a	2,50±0,29 ^a	1,75±0,48 ^a
CIS COMB					
CIS	64,50±1,94 ^{a*}	28,50±1,94 ^a	0,00±0,00 ^a	2,25±0,25 ^a	0,25±0,25 ^a
CIS+4-AA/12	76,00±2,04 ^{b*}	19,50±1,44 ^{b*}	0,25±0,25 ^b	2,50±0,65 ^b	1,25±0,95 ^b
CIS+4-AA/24	74,50±3,12 ^{b*}	22,00±2,35 ^b	0,25±0,25 ^b	2,00±0,41 ^b	1,25±0,75 ^b
CIS+4-AA/48	67,75±3,86 ^b	22,50±2,53 ^b	1,00±0,71 ^b	1,75±0,48 ^b	1,50±0,65 ^b
DOX COMB					
DOX	57,25±6,36 ^{a*}	26,25±4,80 ^a	0,25±0,25 ^a	3,50±1,94 ^a	2,00±0,58 ^a
DOX+4-AA/12	75,25±2,17 ^{c*}	21,75±2,32 ^c	0,00±0,00 ^c	1,00±0,41 ^c	1,25±0,25 ^c
DOX+4-AA/24	64,50±5,17 ^c	31,75±4,33 ^d	0,00±0,00 ^c	2,00±1,08 ^c	2,00±0,58 ^c
DOX+4-AA/48	78,25±2,81 ^{c*}	17,75±1,55 ^c	0,75±0,48 ^c	1,50±0,29 ^c	1,50±0,96 ^c
CYP COMB					
CYP	60,50±2,87 ^{a*}	34,00±2,80 ^a	0,75±0,48 ^a	2,25±0,85 ^a	2,50±0,87 ^a
CYP+4-AA/12	67,50±3,97 ^d	28,25±3,04 ^d	0,50±0,29 ^d	1,25±0,48 ^d	1,25±0,48 ^d
CYP+4-AA/24	75,25±2,17 ^{d*}	21,75±1,38 ^{d*}	0,67±0,29 ^d	1,00±0,00 ^d	1,00±0,00 ^d
CYP+4-AA/48	80,00±2,52 ^{d*}	18,00±2,12 ^{d*}	0,25±0,25 ^d	1,25±0,25 ^d	1,00±0,41 ^d

^aDados apresentados em média ± DP. Legendas: 4-AA = 4-aminoantipirina; CHEM-P = protótipo quimioterápico; CIS = cisplatina; DOX = doxorubicina; CYP = ciclofosfamida; COMB = combinação de protótipo quimioterápico e quimioterápico; estatisticamente em comparação com o grupo de controle negativo. ^bEstatisticamente comparado ao grupo DOX. ^cEstatisticamente comparado ao grupo CIS. ^dEstatisticamente comparado ao grupo FC; *diferença estatisticamente significativa (p < 0,05; t-Student).; * = p < 0,05 (T-Student).

3.3. Ancoragem molecular

Os ácidos nucleicos desempenham papéis cruciais em vários processos celulares essenciais, incluindo a reprodução celular e a biossíntese de proteínas³⁴. A ligação de ligantes a macromoléculas desempenha um papel fundamental na biologia e na medicina como mecanismo de direção em processos biológicos. Moléculas que se ligam ao DNA podem perturbar o processo de replicação, o que afeta a proliferação celular ou o processo de transcrição, inibindo a expressão gênica. Mais especificamente, a ligação de medicamentos a proteínas e DNA tem sido de grande interesse nos últimos anos,

utilizando métodos experimentais e teóricos. Devido ao papel central do DNA na replicação e transcrição, o DNA tem sido um alvo importante para antibióticos, anticancerígenos e medicamentos antivirais³⁵.

Tabela 2. Resultados de contagem diferencial de células sanguíneas para tratamentos com ZIM

Experimental groups	Cell types				
	55-95%	10-40%	0.0-0.3%	0.0-0.4%	0.1-3.5%
	Lymphocytes	Neutrophils	Basophils	Eosinophils	Monocytes
CHEM-P					
Control	78,50±3,23	23,75±5,12	0,50±0,29	1,50±0,65	2,25±0,85
ZIM/12	67,60±1,68 ^{a*}	26,20±0,55 ^a	0,20±0,22 ^a	2,00±0,61 ^a	4,00±1,46 ^a
ZIM/24	76,80±4,44 ^a	17,20±3,42 ^a	0,40±0,27 ^a	3,00±1,17 ^a	2,60±1,48 ^a
ZIM/48	69,20±5,52 ^a	24,20±4,46 ^a	0,40±0,27 ^a	2,80±0,65 ^a	3,20±0,82 ^a
CIS COMB					
CIS	64,50±1,94 ^{a*}	28,50±1,94 ^a	0,00±0,00 ^a	2,25±0,25 ^a	0,25±0,25 ^a
CIS+ZIM/12	82,80±2,77 ^{b*}	11,60±3,75 ^{b*}	0,80±0,65 ^b	1,80±0,82 ^b	3,00±1,27 ^b
CIS+ZIM/24	77,40±3,01 ^{b*}	16,60±3,01 ^{b*}	0,80±0,42 ^b	4,20±1,52 ^b	1,00±1,12 ^b
CIS+ZIM/48	64,60±4,86 ^b	27,60±5,29 ^b	1,80±0,82 ^b	2,00±0,71 ^b	4,00±1,46 ^b
DOX COMB					
DOX	57,25±6,36 ^{a*}	26,25±4,80 ^a	0,25±0,25 ^a	3,50±1,94 ^a	2,00±0,58 ^a
DOX+ZIM/12	80,60±1,86 ^{c*}	15,80±1,56 ^c	1,80±0,65 ^c	0,40±0,45 ^c	1,40±0,67 ^c
DOX+ZIM/24	77,00±2,55 ^{c*}	15,80±1,43 ^c	2,00±1,00 ^c	1,00±0,50 ^c	4,20±1,60 ^c
DOX+ZIM/48	76,80±2,51 ^{c*}	17,20±3,07 ^c	1,60±0,67 ^c	1,40±1,04 ^c	3,00±1,62 ^c
CYP COMB					
CYP	60,50±2,87 ^{a*}	34,00±2,80 ^a	0,75±0,48 ^a	2,25±0,85 ^a	2,50±0,87 ^a
CYP+ZIM/12	66,20±2,86 ^d	27,20±1,64 ^d	1,80±0,89 ^d	1,40±0,24 ^d	3,40±0,84 ^d
CYP+ZIM/24	79,00±2,32 ^{d*}	17,80±1,92 ^{d*}	0,80±0,65 ^d	1,00±0,50 ^d	1,40±0,45 ^d
CYP+ZIM/48	72,40±12,36 ^d	26,40±12,56 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	1,20±1,08 ^d

^aDados apresentados em média ± DP. Legendas: CHEM-P = protótipo quimioterápico; CIS = cisplatina; DOX = doxorubicina; CYP = ciclofosfamida; COMB = combinação de protótipo quimioterápico e quimioterápico; estatisticamente em comparação com o grupo de controle negativo. ^bEstatisticamente comparado ao grupo DOX. ^cEstatisticamente comparado ao grupo CIS. ^dEstatisticamente comparado ao grupo FC; *diferença estatisticamente significativa (p < 0,05; t-Student).

Os efeitos da ligação do ácido nucleico aos medicamentos são conhecidos para várias doenças, como o câncer³⁶. A maioria dos medicamentos que se ligam ao DNA são compostos aromáticos de baixo peso molecular, muitas vezes transportando cargas positivas³⁷. Os diferentes modos de ligação do medicamento ao DNA incluem a intercalação entre células adjacentes, pares de bases e intrusão no sulco menor e no sulco maior.

A intercalação e a ligação ao sulco menor são a maioria dos modos de ligação ao DNA de ligantes pequenos³⁸⁻⁴⁰. A especificidade da sequência de ligação do fármaco ao DNA é limitada devido ao tamanho restrito dos fármacos, mas é geralmente maior para ligantes de sulco menor e maior do que para intercaladores^{38,39}.

A intercalação requer uma deformação significativa devido à formação de uma cavidade de ligação^{39,40}, em contraste com a ligação ao sulco menor e maior que não requer alterações conformacionais significativas no DNA⁴⁰. A maioria dos medicamentos de ligação ao DNA liga-se ao B-DNA e apresenta uma maior afinidade por sequências ricas em AT^{40,41}.

A estrutura com sequências com bases alternadas A (DA) e T (DT) são geralmente estreitas, permitindo contatos de van der Waals favoráveis entre a droga e o DNA, em contraste com sequências ricas em GC, onde grupos amino volumosos de bases guanina afetam a geometria do sulco^{38,40}. Estudos sobre a ligação droga-DNA foram realizados para elucidar as origens energéticas da ligação em termos de forças intermoleculares e mudanças conformacionais induzidas e para desenvolver novas estratégias de design de drogas^{43,44}.

O sulco principal do DNA oferece contatos mais específicos para estabelecer ligações de hidrogênio com a droga, mas os contatos de van der Waals são menos favoráveis devido às dimensões do sulco³⁸. Além disso, o sulco maior é frequentemente ocupado por proteínas cuja atividade biológica pode ser afetada por sulco menor ligação de drogas³⁸. A ligação droga-DNA é, na maioria dos casos, não covalente, embora ligações covalentes possam ser formadas com ligantes reativos^{39,40}.

A energia de ligação mais negativa mostra uma afinidade de ligação ao DNA mais potente. Assim, as afinidades de ligação ao DNA mostram uma interação mais significativa com os compostos na região do sulco principal da estrutura.

Decidimos realizar acoplamento molecular com DNA e 4-AA, 1, 2 e ZIM para fornecer informações para os resultados de danos ao DNA e comparar sua afinidade de ligação^{45,46}.

Estudos de acoplamento de modo de interação e afinidade de ligação foram realizados nos compostos 4-AA, 1, 2 e ZIM (Figura 8) com B-DNA (PDB ID: 1BNA) para explorar o local de ligação mais viável. Conforme mostrado na Figura 7, os compostos interagem com o DNA no sulco principal, mostrando uma alta afinidade pela região A-Trich. As energias de ligação relativas resultantes de 4-AA, 1, 2 e ZIM acoplados são mostradas na Tabela 3.

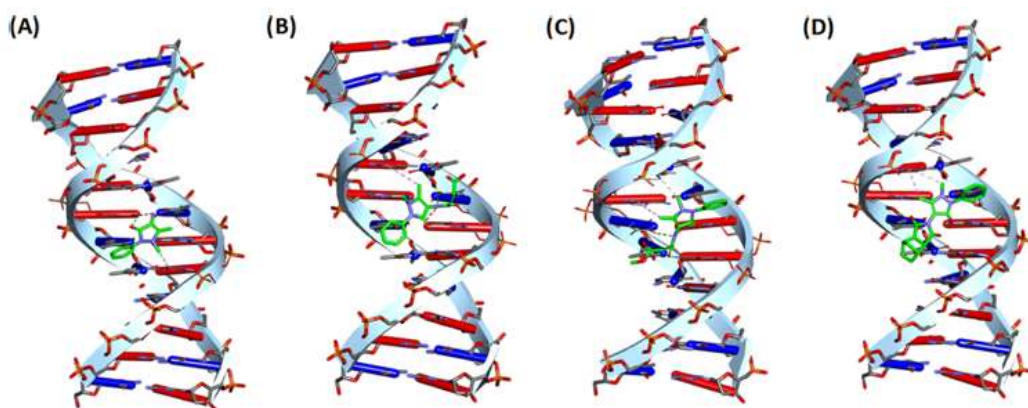


Figura 8. Interações entre os compostos (carbonos verdes) e B-DNA: A. 4-aminoantipirina 4-AA; B. composto 1; C. composto 2; e D. composto ZIM.

Tabela 3. Energias de interação do complexo ligante-receptor com B-DNA (cristalizado)

Composto	docking score (kcal/mol)
4-AA	-85,91
1	-111,93
2	-117,35
ZIM	-119,83

As interações entre o B-DNA e os quatro compostos são mostradas na Figura 9. Além disso, os resultados indicam que existe certa interação de ligações de hidrogênio entre os complexos e o DNA.

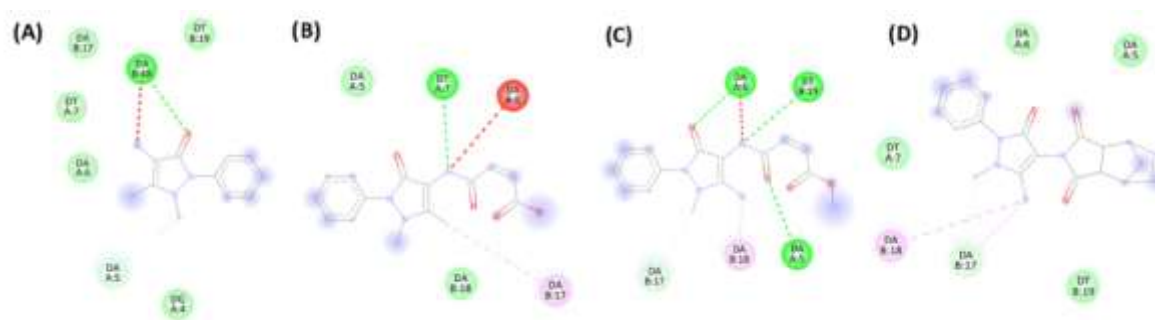


Figura 9. Interações de A. 4-aminoantipirina (4 AA); B. composto 1; C. composto 2; e D. ZIM.

4. DISCUSSÃO

Quando os animais foram tratados apenas com 4-AA, constatou-se que nenhuma das doses aumentou a frequência de células com danos no DNA avaliada pelo ensaio cometa. Porém, a avaliação do escore de dano ao DNA mostrou que a dose mais elevada aumentou esse parâmetro. O dano cromossômico pelo ensaio de micronúcleos mostrou que a maior dose aumentou a frequência desse biomarcador em 24 horas. O mesmo ocorreu para a menor dose em 48 horas e as duas menores doses em 72 horas. Estes resultados sugerem atenção ao efeito genotóxico do 4-AA.

No entanto, de acordo com estes dados experimentais, este composto parece ter uma baixa capacidade de causar danos no DNA tanto a nível genômico como cromossômico até uma dose de 48 mg/kg. Relatamos que o 4-AA não é genotóxico, não aumenta a frequência de lesões genômicas ou cromossômicas até 24 mg/kg e pode aumentar a frequência de morte celular no fígado e nos rins sem ativar a fagocitose esplênica¹⁴. Além disso, demonstramos que o 4-AA também aumenta a frequência de morte celular no fígado e nos rins¹⁴. No entanto, causou um aumento na fagocitose esplênica em todas as doses testadas, onde duas delas foram iguais aos nossos dados anteriores (12 e 24 mg/kg)¹⁴ e uma terceira dose maior (48 mg/kg).

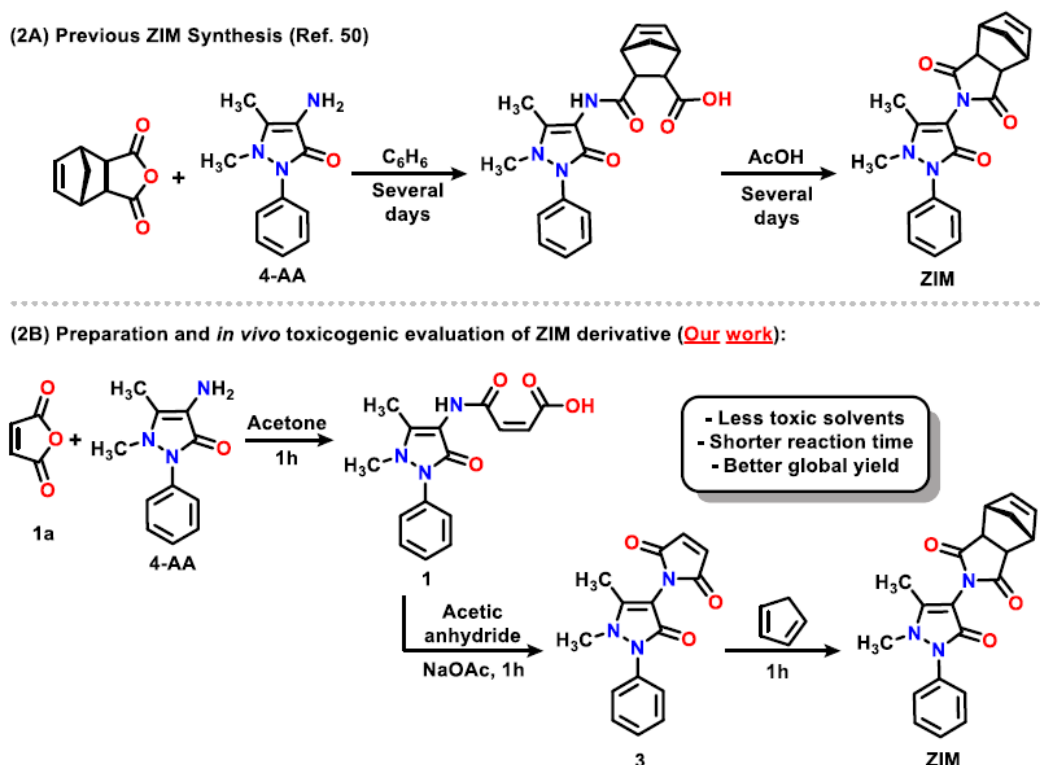
Além disso, o 4-AA não interferiu na contagem diferencial de células sanguíneas. Entretanto, relatamos que a dose de 24 mg/kg de 4-AA aumentou a frequência de linfócitos e reduziu a de neutrófilos¹⁴. Portanto, os resultados deste estudo não corroboram nossos achados anteriores. Possivelmente

ocorreu porque a fagocitose esplênica ativada e a remoção de células danificadas (células micronucleadas, por exemplo) pelo baço podem ter favorecido a homeostase dos animais e, portanto, não induzido qualquer alteração na contagem celular do sangue. Esse fato está documentado em diversos tipos de estudos^{13,47-49} e até mesmo em produtos derivados do 4-AA^{13,14,20}.

O 4-AA tem efeito quimiopreventivo e reduz os efeitos dos quimioterápicos CIS, DOX e CYP, pois reduz a frequência de danos ao DNA (cometa e/ou micronúcleos)¹⁴. Observamos que em associação com CIS, o 4-AA não preveniu dano genômico (ensaio cometa). No entanto, evitou danos cromossômicos (ensaio de micronúcleo). Este relatório demonstra um alto efeito quimiopreventivo do 4-AA contra o CIS. Comparado à associação com DOX, o 4-AA apresentou menor quimioprevenção, mas isso ocorreu tanto em danos genômicos quanto cromossômicos. Quando associado ao CYP, o 4-AA apresentou as melhores taxas de quimioprevenção tanto para danos genômicos quanto cromossômicos. Assim, também endossamos que o 4-AA reduz os danos ao DNA, especialmente se associado ao CYP. Portanto, este composto pode reduzir o efeito de agentes quimioterápicos que têm como mecanismo de ação a indução de danos ao DNA. Assim, sua associação não é recomendada.

A associação do 4-AA com CIS e DOX reduz a frequência de morte celular no fígado e a associação com CIS e CYP reduz a frequência de morte celular nos rins¹⁴. Nossos dados demonstram que o 4-AA tem efeito quimiopreventivo e interfere no mecanismo de ação dos quimioterápicos (indução de danos ao DNA) e, conseqüentemente, reduz a frequência de morte celular no fígado e nos rins quando associados a CIS e DOX. Para o fígado, nossos dados corroboram o que foi descrito por nós anteriormente¹⁴. Mas para o rim, nossos dados são contraditórios quanto ao efeito do 4-AA em associação com a DOX. Observamos redução na taxa de morte celular e não observamos redução alguma¹⁴. Observamos também que o 4-AA interfere na fagocitose esplênica associada ao CIS. Apenas a dose mais elevada de 4-AA aumentou a fagocitose associada à DOX e reduziu a fagocitose quando associada ao CYP. Esses dados contradizem o relatório anterior¹⁴, que afirmava que o 4-AA reduz a fagocitose em associação com CIS e DOX e não interfere no CYP. Além disso, não

Esquema 2. Comparação da Abordagem da Literatura (2A) e Nossa Abordagem (2B) para a Estratégia Sintética para Obtenção de ZIM



encontramos influência do 4-AA na contagem diferencial de células sanguíneas¹⁴. Observamos que o 4-AA, em particular, aumenta a frequência de linfócitos em associação com CIS, DOX e CYP.

Houve apenas um relato na literatura para a síntese de um derivado de 4-aminoantipirina com estrutura semelhante às carboximidas de norborneno que utilizou uma substituição acila nucleofílica de 4-AA com núcleo de norborneno com vários dias de tempo de reação (Esquema 2A)⁵⁰. Em nossa abordagem, o ácido maleico 1 foi obtido pela reação de abertura do anel do anidrido maleico 1a e 4-AA. A reação de 1 com acetato de sódio e anidrido acético forneceu a maleimida 3. Finalmente, a reação de cicloadição 4+2 de 3 e ciclopentadieno forneceu ao composto policíclico 4 um tempo de reação geral de 3 horas (Esquema 1B)²¹.

Mostramos que o ZIM pode estar envolvido na inibição da resposta inflamatória, no envolvimento das prostaglandinas na formação do edema e na

redução do recrutamento de células polimorfonucleares e da fase neurogênica da dor, tornando o ZIM um bom protótipo antiinflamatório²¹. No entanto, é a primeira vez que o ZIM é relatado como um agente genotóxico eficiente, uma vez que o ZIM induziu um aumento na frequência de danos genômicos e cromossômicos. Vale ressaltar que a dose de 24 mg/kg apresentou maior dano genotóxico do que a dose de 48 mg/kg. Portanto, para ZIM não foi observada correlação dose-resposta, o que não é incomum de ser observado²⁷.

Em associação com o CIS, o ZIM não alterou a frequência do dano genômico (ensaio cometa). Porém, mostrou prevenção de danos cromossômicos (ensaio de micronúcleos), o que sugere um importante efeito quimiopreventivo, uma vez que há altos percentuais de redução de danos ao DNA. Este resultado indica que o ZIM interfere no mecanismo de ação quimioterápica do CIS, que é mediado pela indução de dano ao DNA^{51,52}. Somente na associação do CIS com a maior dose de 4-AA (48 mg/kg) houve redução da fagocitose esplênica. A ausência de redução da fagocitose nas doses mais baixas pode ser justificada, uma vez que o organismo necessita agregar diferentes modos de ação para retomar a homeostase e reduzir os efeitos genotóxicos induzidos pelo quimioterápico. Assumimos que em baixas doses de 4-AA ocorreu desmutagênese e bioantimutagênese, e essas ações foram insuficientes para reduzir a frequência de células com danos ao DNA^{53,54}. Assim, o organismo ainda precisava da ativação da fagocitose esplênica para remover células que não sofrer reparo de DNA. Provavelmente, a fagocitose esplênica não foi necessária na maior dose de associação porque os níveis séricos de 4-AA foram suficientes para causar a redução do dano às células utilizando apenas os modos de ação desmutagênese e bioantimutagênese e, portanto, não ativando a fagocitose esplênica.

Além disso, células que permaneceram com danos no DNA e não foram fagocitadas podem ter sido alvo de morte celular por apoptose, por exemplo. Este fato pode ser corroborado pelo aumento significativo da morte celular induzida no fígado e nos rins utilizando apenas o ZIM. No entanto, também é observada uma redução na morte celular no fígado e nos rins em associação com CIS. Esse fato pode estar relacionado à diminuição dos danos genotóxicos

que podem ter ocorrido por diferentes modos de ação, como a desmutagênese e/ou a bioantimutagênese.

Substâncias com modo desmutagênico podem interagir diretamente com um agente genotóxico, seus precursores e/ou seus metabólitos e inativá-los química ou enzimaticamente⁵⁴⁻⁵⁷. Sugere-se também que essas substâncias possam agir como se preparassem o DNA para que seja menos suscetível a danos e erros e/ou para formar uma barreira protetora que impede que agentes genotóxicos causem danos⁵⁸. Substâncias que atuam por bioantimutagênese podem modular enzimas responsáveis pelo reparo e replicação do DNA. Para esse fim, eles aumentam a fidelidade da replicação, promovem reparos sem erros e/ou inibem sistemas de reparo propensos a erros. O protocolo de tratamento simultâneo permite que ambos os modos de ação ocorram simultaneamente quando o agente quimioterápico e o possível agente quimioprotetor são aplicados simultaneamente⁵⁸. Efeitos como esses são descritos para β -glucano⁵⁸, glutamina^{59,60}, fibras alimentares como trigo⁵⁹, e amido resistente⁶¹, entre outros. No entanto, também foi descrito para compostos sintéticos como isocumarina⁴⁹, um ácido (composto 1, Figura 2)¹³ e um éster (composto 2, Figura 2)²⁰ derivado de 4-AA.

Vale ressaltar também que o CIS por si só causou redução na frequência de linfócitos. Em associação com o ZIM, as frequências foram normalizadas e muito próximas ou até superiores às observadas no controle negativo. Esse fato sugere que o ZIM pode aumentar a frequência de linfócitos mesmo na presença de CIS, o que pode causar redução de linfócitos em pacientes submetidos à quimioterapia⁶². Esse baixo número de linfócitos pode impedir que o paciente seja submetido a um novo ciclo de quimioterapia, pois pode estar imunossuprimido⁶³. Nestes casos, antes de um novo ciclo de quimioterapia, é importante que o hemograma do paciente esteja dentro dos padrões esperados. Assim, embora o ZIM reduza a frequência de danos ao DNA e morte celular induzida por CIS, pode ser um adjuvante capaz de melhorar a resposta imune, como relatado anteriormente para lipídios resorcinólicos⁶⁴.

Ao comparar os efeitos do ZIM associado ao CIS, DOX e CYP, os resultados sugerem que o ZIM interage de maneira diferente com cada um desses quimioterápicos e precisa ser discutido de forma diferente.

Associado à DOX, o ZIM demonstrou efeito quimiopreventivo tanto para danos genômicos (24 e 48 mg/kg) quanto para danos cromossômicos (48 mg/kg). No entanto, o efeito quimiopreventivo é melhor observado para danos primários (genômicos). Esses efeitos são menos expressivos que os observados para a associação com CIS e CYP. Diferentemente do observado para a associação com CIS, o ZIM potencializou a atividade fagocítica quando associado à maior dose de DOX. Esse resultado pode estar relacionado ao menor efeito quimiopreventivo observado nesses tratamentos. Assim, a ZIM, mesmo atuando por desmutagênese e bioantimutagênese, não conseguiu conter o dano induzido pela DOX, o que pode ter favorecido o aumento expressivo da fagocitose esplênica para eliminar mais células circulantes que apresentavam danos ao DNA. Vale ressaltar também que o tratamento apenas com ZIM pode ativar a fagocitose esplênica. Porém, nas duas doses mais baixas da associação, não foi observada ativação de fagocitose. A frequência de morte celular induzida por DOX no fígado e nos rins foi reduzida na presença de ZIM, semelhantemente ao efeito observado na associação com CIS. Assim, esse fato também pode ser decorrente do processo quimiopreventivo da ZIM que reduz a frequência de danos ao DNA e, portanto, reduz a indução de morte celular mediada por esses mesmos danos.

Além disso, o ZIM aumentou a frequência de linfócitos associados à DOX. Este fato também já havia sido descrito para a associação com CIS. Portanto, o ZIM poderia modular a contagem diferencial de células sanguíneas. Apesar do certificado sanitário da colônia animal utilizado neste estudo (Conselho de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil (código do protocolo 966/2018, data de aprovação: 07/08/2018) para estudos envolvendo animais), animais de diferentes grupos experimentais, incluindo o grupo controle, apresentaram frequência aumentada de basófilos e eosinófilos, o que pode sugerir infecção parasitária. Porém, não impacta direta ou negativamente nos resultados de genotoxicidade, que é o objetivo principal deste estudo.

A associação do CYP com o ZIM indicou ausência de quimioprevenção para danos genômicos. No entanto, foi observada quimioprevenção eficaz em danos cromossômicos. Este resultado demonstra semelhança com o observado para a associação com CIS. Portanto, o efeito quimiopreventivo do ZIM contra

os danos causados pelo CYP também deve envolver ações por desmutagênese e bioantimutagênese. Notavelmente, os efeitos antígeno-tóxicos ao nível cromossômico do ZIM em associação com o CYP são comparados aos observados nas associações com CIS e DOX. Nessas associações foram observados os maiores percentuais de redução de danos e até percentuais acima de 100%, o que também indica a prevenção de danos basais (aqueles observados no controle negativo). Essa melhor redução do dano ao DNA pode ter ocorrido justamente nesta associação porque o CYP é um agente genotóxico de ação indireta, o que significa que o CYP precisa ser metabolizado no fígado causando danos ao DNA.

Por outro lado, CIS e DOX têm ação direta, uma vez que não necessitam ser metabolizados para causar danos ao DNA. A necessidade de metabolizar o CYP dá mais tempo para a desmutagênese do ZIM, protegendo o DNA ou inativando o próprio CYP ou seus metabólitos genotóxicos que se formam gradativamente. Também pode fornecer mais tempo para o ZIM modular as enzimas envolvidas no processo de bioantimutagênese. Curiosamente, houve redução na ativação esplênica em todas as associações de ZIM com CYP. Essa redução, baseada na necessidade de fagocitose, pode ser explicada pela menor frequência de células danificadas circulantes, uma vez que o processo quimiopreventivo foi o mais eficiente. Vale ressaltar também que foi observada redução na morte celular apenas no rim. No fígado, a frequência não diminuiu. Acreditamos que isso ocorreu porque os metabólitos do CYP gerados no fígado causam danos imediatos aos hepatócitos. Portanto, os níveis de ZIM no fígado são insuficientes para causar o efeito quimiopreventivo observado no sangue e nos rins. Além disso, observou-se que o ZIM também aumentou a frequência de linfócitos em associação com o CYP. Esse fato sugere que o ZIM pode modular a frequência das células sanguíneas para reduzir um dos efeitos colaterais da quimioterapia, que é a imunossupressão também causada pelo CYP.

O Composto **1** (Figura 2), um derivado de 4-AA e ZIM, apresentou atividade genotóxica induzindo danos genômicos e cromossômicos. Além disso, **1** foi capaz de induzir ativação esplênica com aumento da fagocitose, aumento da morte celular no fígado e nos rins e aumento da frequência de linfócitos¹³. Esses resultados são muito semelhantes ao ZIM. Uma comparação entre suas

estruturas permite inferir que a semelhança em causar danos ao DNA está relacionada a três interações atrativas ($N4-AA-D_{T\text{imina}7}$ [forte] e $HCCH3-DA_{adenina17}$ [moderada]) e uma interação repulsiva ($N4-AA-D_{Aadenina6}$ [forte]) de **1** e três interações atrativas ($HNCH3-DA_{adenosina17}$ [moderada], $HCCH3-DA_{adenosina17}$ [moderada] e $HCCH3-DA_{adenosina18}$ [moderada]) com DNA que fornece uma diferença de energia de apenas -8,48 kcal/ mol (**1** = -111,93 kcal/ mol e ZIM = -119,83 kcal/mol).

O composto **1**, quando associado ao CIS e ao CYP, teve efeito quimiopreventivo e interferiu no mecanismo anticancerígeno dos agentes quimioterápicos, pois reduziu a frequência de danos ao DNA e a frequência de morte celular. Porém, em associação com a DOX, o composto **1**, apesar de sua atividade quimiopreventiva, aumentou a frequência de morte celular¹³. Esse fato é diferente do que encontramos para a ZIM, que, como descrito anteriormente, poderia estar relacionada à desmutagênese e à bioantimutagênese.

Também relatamos um éster (composto **2**, Figura 2), outro derivado de 4-AA e ZIM. Ao contrário de **1** e ZIM, **2** não é genotóxico. Reduz a frequência de danos genômicos basais e não induz danos cromossômicos. Além disso, causa baixa ativação fagocítica. Embora a frequência de morte celular tenha aumentado²⁰. Este fato sugere que a indução da morte de **2** não é mediada por danos no DNA. Pode estar relacionado à capacidade de interagir com o DNA através de 6 interações atrativas, mas não entre as bases de nitrogênio no DNA como **1** e ZIM (ver Figura 9C).

O composto **2**, quando associado ao CIS, DOX e CYP, reduz os efeitos quimioterápicos dessas drogas, pois evita a indução de danos ao DNA e, indiretamente, reduz a taxa de morte celular²⁰, o que também é observado para o ZIM.

5. CONCLUSÕES

Concluindo, o 4-AA, apesar de aumentar a frequência de morte celular quando utilizado isoladamente, mesmo sem aumentar significativamente os danos ao DNA, não é um bom candidato para ser utilizado como agente anticancerígeno. Além disso, a associação do 4-AA com quimioterápicos

comerciais (CIS, DOX e CYP), que causam efeitos anticancerígenos por induzirem danos ao DNA, não é recomendada, uma vez que seu efeito quimiopreventivo reduz a indução de danos no DNA¹⁴. Esses fatos reduzem o efeitos quimioterápicos e, portanto, sua combinação é desencorajada. Também é desencorajado o uso de analgésicos e antitérmicos/antitérmicos, como a dipirona¹⁴.

Quanto ao ZIM, é genotóxico e causa danos genômicos e cromossômicos. Além disso, causa ativação da fagocitose esplênica e aumenta a morte celular no fígado e nos rins. A frequência de danos ao DNA induzidos por ZIM é menor que aquela induzida por CIS, DOX e CYP. No entanto, mantém um nível de morte celular comparável aos induzidos por quimioterápicos comerciais. Portanto, o ZIM é um candidato quimioterápico que pode causar menos efeitos colaterais em células saudáveis, como danos ao DNA. Entretanto, sua associação com CIS, DOX e CYP não é recomendada, uma vez que mantém as características do 4-AA e possui considerável efeito quimiopreventivo. Este efeito quimiopreventivo reduz a frequência de danos no DNA e reduz a frequência de morte celular. Portanto, o ZIM interfere negativamente no efeito anticancerígeno testado pelos quimioterápicos comerciais. O ZIM, assim como o 4-AA, aumenta a frequência de leucócitos, o que é uma condição desejável para organismos expostos a drogas quimioterápicas que podem causar imunossupressão. Contudo, a relação custo-benefício não é favorável. Portanto, não favorecemos a associação do ZIM com CIS, DOX e CYP.

Referências

- (1) Reimers, M. S.; Engels, C. C.; Kuppen, P. J.; van de Velde, C. J.; Liefers, G. J. How does genome sequencing impact surgery? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2014, *11*, 610–618.
- (2) Helleday, T. DNA repair pathways as target for cancer therapy. *Toxicol. Lett.* 2012, *211*, S9.
- (3) Garnock-Jones, K. P.; Keating, G. M.; Scott, L. J. Trastuzumab: A review of its use as adjuvant treatment in human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive early breast cancer. *Drugs* 2010, *70*, 215–239.
- (4) Yoshida, T.; Zhang, G.; Haura, E. B. Targeting epidermal growth factor receptor: central signaling kinase in lung cancer. *Biochem. Pharmacol.* 2010, *80*, 613–623.
- (5) Collins, S. J. Retinoic acid receptors, hematopoiesis and leukemogenesis. *Curr. Opin. Hematol.* 2008, *15*, 346–351.

- (6) Porter, D. C.; Farmaki, E.; Altilia, S.; Schools, G. P.; West, D. K.; Chen, M.; Chang, B. D.; Puzyrev, A. T.; Lim, C. U.; Rokow-Kittell, R.; Friedhoff, L. T.; Papavassiliou, A. G.; Kalurupalle, S.; Hurteau, G.; Shi, J.; Baran, P. S.; Gyorffy, B.; Wentland, M. P.; Broude, E. V.; Kiaris, H.; Roninson, I. B. Cyclin-dependent kinase 8 mediates chemotherapy-induced tumor-promoting paracrine activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012, *109*, 13799–13804.
- (7) Chabner, B. A.; Roberts, T. G., Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2005, *5*, 65–72.
- (8) Vichaya, E. G.; Chiu, G. S.; Krukowski, K.; Lacourt, T. E.; Kavelaars, A.; Dantzer, R.; Heijnen, C. J.; Walker, A. K. Mechanisms of chemotherapy-induced behavioral toxicities. *Front. Neurosci.* 2015, *9*, 131.
- (9) Bouwman, P.; Jonkers, J. The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nat. Rev. Cancer* 2012, *12*, 587–598.
- (10) Bethune, J.; Wieland, F. T. Assembly of COPI and COPII Vesicular Coat Proteins on Membranes. *Annu. Rev. Biophys.* 2018, *47*, 63–83.
- (11) Machado, K. E.; de Oliveira, K. N.; Andreossi, H. M.; Bubniak Ldos, S.; de Moraes, A. C.; Gaspar, P. C.; Andrade Eda, S.; Nunes, R. J.; Santos-Silva, M. C. Apoptotic events induced by maleimides on human acute leukemia cell lines. *Chem. Res. Toxicol.* 2013, *26*, 1904–1916.
- (12) de Oliveira, E. J. T.; Pessatto, L. R.; de Freitas, R. O. N.; Pelizaro, B. I.; Rabacow, A. P. M.; Vani, J. M.; Monreal, A. C. D.; Mantovani, M. S.; de Azevedo, R. B.; Antonioli-Silva, A. C. M. B.; et al. New Bis copper complex ((Z)-4-((4 chlorophenyl) amino)-4-oxobut-2-enoyl) oxy): Cytotoxicity in 4T1 cells and their toxicogenic potential in Swiss mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2018, *356*, 127–138.
- (13) Oliveira, R. J.; da Cruz Leite Santos, N.; Pesarini, J. R.; de Oliveira, B. C.; Berno, C. R.; de Araújo, F. H. S.; da Silveira, I. O. M. F.; Nascimento, R. O.; Brochado Antonioli-Silva, A. C. M.; Duenhas Monreal, A. C.; et al. Assessment of genetic integrity, splenic phagocytosis and cell death potential of (Z)-4-((1, 5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2, 3dihydro-1H-pyrazol-4-yl) amino)-4-oxobut-2-enoic acid and its effect when combined with commercial chemotherapeutics. *Genet. Mol. Biol.* 2018, *41*, 154–166.
- (14) Berno, C. R.; de Toledo Ros, B.; da Silveira, I. O. M. F.; Coelho, H. R.; Antonioli, A. C. M. B.; Beatriz, A.; de Lima, D. P.; Monreal, A. C. D.; Sousa, F. G.; da Silva Gomes, R.; Oliveira, R. J. 4-Aminoantipyrine reduces toxic and genotoxic effects of doxorubicin, cisplatin, and cyclophosphamide in male mice. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2016, *805*, 19–24.
- (15) Cunha, S.; Oliveira, S. M.; Rodrigues, M. T.; Bastos, R. M.; Ferrari, J.; de Oliveira, C. M. A.; Kato, L.; Napolitano, H. B.; Vencato, I.; Lariucci, C. Structural studies of 4-aminoantipyrine derivatives. *J. Mol. Struct.* 2005, *752*, 32–39.
- (16) Mahle, F.; Guimaraes, T. D.; Meira, A. V.; Correa, R.; Cruz, R. C. B.; Cruz, A. B.; Nunes, R. J.; Cechinel, V.; de Campos-Buzzi, F. Synthesis and biological evaluation of N-antipyrine-4-substituted amino-3-chloromaleimide derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 2010, *45*, 4761–4768.
- (17) Jiang, M.; Lu, S.; Zhang, Y. The Potential Organ Involved in Cantharidin Biosynthesis in *Epicauta chinensis* Laporte (Coleoptera: Meloidae). *J. Insect Sci.* 2017, *17*, No. 52.

- (18) Wang, C. C.; Wu, C. H.; Hsieh, K. J.; Yen, K. Y.; Yang, L. L. Cytotoxic effects of cantharidin on the growth of normal and carcinoma cells. *Toxicology* 2000, **147**, 77–87.
- (19) Xie, J.; Zhang, Y.; Hu, X.; Lv, R.; Xiao, D.; Jiang, L.; Bao, Q. Norcantharidin inhibits Wnt signal pathway via promoter demethylation of WIF-1 in human non-small cell lung cancer. *Med. Oncol.* 2015, **32**, No. 145.
- (20) Juliano Oliveira, R.; Pereira, F. P. A. N.; Silveira, I. O. M. F.; Lima, R. V.; Berno, C. R.; Pesarini, J. R.; Antonioli-Silva, A. C. M. B.; Monreal, A. C. D.; Adilson, B.; Lima, D. P.; Gomes, R. D. S. Assessment of the toxicogenic effects and cell death potential of the ester (Z)-methyl 4-((1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)amino)-4-oxobut-2-anoate in combination with cisplatin, cyclophosphamide and doxorubicin. *Genet. Mol. Biol.* 2019, **42**, 399–410.
- (21) da Silveira, I. O.; Moslaves, I. S. B.; Muller, J. A. I.; Hortelan, C. R. W.; Juliano Oliveira, R.; Okuyama, T. T.; Fernandes, J.; Badenoch, B.; Janaina de Campos, L.; Almeida, L. D.; Mohammad, J.; Martins, A. C. F.; Beatriz, A.; da Silva Junior, E. N.; Cristina Toffoli-Kadri, M.; da Silva Gomes, R. Design, synthesis and in vivo evaluation of 1,4-dioxo-2- butenyl aryl amine derivatives as a promising anti-inflammatory drug prototype. *Bioorg. Chem.* 2022, **124**, No. 105754.
- (22) Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988, **175**, 184–191.
- (23) Carvalho, P. C.; Santos, E. A.; Schneider, B. U. C.; Matuo, R.; Pesarini, J. R.; Cunha-Laura, A. L.; Monreal, A. C. D.; Lima, D. P.; Antonioli, A. C. M. B.; Oliveira, R. J. Diaryl sulfide analogs of combretastatin A-4: Toxicogenetic, immunomodulatory and apoptotic evaluations and prospects for use as a new chemotherapeutic drug. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2015, **40**, 715–721.
- (24) Kobayashi, H.; Sugiyama, C.; Morikawa, Y.; Hayaashi, M.; Sofuni, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun.* 1995, **3**, 103–115.
- (25) Hayashi, M.; Morita, T.; Kodama, Y.; Sofuni, T.; Ishidate, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res. Lett.* 1990, **245**, 245–249.
- (26) Rovozzo, G. C.; Burke, C. N. *A Manual of Basic Virological Techniques*; Prentice-Hall: Englewood Cliffs, N.J., 1973.
- (27) Navarro, S. D.; Beatriz, A.; Meza, A.; Pesarini, J. R.; Gomes, R. D. S.; Karaziack, C. B.; Cunha-Laura, A. L.; Monreal, A. C. D.; Romão, W.; Lacerda Júnior, V.; Mauro, M. D. O.; Oliveira, R. J. A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: Evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, **75**, 132–142.
- (28) Manoharan, K.; Banerjee, M. R. β -Carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biol. Int. Rep.* 1985, **9**, 783–789.
- (29) Waters, M. D.; Brady, A. L.; Stack, H. F.; Brockman, H. E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutat. Res., Rev. Genet. Toxicol.* 1990, **238**, 57–85.
- (30) Burley, S. K.; Bhikadiya, C.; Bi, C. X.; Bittrich, S.; Chen, L.; Crichlow, G. V.; Christie, C. H.; Dalenberg, K.; Di Costanzo, L.; Duarte, J. M.; Dutta, S.; Feng, Z.

- K.; Ganesan, S.; Goodsell, D. S.; Ghosh, S.; Green, R. K.; Guranovic, V.; Guzenko, D.; Hudson, B. P.; Lawson, C. L.; Liang, Y. H.; Lowe, R.; Namkoong, H.; Peisach, E.; Persikova, I.; Randle, C.; Rose, A.; Rose, Y.; Sali, A.; Segura, J.; Sekharan, M.; Shao, C. H.; Tao, Y. P.; Voigt, M.; Westbrook, J. D.; Young, J. Y.; Zardecki, C.; Zhuravleva, M. RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. *Nucleic Acids Res.* 2021, 49, D437–D451.
- (31) *Hypercube HyperChem*, hypercubeusa.com.
- (32) *Open Babel software*, <http://openbabel.org> (accessed 01/12/2021).
- (33) Yan, Y. M.; Zhang, D.; Zhou, P.; Li, B. T.; Huang, S. Y. HDock: a web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic Acids Res.* 2017, 45, W365–W373.
- (34) Minchin, S.; Lodge, J. Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays Biochem.* 2019, 63, 433–456.
- (35) Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988, 175, 184–191.
- (36) Yamada, Y. Nucleic Acid Drugs-Current Status, Issues, and Expectations for Exosomes. *Cancers* 2021, 13, 5002.
- (37) Peek, M. E.; Lipscomb, L. A.; Bertrand, J. A.; Gao, Q.; Roques, B. P.; Garbayjaureguiberry, C.; Williams, L. D. DNA Distortion in Bis- Intercalated Complexes. *Biochemistry* 1994, 33, 3794–3800.
- (38) Bischoff, G.; Hoffmann, S. DNA-binding of drugs used in medicinal therapies. *Curr. Med. Chem.* 2002, 9, 321–348.
- (39) Han, X. G.; Gao, X. L. Sequence specific recognition of ligand- DNA complexes studied by NMR. *Curr. Med. Chem.* 2001, 8, 551–581.
- (40) Neidle, S.; Nunn, C. M. Crystal structures of nucleic acids and their drug complexes. *Nat. Prod. Rep.* 1998, 15, 1–15.
- (41) Ren, J. S.; Chaires, J. B. Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands. *J. Inorg. Biochem.* 2003, 96, 82.
- (42) Wemmer, D. E. Designed sequence-specific minor groove ligands. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2000, 29, 439–461.
- (43) Chaires, J. B. Energetics of drug-DNA interactions. *Biopolymers* 1997, 44, 201–215.
- (44) Haq, I.; Ladbury, J. Drug-DNA recognition: energetics and implications for design. *J. Mol. Recognit.* 2000, 13, 188–197.
- (45) Rohs, R.; Bloch, I.; Sklenar, H.; Shakked, Z. Molecular flexibility in ab initio drug docking to DNA: binding-site and binding-mode transitions in all-atom Monte Carlo simulations. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33, 7048–7057.
- (46) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 1995, 9, 532–549.
- (47) Blaser, L. S.; Tramonti, A.; Egger, P.; Haschke, M.; Krahenbuhl, S.; Ratz Bravo, A. E. Hematological safety of metamizole: retrospective analysis of WHO and Swiss spontaneous safety reports. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2015, 71, 209–217.
- (48) Oliveira, R. J.; Navarro, S. D.; de Lima, D. P.; Meza, A.; Pesarini, J. R.; da Silva Gomes, R.; Karaziack, C. B.; de Oliveira Mauro, M.; Cunha- Laura, A. L.; Monreal, A. C. D.; et al. A novel cytosporone 3-Heptyl-4,6-dihydroxy-3 H-

- isobenzofuran-1-one: synthesis; toxicological, apoptotic and immunomodulatory properties; and potentiation of mutagenic damage. *BMC Cancer* 2015, *15*, 1–15.
- (49) Araújo, F. H. S. d.; Figueiredo, D. R. d.; Auharek, S. A.; Pesarini, J. R.; Meza, A.; Gomes, R. d. S.; Monreal, A. C. D.; Antonioli-Silva, A. C. M. B.; Lima, D. P. d.; Kassuya, C. A. L.; et al. In vivo chemotherapeutic insight of a novel isocoumarin (3-hexyl-5, 7-dimethoxy-isochromen-1-one): Genotoxicity, cell death induction, leukometry and phagocytic evaluation. *Genet. Mol. Biol.* 2017, *40*, 665–675.
- (50) Kas'yan, L. I.; Pal'chikov, V. A.; Tarabara, I. N.; Krishchik, I. V.; Kas'yan, A. O.; Shishkina, S. V.; Shishkin, O. V. Products of endic anhydride reaction with cyclic amines and their heterocyclization. *Russ. J. Org. Chem.* 2006, *42*, 1642–1652.
- (51) Basu, A.; Krishnamurthy, S. Cellular Responses to Cisplatin- Induced DNA Damage. *J. Nucleic Acids* 2010, *2010*, 1–16.
- (52) Yimit, A.; Adebali, O.; Sancar, A.; Jiang, Y. C. Differential damage and repair of DNA-adducts induced by anti-cancer drug cisplatin across mouse organs. *Nat. Commun.* 2019, *10*, No. 309.
- (53) Vukovic-Gacic, B.; Simic, D. Identification of natural antimutagens with modulating effects on DNA repair. *Basic Life Sci.* 1993, *61*, 269–277.
- (54) Kada, T.; Shimoi, K. Desmutagens and bio-antimutagens—their modes of action. *BioEssays* 1987, *7*, 113–116.
- (55) Hartman, P. E.; Shankel, D. M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environ. Mol. Mutagen.* 1990, *15*, 145–182.
- (56) Ferguson, L. R. Antimutagens as Cancer Chemopreventive Agents in the Diet. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 1994, *307*, 395–410.
- (57) De Flora, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 1998, *402*, 151–158.
- (58) Oliveira, R. J.; Mantovani, M. S.; Silva, A. F.; Pesarini, J. R.; Mauro, M. O.; Ribeiro, L. R. Compounds used to produce cloned animals are genotoxic and mutagenic in mammalian assays in vitro and in vivo. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2014, *47*, 287–298.
- (59) Oliveira, R. J.; Sasaki, E. S.; Monreal, A. C.; Monreal, M. T.; Pesarini, J. R.; Mauro, M. O.; Matuo, R.; Silva, A. F.; Zobiolo, N. N.; Siqueira, J. M.; Ribeiro, L. R.; Mantovani, M. S. Pre-treatment with glutamine reduces genetic damage due to cancer treatment with cisplatin. *Genet. Mol. Res.* 2013, *12*, 6040–6051.
- (60) Pesarini, J. R.; Victorelli, S. G.; Vicentini, A. P.; Ferreira, L. K.; Mauro, M. O.; Matuo, R.; Oliveira, J. R.; Antonioli, A. C. M. B.; Mantovani, M. S.; Oliveira, R. J. Antigenotoxic and antimutagenic effects of glutamine supplementation on mice treated with cisplatin. *Genet. Mol. Res.* 2014, *13*, 4820–4830.
- (61) Navarro, S. D.; Mauro, M. O.; Pesarini, J. R.; Ogo, F. M.; Oliveira, R. J. Resistant starch: a functional food that prevents DNA damage and chemical carcinogenesis. *Genet. Mol. Res.* 2015, *14*, 1679–1691.
- (62) Zamay, T. N.; Kolovskaya, O. S.; Zamay, G. S.; Borodina, N. A. Effects of cisplatin on lymphocyte structure and functions in mice with ehrlich ascitic carcinoma. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011, *151*, 62–65.
- (63) Merritt, R. E.; Mahtabifard, A.; Yamada, R. E.; Crystal, R. G.; Korst, R. J. Cisplatin augments cytotoxic T-lymphocyte-mediated antitumor immunity in poorly immunogenic murine lung cancer. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2003, *126*, 1609–1617.

(64) Navarro, S. D.; Beatriz, A.; Meza, A.; Pesarini, J. R.; da Silva Gomes, R.; Karaziack, C. B.; Cunha-Laura, A. L.; Monreal, A. C. D.; Romão, W.; Júnior, V. L.; et al. A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, 75, 132–142.

4.2 Artigo 2



Article

3-Heptylidene-4,6-Dimethoxy-3*H*-Isobenzofuran-1-One Is Genotoxic, Increases the Frequency of Cell Death, and Potentiates the Effects of Cyclophosphamide and Cisplatin

Silvia Cordeiro das Neves ^{1,2} , Flavio Henrique de Araújo ¹, Willian Ayala Correa ³, Allana Cristina Faustino Martins ⁴ , Henrique Rodrigues Scherer Coelho ¹ , Marcelo Luiz Brandão Vilela ⁵, Valter Aragão do Nascimento ², Candida Aparecida Leite Kassuya ⁶ , Dênis Pires de Lima ³ , Adilson Beatriz ³ , Rodrigo Juliano Oliveira ^{1,2,*} and Roberto da Silva Gomes ^{4,*}

¹ Stem Cell, Cell Therapy and Toxicological Genetics Research Centre (CeTroGen), Medical School, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79080-190, MS, Brazil

² Graduate Programme in Health and Development in the Midwest Region, Medical School, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, MS, Brazil

³ Institute of Chemistry, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, MS, Brazil

⁴ Department of Pharmaceutical Sciences, North Dakota State University, Fargo, ND 58102, USA

⁵ Medical School, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, MS, Brazil

⁶ School of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados 79070-900, MS, Brazil

* Correspondence: rodrigo.oliveira@ufms.br (R.J.O.); roberto.gomes@ndsu.edu (R.d.S.G.)

3-Heptilideno-4,6-Dimetoxi-3H-Isobenzofuran-1-One é Genotóxico, aumenta a frequência de morte celular e Potencializa os Efeitos da Ciclofosfamida e da Cisplatina

Silvia Cordeiro das Neves^{1,2}, Flavio Henrique de Araújo¹, Willian Ayala Correa³, Allana Cristina Faustino Martins⁴, Henrique Rodrigues Scherer Coelho¹, Marcelo Luiz Brandão Vilela⁵, Valter Aragão do Nascimento², Candida Aparecida Leite Kassuya⁶, Dênis Pires de Lima³, Adilson Beatriz³, Rodrigo Juliano Oliveira^{1,2*} and Roberto da Silva Gomes⁴

¹Stem Cell, Cell Therapy and Toxicological Genetics Research Centre (CeTroGen), Medical School, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 79080-190, Brazil.

²Graduate Programme in Health and Development in the Midwest Region, Medical School, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 79070-900, Brazil.

³Institute of Chemistry, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 79070-900, MS, Brazil.

⁴Department of Pharmaceutical Sciences, North Dakota State University, Fargo, North Dakota, 58102, United States.

⁵Medical School, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 79070-900, Brazil.

⁶School of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil

Resumo: 3-heptilideno-4,6-dimetoxi-3H-isobenzofuran-1-ona (Phthalide **1**) é o precursor de três lipídios resorcinol que têm sido descritos como potenciais agentes quimioterápicos e capazes de potencializando os efeitos da ciclofosfamida. Neste estudo, avaliamos o potencial genotóxico, o potencial de morte celular e as interações com ciclofosfamida e cisplatina da Phthalide **1**. Doze grupos foram criados a partir de 120 camundongos: Controle Negativo, ciclofosfamida (100 mg/kg), cisplatina (6 mg/kg), Phthalide **1** (5, 10 e 20 mg/kg) e associações de **1** com ciclofosfamida e **1** com cisplatina. Os resultados demonstram que **1** aumenta ($p < 0,05$) a frequência de dano cromossômico, morte celular hepática e renal e fagocitose esplênica. A associação de **1** com ciclofosfamida e cisplatina demonstrou efeito quimiopreventivo e, portanto, redução ($p < 0,05$) na frequência de danos cromossômicos. No entanto, a morte celular e a fagocitose esplênica não sofreram variações significativas. Como resultado do exposto, **1** tem aplicação quimioterápica potencial e pode ser um candidato para o desenvolvimento de uma nova geração de quimioterápicos. Além disso, tem características para ser utilizado como adjuvante quimioterápico em associação com ciclofosfamida e cisplatina, pois aumenta a frequência de morte celular induzida pela quimioterapia. Também relatamos que o efeito quimiopreventivo de **1**, em associação com ciclofosfamida e cisplatina, pode prevenir efeitos adversos (indução de dano ao DNA em células não tumorais) sem interferir no modo de ação das drogas quimioterápicas e, portanto, sem reduzir a indução de morte celular.

Palavras-chave: Phthalide **1**; *in vivo*; toxicologia; dano cromossômico

1. Introdução

Os lipídios resorcinólicos, como os citosporonas e seus precursores, podem interagir com as bicamadas fosfolipídicas [1], ajudar na formação de lipossomas [2], promover proteção contra o estresse oxidativo [3] e inibir o crescimento bacteriano [1,2] e tumor células [4]. Além disso, o lipídio resorcinol citosporona B induziu a apoptose em células tumorais por meio da interação com o receptor nuclear órfão Nur77 [2,4]. Este fato levou diferentes grupos de pesquisa a se dedicarem a descrever os possíveis efeitos quimioterápicos de precursores e citosporonas.

Identificamos um precursor da citosporona sintética chamado 3-heptil-3,4,6-trimetoxi-3H-isobenzofuran-1-ona (AMS35AA, Figura 1) como potencial agente quimioterápico. AMS35AA mostrou a capacidade de aumentar a frequência de morte celular em nódulos hepáticos e renais enquanto promove a ativação da fagocitose no baço, mesmo na ausência da indução de dano genotóxico. Este fato também nos permitiu sugerir que o AMS35AA pode ser o protótipo da quimioterapia mais seletiva, uma vez que não induz danos ao DNA [5]. Navarro et al. [2] relataram o efeito anticancerígeno deste composto em um modelo de melanoma induzido por B16F10 em camundongos BC57BL/6. Este estudo demonstrou uma redução de até 4,59× no peso do tumor [2].

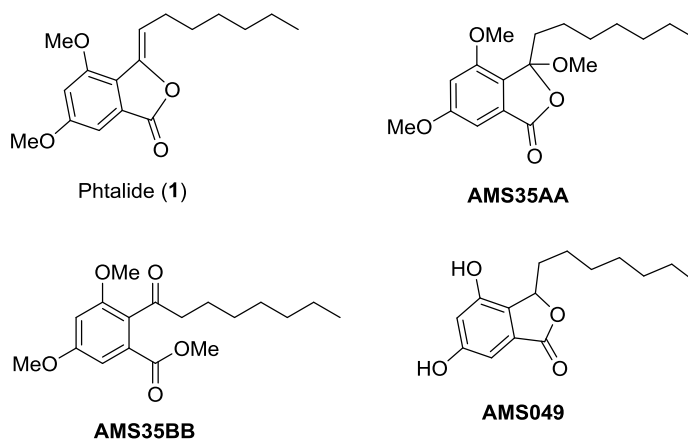


Figura 1. Estruturas químicas dos análogos do citosporona.

A literatura também descreveu os efeitos da citosporona 3-Heptil-4,6-dihidroxi-3H-isobenzofuran-1-ona (AMS049, Figura 1) [6]. Os autores sugeriram que o AMS049 também é um candidato para o desenvolvimento de quimioterapia. No entanto, ao contrário do AMS35AA, esse composto induziu danos genômicos e aumentou a frequência de cometas. No entanto, manteve uma boa capacidade de induzir a morte celular no fígado e nos rins [6].

Também demonstramos que o éster metílico do ácido 3,5-dimetoxi-2-octanoil-benzóico (AMS35BB, Figura 1) é um candidato eficiente para o desenvolvimento de um medicamento quimioterápico. O AMS35BB também aumentou a frequência de morte celular e causou danos genômicos, ao contrário do AMS35AA, que é semelhante ao descrito para o AMS049.

Para identificar novos agentes quimioterápicos potenciais para o câncer e explicar os efeitos das citosporonas e seus precursores no DNA, dedicamos nossos esforços de pesquisa ao estudo do efeito dessa classe de compostos. Assim, sugerimos que AMS35AA, AMS35BB e AMS049 são bons candidatos para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos. No entanto, apesar das semelhanças estruturais desses compostos, não observamos um padrão nas respostas biológicas. Também não identificamos diferenças estruturais que pudessem explicar variações nas respostas biológicas.

Para produzir esses três compostos, começamos com o ácido 3,5-dimetoxibenzóico disponível comercialmente e, por acetilação em uma etapa, **1** foi alcançado (Figura 1). Um processo de metoxilação criou AMS35AA e AMS35BB, e através de hidrogenação subsequente seguida de desmetilação, AMS049 foi obtido. Assim, para elucidar as respostas biológicas já descritas para esses três compostos,

optamos por avaliar **1** (3-heptilideno-4,6-dimetoxi-3-H-isobenzofuran-1-ona), que é o precursor comum. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos genotóxicos e a capacidade de causar morte celular de **1** isoladamente ou em associação com ciclofosfamida e cisplatina.

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar os efeitos genotóxicos e a capacidade de induzir morte celular do composto **1** e seus efeitos em associação com ciclofosfamida e cisplatina.

2. Resultados

Os animais experimentais iniciaram o experimento com pesos semelhantes ($p > 0,05$), mantidos no peso final. O peso inicial médio variou de $31,00 \pm 0,75$ a $32,90 \pm 0,63$ e o peso final de $29,70 \pm 0,57$ a $32,70 \pm 0,36$ (Figura 2 A, tabela 1).

A avaliação dos pesos dos órgãos não mostrou diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais para coração, pulmão, fígado e rins. No entanto, houve um aumento ($p < 0,05$) no peso do baço em todos os grupos que receberam **1** independentemente da dose (Figura 2B, tabela 2).

Tabela 1 – Média $\pm$ erro padrão do peso inicial e peso final de camundongos Swiss, tratados com diferentes doses de **1**.

Grupos experimentais	Peso inicial	Peso final
Controle	$31,00 \pm 0,75^a$	$30,90 \pm 0,97^a$
1 5 mg/kg	$32,90 \pm 0,63^a$	$32,40 \pm 0,75^a$
1 10 mg/kg	$31,60 \pm 1,10^a$	$31,30 \pm 0,95^a$
1 20 mg/kg	$32,70 \pm 0,36^a$	$32,70 \pm 0,36^a$
Ciclofosfamida (CYP)	$31,80 \pm 0,82^a$	$30,90 \pm 0,47^a$
CYP + 1 5 mg/kg	$32,90 \pm 0,68^a$	$32,20 \pm 0,83^a$
CYP + 1 10 mg/kg	$32,90 \pm 0,89^a$	$32,20 \pm 0,77^a$
CYP + 1 20 mg/kg	$32,40 \pm 0,95^a$	$32,00 \pm 1,07^a$
Cisplatin (CIS)	$31,50 \pm 0,74^a$	$30,20 \pm 0,84^a$
CIS + 1 5 mg/kg	$31,70 \pm 1,12^a$	$30,20 \pm 1,12^a$
CIS + 1 10 mg/kg	$31,40 \pm 0,69^a$	$29,70 \pm 0,57^a$
CIS + 1 20 mg/kg	$31,80 \pm 0,82^a$	$30,60 \pm 0,76^a$

Controle negativo—DMSO1%; ciclofosfamida — 100 mg/kg b.w., i.p.; cisplatina—6mg/kg, b.w., i.p. **1**—Phthalide **1** nas doses 5, 10, 20 mg/kg b.w., i.p. CYP + **1**-ciclofosfamida - 100 mg/kg (p.b.; i.p.) + **1** nas doses 5, 10, 20 mg/kg (b.w., i.p.); CIS + **1**-cisplatina—6 mg/kg (p.c.; i.p.) + **1** nas doses 5, 10, 20 mg/kg (p.c., i.p.). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. Teste estatístico: ANOVA/Tukey.

Tabela 2 – Média $\pm$ erro padrão dos pesos absolutos dos órgãos de camundongos Swiss, coletados após o período experimental.

Grupos Experimentais	Coração	Pulmão	Fígado	Rins	Baço
Controle	0,184 ± 0,009 ^a	0,187 ± 0,009 ^a	1.749 ± 0,039 ^a	0,472 ± 0,017 ^a	0,142 ± 0,010 ^a
1 5 mg/kg	0,179 ± 0,010 ^a	0,190 ± 0,007 ^a	1.772 ± 0,042 ^a	0,480 ± 0,017 ^a	0,234 ± 0,018 ^b
1 10 mg/kg	0,188 ± 0,010 ^a	0,189 ± 0,008 ^a	1.773 ± 0,038 ^a	0,479 ± 0,019 ^a	0,230 ± 0,015 ^b
1 20 mg/kg	0,187 ± 0,010 ^a	0,192 ± 0,009 ^a	1.772 ± 0,038 ^a	0,475 ± 0,017 ^a	0,231 ± 0,018 ^b
Ciclofosfamida (CYP)	0,186 ± 0,007 ^a	0,192 ± 0,012 ^a	1.754 ± 0,042 ^a	0,478 ± 0,017 ^a	0,191 ± 0,008 ^{a,b}
CYP + 1 5 mg/kg	0,187 ± 0,006 ^a	0,193 ± 0,009 ^a	1.757 ± 0,052 ^a	0,476 ± 0,017 ^a	0,208 ± 0,012 ^b
CYP + 1 10 mg/kg	0,184 ± 0,008 ^a	0,195 ± 0,012 ^a	1.751 ± 0,049 ^a	0,478 ± 0,015 ^a	0,204 ± 0,000 ^b
CYP + 1 20 mg/kg	0,186 ± 0,011 ^a	0,192 ± 0,010 ^a	1.752 ± 0,050 ^a	0,481 ± 0,020 ^a	0,209 ± 0,010 ^b
Cisplatina (CIS)	0,184 ± 0,006 ^a	0,196 ± 0,009 ^a	1.752 ± 0,044 ^a	0,479 ± 0,016 ^a	0,196 ± 0,008 ^{a,b}
CIS + 1 5 mg/kg	0,186 ± 0,010 ^a	0,197 ± 0,012 ^a	1.756 ± 0,051 ^a	0,477 ± 0,014 ^a	0,202 ± 0,012 ^b
CIS + 1 10mg/kg	0,187 ± 0,007 ^a	0,199 ± 0,010 ^a	1.754 ± 0,047 ^a	0,479 ± 0,017 ^a	0,203 ± 0,010 ^b
CIS + 1 20mg/kg	0,188 ± 0,006 ^a	0,195 ± 0,011 ^a	1.753 ± 0,055 ^a	0,476 ± 0,022 ^a	0,200 ± 0,005 ^b

Controle negativo—DMSO 1%; ciclofosfamida — 100 mg/kg b.w., i.p.; cisplatina—6 mg/kg, b.w., ip. 1- nas doses 5, 10, 20 mg/kg b.w., i.p. CYP + 1-ciclofosfamida — 100 mg/kg (p.b.; i.p.) + 1 nas doses 5, 10, 20 mg/kg (p.b., i.p.); CIS + 1-cisplatina—6 mg/kg (p.c.; i.p.) + 1 nas doses 5, 10, 20 mg/kg (p.c., i.p.). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. Teste estatístico: ANOVA/Tukey.

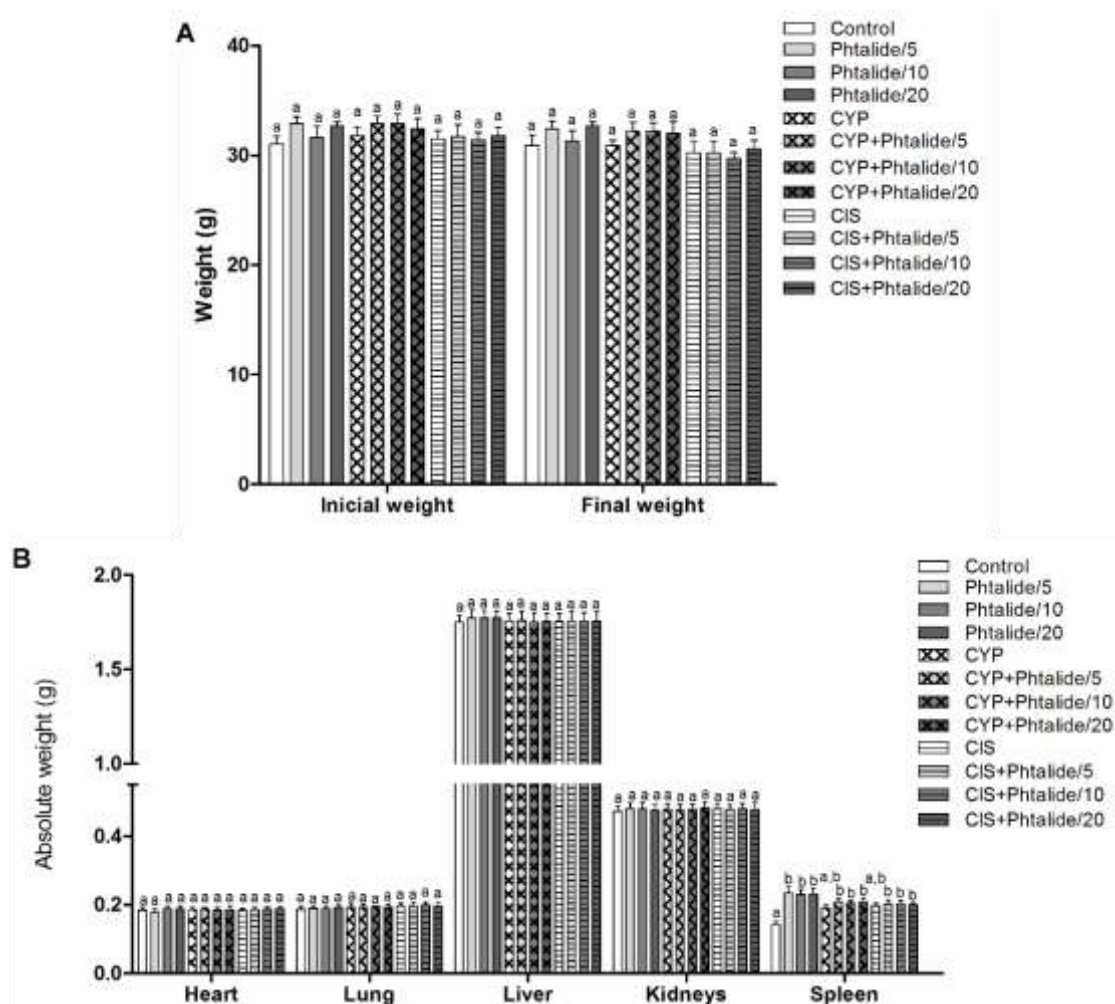


Figura 2. Parâmetros biométricos de camundongos tratados com Phthalide 1. (A) Peso inicial e final; (B) Peso absoluto dos órgãos: coração, pulmão, rins, fígado e baço. Legenda: g: Grama; CYP: Ciclofosfamida; CIS: Cisplatina; Phthalide 1: 3-Heptilideno-4,6-dimetoxi-3H-isobenzofuran-1-ona; Phthalide 1/5—5 mg/kg; Phthalide 1/10—10 mg/kg; Phthalide 1/20—20 mg/kg. Os resultados são apresentados como média ± EPM. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste estatístico: ANOVA/Tukey, $p < 0,05$).

O ensaio do micronúcleo demonstrou que a ciclofosfamida e a cisplatina foram eficientes em causar danos ao DNA, e a frequência de células lesadas aumentou em 12,26 – 16,44x e 11,11 – 15,06x para a ciclofosfamida e a cisplatina, respectivamente (Figura 3A,B, tabela 3).

A Phthalide 1 foi genotóxica em todas as doses testadas ($p < 0,05$). A dose de 5 mg/kg causou um aumento na frequência do micronúcleo em 4,36x, 4,72x e 5,04x por 24, 48 e 72 h, respectivamente. A dose de 10 mg/kg aumentou a frequência de micronúcleos em 4,46x, 4,79x e 5,09x por 24, 48 e 72 horas, respectivamente. A dose de 20 mg/kg causou aumento de 4,47x, 4,88x e 5,21x para os mesmos tempos, respectivamente (Figura 3A).

A associação de 1 com ciclofosfamida demonstrou efeito quimiopreventivo, pois reduziu ($p < 0,05$) a frequência de dano ao DNA (Figura 3A). As porcentagens de redução de dano variaram de 41,22 a 43,27%. Não houve diferenças significativas entre as doses testadas. (Figura 3C).

A associação de 1 e cisplatina também demonstrou efeito quimiopreventivo e, portanto, redução significativa ($p < 0,05$) na frequência de dano ao DNA (Figura 3B). As porcentagens de redução de dano variaram de 21,08 a 29,50% (Figura 3D).

Tabela 3. Frequência média $\pm$ erro padrão da média e percentual de redução de dano referente a ensaios de micronúcleos em sangue periférico de camundongos Swiss (machos).

Grupos Experimentais	Frequência de micronúcleos			Porcentagem de redução de dano		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Experimento 1						
Controle	8,40 $\pm$ 0,30 ^a	7,50 $\pm$ 0,27 ^a	6,80 $\pm$ 0,20 ^a	-	-	-
Ciclofosfamida (CYP)	103,00 $\pm$ 1,00 ^d	110,80 $\pm$ 0,97 ^d	111,80 $\pm$ 1,08 ^d	-	-	-
1 5 mg/kg	36,60 $\pm$ 0,54 ^b	35,40 $\pm$ 0,67 ^b	34,30 $\pm$ 0,67 ^b	-	-	-
1 10 mg/kg	37,50 $\pm$ 0,63 ^b	35,90 $\pm$ 0,69 ^b	34,60 $\pm$ 0,50 ^b	-	-	-
1 20 mg/kg	37,60 $\pm$ 0,45 ^b	36,60 $\pm$ 0,45 ^b	35,40 $\pm$ 0,67 ^b	-	-	-
CYP + 1 5 mg/kg	64,80 $\pm$ 0,59 ^c	66,70 $\pm$ 1,29 ^c	66,90 $\pm$ 1,28 ^c	41,43	42,69	42,76
CYP + 1 10 mg/kg	63,80 $\pm$ 0,78 ^c	66,10 $\pm$ 0,50 ^c	66,40 $\pm$ 0,47 ^c	41,22	43,27	43,23
CYP + 1 20 mg/kg	64,00 $\pm$ 1,23 ^c	67,80 $\pm$ 0,61 ^c	67,00 $\pm$ 0,80 ^c	41,22	41,62	42,66
Experimento 2						
Controle	8,40 $\pm$ 0,30 ^a	7,50 $\pm$ 0,27 ^a	6,80 $\pm$ 0,20 ^a	-	-	-
Cisplatina (CIS)	93,30 $\pm$ 0,84 ^d	103,10 $\pm$ 1,24 ^d	102,40 $\pm$ 1,08 ^d	-	-	-
1 5 mg/kg	36,60 $\pm$ 0,54 ^b	35,40 $\pm$ 0,67 ^b	34,30 $\pm$ 0,67 ^b	-	-	-
1 10 mg/kg	37,50 $\pm$ 0,63 ^b	35,90 $\pm$ 0,69 ^b	34,60 $\pm$ 0,50 ^b	-	-	-
1 20 mg/kg	37,60 $\pm$ 0,45 ^b	36,60 $\pm$ 0,45 ^b	35,40 $\pm$ 0,67 ^b	-	-	-
CIS + 1 5 mg/kg	75,10 $\pm$ 0,70 ^c	74,90 $\pm$ 0,65 ^c	74,10 $\pm$ 0,38 ^c	21,44	29,50	29,60
CIS + 1 10 mg/kg	74,10 $\pm$ 0,31 ^c	75,00 $\pm$ 0,74 ^c	74,20 $\pm$ 0,61 ^c	22,61	29,39	29,50
CIS + 1 20 mg/kg	75,40 $\pm$ 0,45 ^c	75,20 $\pm$ 0,94 ^c	75,10 $\pm$ 0,38 ^c	21,08	29,18	28,56

Controle negativo—DMSO 1%; ciclofosfamida — 100 mg/kg b.w., i.p.; cisplatina—6 mg/kg, b.w., ip. 1-1 nas doses 5, 10, 20 mg/kg b.w., i.p. CYP + 1-ciclofosfamida — 100 mg/kg (p.p.; i.p.) + 1 nas doses 5, 10, 20 mg/kg (p.p., i.p.); CIS + 1-cisplatina—6 mg/kg (p.c.; i.p.) + 1 nas doses 5, 10, 20 mg/kg (p.c., i.p.). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. Teste estatístico: ANOVA/Tukey.

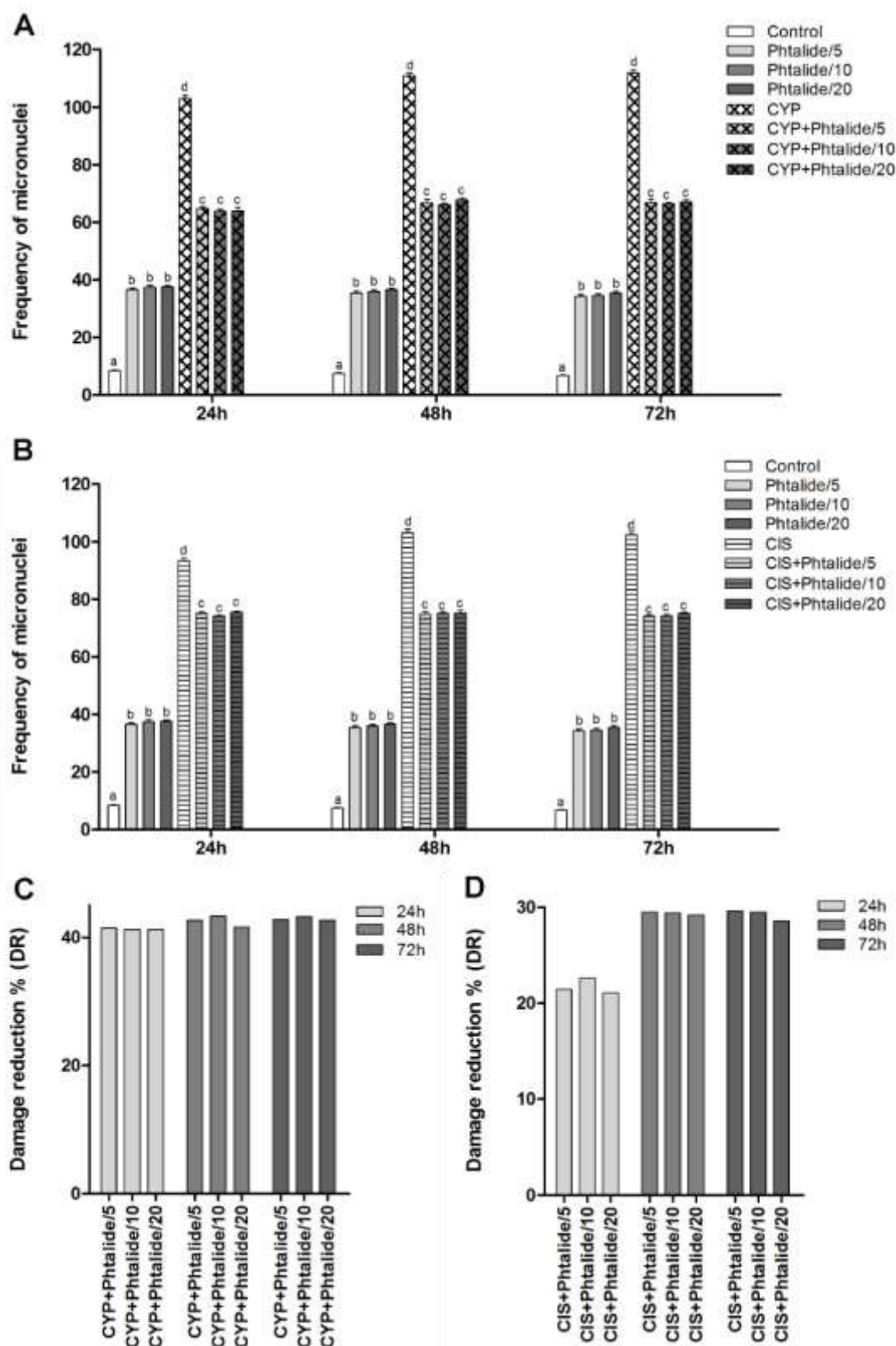


Figura 3. Frequência de micronúcleos e porcentagem de redução de dano em diferentes grupos experimentais. (A) Avaliação da genotoxicidade: Lesões cromossômicas nos compostos testados com 1 e 1 com ciclofosfamida; (B) Avaliação da genotoxicidade: Lesões cromossômicas nos compostos testados com 1 e 1 associado à cisplatina; (C) Porcentagem de redução de dano de 1 associado à ciclofosfamida; (D) Porcentagem de 1 redução de dano associada à cisplatina. Legenda: g: Grama; CYP: Ciclofosfamida; CIS: Cisplatina; Phthalide 1: 3-heptilideno-4,6-dimetoxi-3H-isobenzofuran-1-ona; 1/5–5 mg/kg; 1/10–10

mg/kg; 1/20–20 mg/kg. Os resultados são apresentados como Média±EPM. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste estatístico: ANOVA/Tukey, $p < 0,05$).

O ensaio de fagocitose esplênica indicou que a ciclofosfamida e a cisplatina aumentaram ($p < 0,05$) a fagocitose do esplendor em $1,26\times$ e $1,15\times$, respectivamente (Figura 4 A, B).

A Phthalide **1** também aumentou a frequência de fagocitose em $1,69\times$, $1,68\times$ e $1,68\times$ nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg (Figura 4 A, tabela 4).

A associação de **1** com ciclofosfamida e cisplatina não reduziu a frequência de fagocitose, comumente induzida por esses quimioterápicos (Figura 4 A, B).

Tabela 04. Valor absoluto, erro padrão médio e percentual referente ao ensaio de fagocitose esplênica em camundongos Swiss.

Grupos Experimentais	Total de células analisadas	Total de células sem evidencia de fagocitose			Total de células com evidencia de fagocitose		
		V.A	Média±EP	Porcentagem	V.A	Média±EP	Porcentagem
Experimento 1 (CYP)							
Controle	1000	502	50,20±0,64 ^c	50,2	498	49,80±0,64 ^a	49,8
Ciclofosfamida (CYP)	1000	370	37,00±0,71 ^b	37,0	630	63,00±0,71 ^b	63,0
1 5 mg/kg	1000	158	15,80±1,40 ^a	15,8	842	84,20±1,40 ^c	84,2
1 10 mg/kg	1000	165	16,50±0,80 ^a	16,5	835	83,50±0,80 ^c	83,5
1 20 mg/kg	1000	164	16,40±0,62 ^a	16,4	836	83,60±0,62 ^c	83,6
CYP + 1 5 mg/kg	1000	374	37,40±0,72 ^b	37,4	626	62,60±0,72 ^b	62,6
CYP + 1 10 mg/kg	1000	363	36,30±0,70 ^b	36,3	637	63,70±0,70 ^b	63,7
CYP + 1 20 mg/kg	1000	367	36,70±0,96 ^b	36,7	633	63,30±0,96 ^b	63,3
Experimento 2 (CIS)							
Controle	1000	502	50,20±0,64 ^c	50,2	498	49,80±0,64 ^a	49,8
Cisplatin (CIS)	1000	428	42,80±01,00 ^b	42,8	572	57,20±1,00 ^b	57,2
1 5 mg/kg	1000	158	15,80±1,40 ^a	15,8	842	84,20±1,40 ^c	84,2
1 10 mg/kg	1000	165	16,50±0,80 ^a	16,5	835	83,50±0,80 ^c	83,5
1 20 mg/kg	1000	164	16,40±0,62 ^a	16,4	836	83,60±0,62 ^c	83,6
CIS + 1 5 mg/kg	1000	424	42,40±1,01 ^b	42,4	576	57,60±1,01 ^b	57,6
CIS + 1 10 mg/kg	1000	420	42,00±0,40 ^b	42,0	580	58,00±0,40 ^b	58,0
CIS + 1 20 mg/kg	1000	419	41,90±0,38 ^b	41,9	581	58,10±0,38 ^b	58,1

Controle negativo—DMSO 1%; ciclofosfamida — 100 mg/kg b.w., i.p.; cisplatina—6 mg/kg, b.w., i.p. **1** nas doses 5, 10, 20 mg/kg b.w., i.p. CYP + **1**-ciclofosfamida — 100 mg/kg (p.p.; i.p.) + **1** nas doses 5, 10, 20 mg/kg (p.p., i.p.); CIS + **1**-cisplatina—6 mg/kg (p.c.; i.p.) + **1** nas doses 5, 10, 20 mg/kg (p.c., i.p.).
 Legenda: V.A.—Valor absoluto. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. Teste estatístico: ANOVA/Tukey.

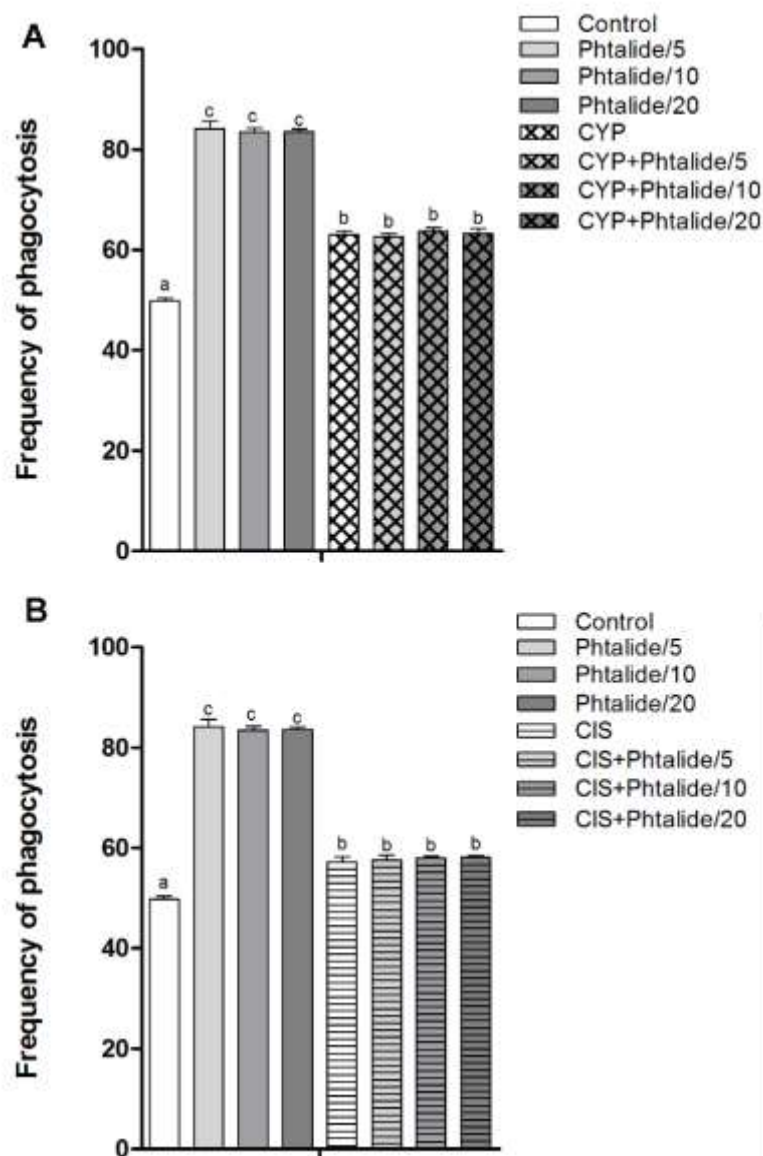


Figura 4. Frequência da fagocitose esplênica. (A) Fagocitose esplênica nos grupos tratados com 1 e 1 associado à ciclofosfamida; (B) fagocitose esplênica nos grupos tratados com 1 e 1 associado à cisplatina. Legenda: g: Grama; CYP: Ciclofosfamida; CIS: Cisplatina; 1: 3-Heptilideno-4,6-dimetoxi-3H-isobenzofuran-1-ona; 1/5–5 mg/kg; 1/10–10 mg/kg; 1/20–20 mg/kg. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste estatístico: ANOVA/Tukey, $p < 0,05$).

O ensaio de morte celular indicou que a ciclofosfamida e a cisplatina aumentaram ($p < 0,05$) a frequência de morte celular no fígado e nos rins. A ciclofosfamida aumentou a frequência no fígado e no rim em 2,99 $\times$ e 1,97 $\times$, respectivamente (Figura 5A). A cisplatina aumentou 2,54 $\times$ e 1,91 $\times$ para os mesmos órgãos, respectivamente (Figura 5B).

A Phthalide 1 aumentou ($p < 0,05$) a frequência de morte celular no fígado e nos rins. O aumento no fígado foi de 1,99 $\times$, 2,02 $\times$ e 2,05 $\times$ para as doses de 5, 10 e 20 mg/kg, respectivamente (Figura 3A). Nos rins, os aumentos foram de 13,2 $\times$, 1,34 $\times$ e 1,35 $\times$ para as mesmas doses, respectivamente (Figura 5 A, tabela 5).

A associação de **1** com ciclofosfamida e cisplatina não reduziu ($p > 0,05$) a frequência de morte celular no fígado e rins induzida por esses quimioterápicos (Figura 5 A, B).

Tabela 05 - Valor absoluto, erro padrão médio de células hepáticas e renais em apoptose, camundongos Swiss (machos), tratados com diferentes doses de **1**, associado a ciclofosfamida e cisplatina.

Grupos Experimentais	Total de células analisadas	Total de células em Apoptose no fígado			Total de células em Apoptose nos rins		
		V.A	Média±EP	Porcentagem	V.A.	Média±EP	Porcentagem
Experimento 1 (CYP)							
Controle	1000	118	11,80±0,88 ^a	11,8		15,50±0,69 ^a	15,5
Ciclofosfamida (CYP)	1000	353	35,30±0,93 ^c	35,3		30,50±0,56 ^c	30,5
1 5 mg/kg	1000	235	23,50±0,99 ^b	23,5		20,40±0,43 ^b	20,4
1 10 mg/kg	1000	238	23,80±0,75 ^b	23,8		20,80±0,66 ^b	20,8
1 20 mg/kg	1000	242	24,20±1,33 ^b	24,2		20,90±0,61 ^b	20,9
CYP + 1 5 mg/kg	1000	351	35,10±0,91 ^c	35,1		31,10±0,86 ^c	31,1
CYP + 1 10 mg/kg	1000	356	35,60±0,99 ^c	35,6		31,50±0,49 ^c	31,5
CYP + 1 20 mg/kg	1000	342	34,20±0,94 ^c	34,2		32,30±1,28 ^c	32,3
Experimento 2 (CIS)							
Controle	1000	118	11,80±0,88 ^a	11,8	155	15,50±0,69 ^a	15,5
Cisplatina (CIS)	1000	300	30,00±0,57 ^c	30,0	296	29,60±0,65 ^c	29,6
1 5mg/kg	1000	235	23,50±0,99 ^b	23,5	204	20,40±0,43 ^b	20,4
1 10mg/kg	1000	238	23,80±0,75 ^b	23,8	209	20,90±0,61 ^b	20,9
1 20mg/kg	1000	242	24,20±1,33 ^b	24,2	208	20,80±0,66 ^b	20,8
CIS + 1 5mg/kg	1000	301	30,10±0,61 ^c	30,1	299	29,90±0,39 ^c	29,9
CIS + 1 10mg/kg	1000	311	31,10±0,55 ^c	31,1	296	29,60±0,47 ^c	29,6
CIS + 1 20mg/kg	1000	305	30,50±0,56 ^c	30,5	291	29,10±0,66 ^c	29,1

Controle negativo—DMSO 1%; ciclofosfamida - 100 mg/kg b.w., i.p.; cisplatina - 6 mg/kg, b.w., ip. 1-1 em doses 5, 10, 20 mg/kg b.w., i.p. CYP + 1 ciclofosfamida -100 mg/kg (p.b.; i.p.) + 1 nas doses 5, 10, 20 mg/kg (p.b.,i.p.); CIS + 1-cisplatina - 6 mg/kg (p.c.; i.p.) + 1 nas doses 5, 10, 20 mg/kg (p.c., i.p.). Legenda: V.A. - Valor absoluto. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. Teste estatístico: ANOVA/Tukey.

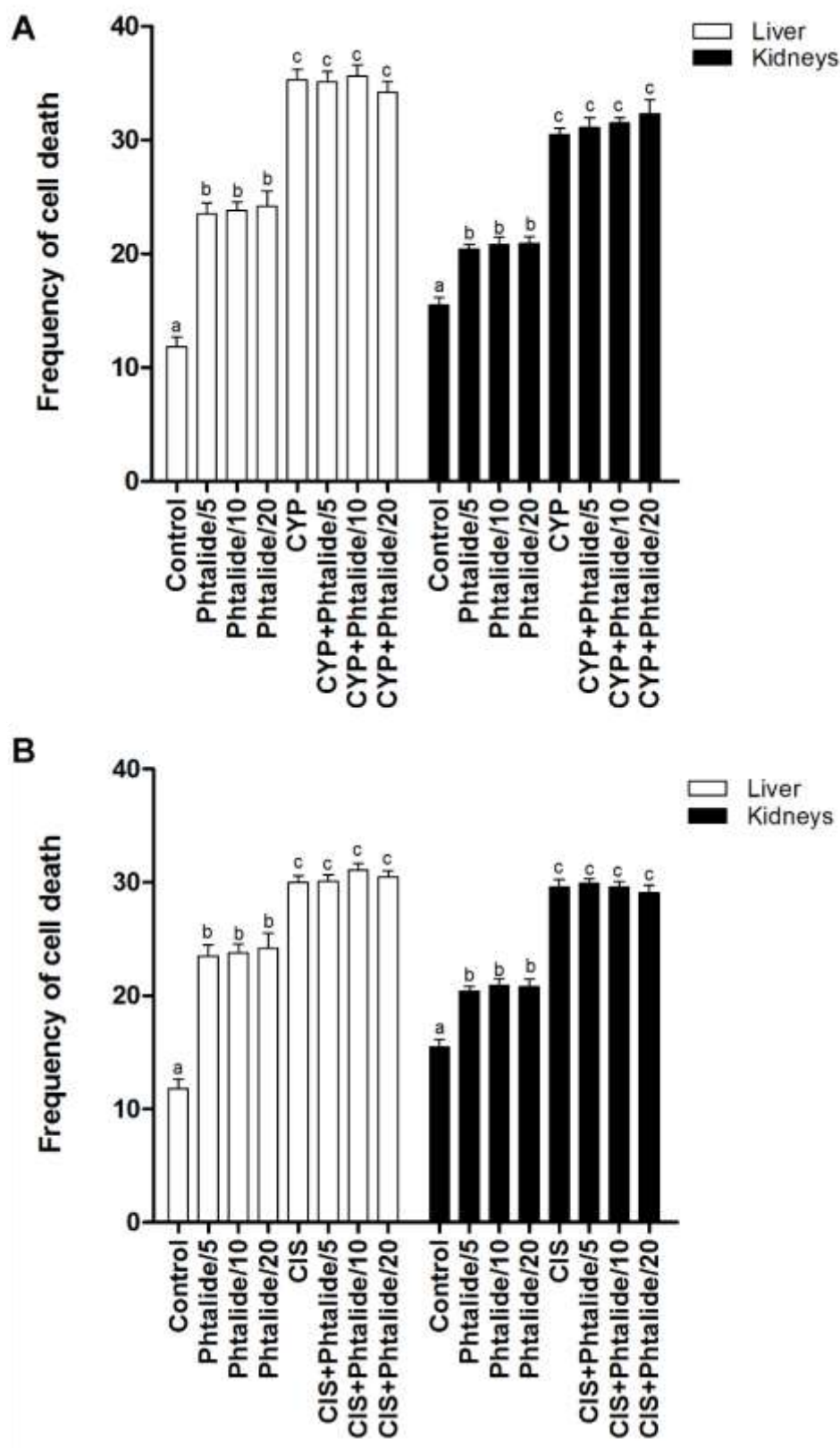


Figura 5. Frequência de morte celular. (A) Avaliação da morte celular nos grupos tratados com **1** e **1** associado à ciclofosfamida; (B) avaliação da morte celular nos grupos tratados com **1** e **1** associado à cisplatina. Legenda: g: Grama; CYP: Ciclofosfamida; CIS: Cisplatina; **1**: 3-Heptilideno-4,6-dimetoxi-3H-isobenzofuran-1-ona; 1/5–5 mg/kg; 1/10–10 mg/kg; 1/20–20 mg/kg. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste estatístico: ANOVA/Tukey, $p < 0,05$).

Modelagem Molecular

Para explorar o sítio de ligação mais viável, o modo de interação e os estudos de ancoragem de afinidade de ligação foram realizados nos compostos **1**, cisplatina e ciclofosfamida (Figura 7) com B-DNA (PDB ID: 1BNA). Conforme mostrado na Figura 6, os compostos interagem com o DNA por meio de interações no sulco maior, mostrando uma alta afinidade pela região rica em A-T. As energias de ligação relativas resultantes da interação **1**, ciclofosfamida e cisplatina são mostradas na Tabela 1.

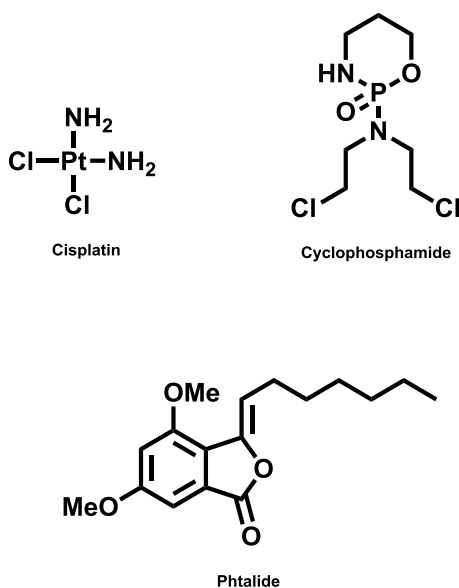


Figura 6. Estrutura dos compostos.

Tabela 6. Energias de interação do complexo ligante-receptor com B-DNA (cristalizado).

Composto	Docking Score (kcal/mol)
1	-88.75
ciclofosfamida	-90.39
cisplatina	-69.81

As interações entre o B-DNA e os compostos são mostradas na Figura 6. Além disso, os resultados indicam uma certa interação de ligação de hidrogênio entre os complexos de Phthalide, ciclofosfamida e cisplatina e o DNA.

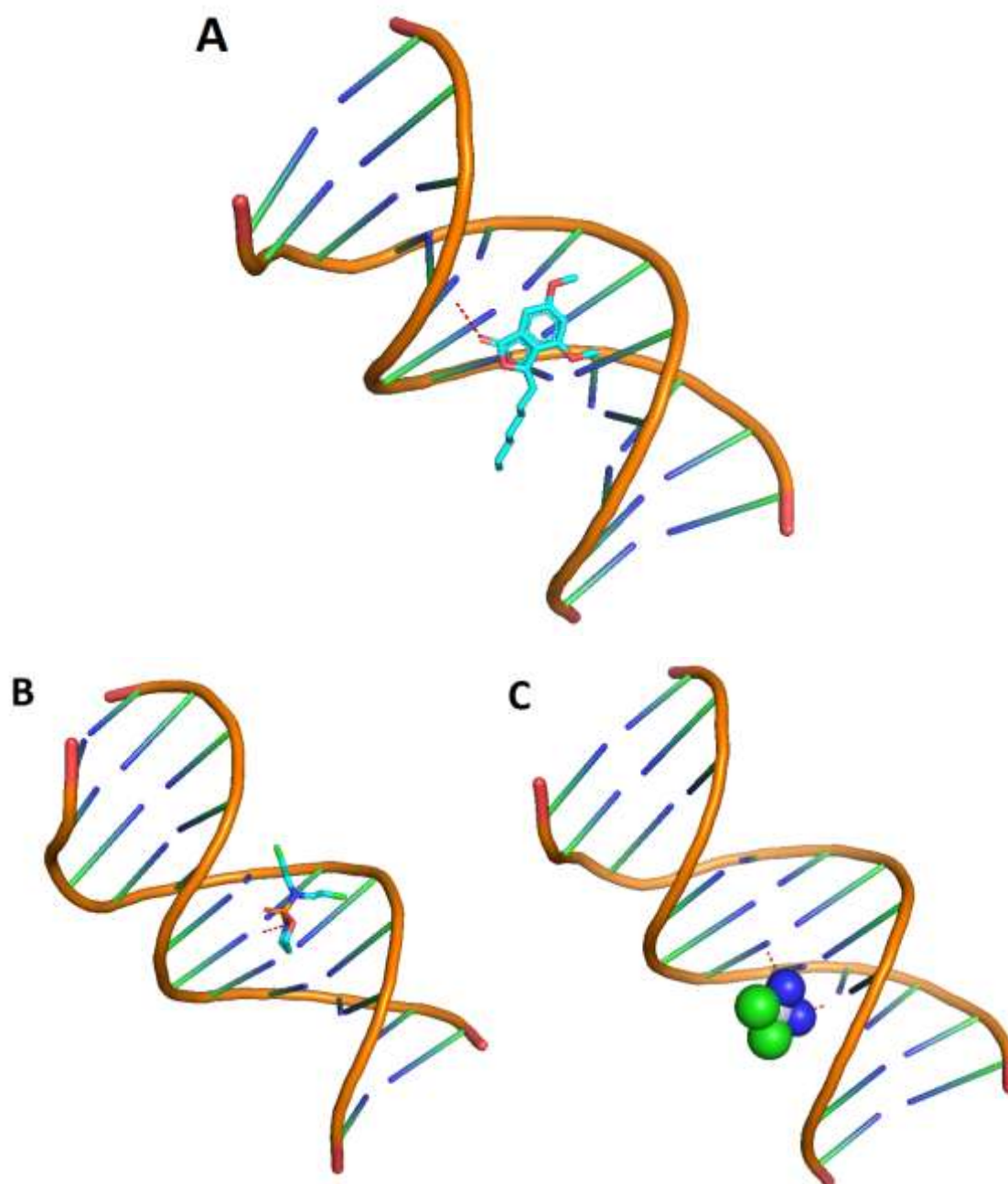


Figura 7. Interações entre os compostos (pontos vermelhos) e B-DNA: **1** (A), ciclofosfamida (B) e cisplatina (C).

3. Discussão

Descrevemos a síntese de três lipídios resorcinólicos (AMS35AA, AMS35BB e AMS049) e seus efeitos em biomarcadores de curto prazo para carcinogênese. Também avaliamos os efeitos desses três compostos em associação com a ciclofosfamida. Observamos que os três lipídeos possuem características importantes para o desenvolvimento de novos quimioterápicos e/ou adjuvantes quimioterápicos. No geral, também demonstramos que esses compostos podem aumentar os efeitos quimioterápicos

da ciclofosfamida, aumentando a frequência de danos ao DNA e morte celular ou reduzindo os efeitos adversos aumentando a contagem de linfócitos, por exemplo [2,5,6]. No entanto, ao analisar as respostas biológicas desses três compostos, não observamos um padrão, nem conseguimos correlacionar as diferentes respostas a mudanças nas moléculas. Assim, optamos por avaliar **1**, um precursor comum dos lipídeos resorcinol, em busca de mais informações sobre seus mecanismos de ação.

A Phthalide **1** não induziu alterações no peso final e no peso dos órgãos, exceto no peso do baço. Além disso, não foram observadas manifestações clínicas de toxicidade, como ressecamento da mucosa, opacidade e eriçamento dos cabelos, anormalidades comportamentais, lesões cutâneas, letargia, alterações na marcha (hipoatividade locomotora), tremores, diminuição de alimentos e água ingestão e, eventualmente, morte [7]. Assim, sugere-se que **1** não induziu toxicidade. O aumento do baço observado apenas nos grupos tratados com **1**, isoladamente ou em associação com o quimioterápico ciclofosfamida, pode ser explicado pelo aumento da fagocitose esplênica, que foi observado principalmente no grupo tratado apenas com Phthalide **1**. Os três lipídios de resorcinol que foram produzidos a partir de **1** também não mostraram sinais de toxicidade [2,5,6].

Em relação à genotoxicidade, observou-se que **1** induziu um aumento na frequência de dano cromossômico em até $5,21\times$. No entanto, essa mesma capacidade não foi observada para os lipídios reabsortivos dele derivados, AMS35AA, AMS35BB e AMS049. Esses compostos não causaram dano cromossômico ao usar o mesmo modelo experimental que foi o camundongo Swiss [5,6]. AMS35AA também não induziu danos cromossômicos em C57BL/6 [2]. No entanto, AMS35BB e AMS049 causaram danos genômicos [6]. Tanto o dano genômico (avaliado pelo ensaio do cometa) quanto o dano cromossômico (avaliado pelo ensaio do micronúcleo, por exemplo) podem ser classificados como danos genotóxicos [8,9]. Danos genômicos podem ser reparados, e o cromossomo já está fixado no genoma celular [10]. Notavelmente, o dano genômico pode evoluir para dano cromossômico [11]. Considera-se que **1** causa danos genéticos mais graves do que os observados para AMS35BB e AMS049.

Além de induzir dano cromossômico, **1** também induziu aumento da fagocitose esplênica. Este achado já era esperado uma vez que o baço pode remover células micronucleadas da circulação ativando a fagocitose esplênica. Assim, a fagocitose pode ocorrer em resposta a danos no DNA como um mecanismo de defesa celular contra agentes genotóxicos [5,12-15]. AMS35AA também aumentou a fagocitose esplênica. No

entanto, este composto não aumentou a frequência de danos genotóxicos [5]. Não é incomum que esse tipo de resposta biológica ocorra. Segundo Oliveira et al. [14], um aumento da fagocitose também foi registrado para IR-01, mesmo na ausência de dano genotóxico.

A Phthalide **1** aumentou a frequência de morte celular tanto no fígado quanto nos rins. Este fato também foi observado para os lipídios resorcinol, AMS35AA, AMS35BB e AMS049, derivados de **1**. Este fato permitiu aos autores sugerir um bom efeito antitumoral para tais compostos [5,6]. Além disso, o efeito antitumoral já foi confirmado, por exemplo, para AMS35AA em modelo de tumor sólido induzido por B16F10 [2].

Um fato que chamou a atenção foi que **1** aumentou a morte celular na presença de dano cromossômico. AMS35AA, por outro lado, aumentou a morte celular na ausência de dano genotóxico, enquanto AMS35BB e AMS049 aumentaram a frequência de morte celular na presença de dano genômico e não cromossômico. Esses fatos sugerem que o AMS35AA poderia ser um protótipo quimioterápico mais seletivo, pois induz a morte celular sem causar danos ao DNA. Esse efeito é uma característica importante para uma ação antitumoral seletiva, pois, dessa forma, a quimioterapia não teria mais o efeito colateral de induzir dano ao DNA de células saudáveis. A indução de dano ao DNA é um mecanismo de ação de muitas drogas quimioterápicas, como ciclofosfamida [16], doxorrubicina [17] e cisplatina [18]. No entanto, um dos efeitos colaterais dessas drogas quimioterápicas é que elas causam danos ao DNA [11] em todas as células, sejam elas tumorais ou não.

Apesar do dano cromossômico induzido por **1** e do dano genômico causado por AMS35BB e AMS049, esses compostos mantêm características desejáveis para o desenvolvimento de quimioterápicos. Nesse caso, é preciso desenvolver uma relação custo-benefício, pois um dos efeitos colaterais da ação quimioterápica está nessa indução de dano ao DNA. No entanto, como mencionado anteriormente, vários quimioterápicos existentes no mercado já apresentam esse mecanismo de ação/efeito colateral [16–18].

A literatura indica que a morte celular induzida por lipídios de resorcinol pode ser mediada pelo receptor órfão nuclear Nur77 [19,20] ou dano ao DNA [2,4].

AMS35AA apresentou efeitos citotóxicos em células MCF-7 e induziu a morte celular por apoptose, mediada por danos no DNA, o que foi confirmado pelo aumento da frequência de células lesadas no teste do cometa, bem como pelo aumento da expressão gênica de ATR, p21, p53 e GADD45 [4]. Segundo Navarro et al. [2], AMS35AA é citotóxico e genotóxico para células B16F10. A morte celular ocorreu por apoptose e foi

mediada por danos no DNA, pois aumentou a frequência de cometas e a expressão de ATR, p21, p53 e GAD45AA.

O receptor Nur77 (TR3 ou NGFI-B), que também é uma opção para induzir a morte celular, é um fator de transcrição único que pertence à superfamília de receptores órfãos nucleares [21] e é capaz de regular a proliferação, diferenciação e apoptose [22, 23]. Nas células tumorais, o Nur77 é um fator de sobrevivência oncogênico que induz a apoptose por ativação no núcleo e migração para a mitocôndria. Na mitocôndria, ele interage com produtos do gene Bcl-2 e induz sua mudança conformacional, desencadeando a liberação do citocromo C e, finalmente, a apoptose [24-26].

A técnica de docking molecular pode contribuir para o desenho racional de fármacos e estudos mecanísticos ao colocar uma pequena molécula no sítio de ligação da região alvo-específica do DNA, principalmente de modo não covalente [27]. O docking molecular pode avaliar rapidamente as afinidades e modos de ligação entre um substrato alvo, como DNA e diversos ligantes [28].

A intercalação requer uma deformação significativa devido à formação de uma cavidade de ligação [29,30] em contraste com a ligação do sulco menor e maior que não requer grandes mudanças conformacionais do DNA [29]. A maioria das drogas de ligação ao DNA liga-se ao B-DNA e mostra uma maior afinidade por sequências ricas em AT [30,31]. A estrutura com sequências com bases A e T alternadas é geralmente estreita, permitindo contatos van der Waals favoráveis entre a droga e o DNA [30,32] em contraste com sequências ricas em GC, onde volumosos grupos amino de bases guanina afetam a geometria do sulco [30,33]. Estudos sobre a ligação droga - DNA foram realizados para elucidar as origens energéticas da ligação em termos de forças intermoleculares e mudanças conformacionais induzidas e para desenvolver novas estratégias de design de drogas [34,35].

O sulco principal do DNA oferece contatos mais específicos para estabelecer pontes de hidrogênio com a droga, mas os contatos de van der Waals são menos favoráveis devido às dimensões do sulco [33]. Além disso, o sulco maior é frequentemente ocupado por proteínas cuja atividade biológica pode ser afetada por drogas de ligação ao sulco menor [33]. Na maioria dos casos, a ligação droga - DNA é não covalente, embora ligações covalentes possam ser formadas com ligantes reativos [29,30].

A energia de ligação mais negativa mostra uma afinidade de ligação ao DNA mais potente. Assim, as afinidades de ligação ao DNA mostram uma interação mais significativa com os compostos na região do sulco principal da estrutura.

A ciclofosfamida é um conhecido agente alquilante do tipo mostarda nitrogenada. A mostarda de fosforamida, uma forma ativada de ciclofosfamida, alquila e/ou liga-se ao DNA. Seu efeito citotóxico é principalmente devido à ligação cruzada de cadeias de DNA e RNA e à inibição da síntese de proteínas [36,37]. Esse mecanismo também corrobora os resultados do docking, onde a ciclofosfamida interage entre as fitas de DNA e desestabiliza a estrutura.

Curiosamente, o mecanismo de ação da cisplatina é que a droga induz suas propriedades citotóxicas através da ligação ao DNA nuclear e subsequente interferência com a transcrição normal e/ou mecanismos de replicação do DNA [38]. Essa afirmação corrobora os resultados do docking, onde a cisplatina interage com dois pontos diferentes da estrutura do DNA.

Os resultados do docking da Phthalide mostraram maior valor de interação com a estrutura do DNA no sulco maior, semelhante à interação da ciclofosfamida. Este comportamento do composto pode deslocar os quimioterápicos do sulco maior, diminuindo a estabilidade da interação e diminuindo o tempo de interação entre o DNA e os quimioterápicos.

Phthalide **1**, em combinação com ciclofosfamida e cisplatina, não aumentou a frequência de fagocitose. Este fato já era esperado uma vez que a associação de **1** com agentes quimioterápicos teve efeito quimiopreventivo, reduzindo a indução de dano ao DNA. Com relação a esse fato, apenas reduz a frequência de células micronucleadas circulantes e reduz a atividade esplênica. Como relatado anteriormente, o baço sequestra células com danos no DNA, por exemplo [5,12-15].

Uma situação semelhante foi relatada para AMS35BB e AMS049, onde esses dois compostos preveniram danos ao DNA (danos genômicos) e ação quimiopreventiva sem alterar a frequência de fagocitose induzida pela ciclofosfamida [6]. Além disso, apesar de prevenir o dano genômico, o AMS35AA aumentou o dano cromossômico induzido pela ciclofosfamida (embora não tenha sido estatisticamente significativo) e aumentou a fagocitose esplênica [5].

A Phthalide **1** aumentou a frequência de morte celular em associação com ciclofosfamida e cisplatina, e sugere-se que isso pode ter ocorrido mesmo em ação quimiopreventiva. Apesar de **1** reduzir os danos ao DNA, ainda houve um aumento na

morte celular. Sugere-se que esse fato pode ter ocorrido porque os lipídios de resorcinol podem causar morte celular mediada pela ativação do receptor nuclear órfão Nur77 conforme relatado anteriormente [19,20]. A ação por esta rota também foi sugerida para AMS35AA, AMS35BB e AMS049 [5,6].

Diante do exposto, consideramos que o **1**, assim como seus lipídios derivados, possui características de interesse para o desenvolvimento de novos quimioterápicos, uma vez que aumenta a frequência de morte celular. Além disso, supõe-se que seu mecanismo de ação envolverá danos ao DNA, uma vez que aumenta a frequência de micronúcleos, um importante biomarcador para outros quimioterápicos já comercializados.

Notavelmente, semelhante a seus derivados, **1** pode potencializar os efeitos da ciclofosfamida e, assim, aumentar a indução de morte celular. Portanto, pode ser um importante adjuvante quimioterapêutico. Além disso, sua ação quimiopreventiva pode proteger células saudáveis sem interferir negativamente nos efeitos indutores de morte celular da ciclofosfamida. Por outro lado, mesmo protegendo o DNA (ação quimiopreventiva) continua potencializando a morte celular induzida pela ciclofosfamida.

O presente estudo e a comparação das atividades biológicas da Phthalide **1** com seus derivados não permitiram elucidar as diferentes respostas biológicas apresentadas neste estudo e as já descritas [5,6]. Assim, sugerimos mais estudos com moléculas metiladas e não metiladas para permitir um estudo estrutura-atividade.

Além disso, este trabalho contribui de forma inédita para a literatura da área ao elucidar que também se pode potencializar os efeitos quimioterápicos da cisplatina, visto que nenhum de seus derivados foi testado em associação com esse quimioterápico.

4. Material e Métodos

4.1 Agentes químicos, animais e desenho experimental

Foram utilizados dois controles positivos: Ciclofosfamida (Fosfaseron®, Ítaca Laboratories, REG. M.S. No. 1.2603.0056.002-1; Lote 063020, Campo Grande, Brasil) na dose de 100 mg/kg de peso corporal (p.p.) administrado por via intraperitoneal (i.p.) [5,39] e cisplatina (Intas Pharmaceuticals Laboratory LTD, REG. M.S.1.5537.0002.003-7; Matoda 382210, Índia) na dose de 6 mg/kg (p.b.; i.p.) [14,40]. A ciclofosfamida foi diluída em água Mili-Q.

A Phthalide 1 foi prontamente preparada tratando o ácido 3,5-dimetoxibenzóico com cloreto de octanoíla na presença de AlCl_3 . Este composto foi caracterizado por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C , e os dados coincidem com os relatados na literatura [1].

A Phthalide 1 foi primeiro dissolvida em DMSO (1%) e posteriormente diluída em água Mili-Q (concentração final de 1% de DMSO) e administrada em doses de 5, 10 e 20 mg/kg (p.b.; i.p.) [41].

Neste experimento, 120 camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos sexualmente maduros (aproximadamente 8–10 semanas) do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) foram divididos em 12 grupos experimentais cada ($n = 10$ animais).

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno cobertas com cama e alimentados com ração comercial (Nuvital®, Campo Grande, Brasil) e água filtrada *ad libitum*. A temperatura e a luminosidade foram controladas por fotoperíodo de doze horas (12 h de luz: 12 h de escuridão), com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade de $55\% \pm 10$ em estante ventilada (ALESCO®, Campo Grande, Brasil).

O experimento foi conduzido seguindo as diretrizes da Declaração Universal dos Direitos dos Animais com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UFMS) sob protocolo nº 399/2012.

Os 12 grupos experimentais foram divididos conforme listado abaixo:

Grupo controle: Os animais receberam veículo 1 (DMSO 1%) e ciclofosfamida (solução fisiológica – NaCl 0,9%) na dose de 0,1 mL/10 g b.w; i.p) simultaneamente.

Grupo CYP: Os animais receberam veículo 1 (0,1 mL/10 g b.w.) e ciclofosfamida (100 mg/kg b.w., i.p.) simultaneamente.

Grupo CIS: Os animais receberam veículo 1 (0,1 mL/10 g p.c.) e cisplatina (6 mg/kg p.c., i.p.) simultaneamente.

Grupo Phthalide 1: Os animais receberam 1, em três diferentes doses (5mg/kg; 10mg/kg e 20mg/kg p.w., i.p.) e o veículo ciclofosfamida (0,1mL/10 g b.w., i.p.) simultaneamente.

Grupo CYP + Phthalide (Phthalide 1 + ciclofosfamida): Os animais receberam 1 (em três doses diferentes—5 mg/kg; 10 mg/kg e 20 mg/kg p.w., i.p.) e ciclofosfamida (100 mg/kg b.w., i.p.) simultaneamente.

Grupo CIS + Phthalide (Phthalide 1 + cisplatina): Os animais receberam 1 (em três doses diferentes—5 mg/kg; 10 mg/kg e 20 mg/kg b.w., i.p.) e cisplatina (6 mg/kg b.w., i.p.) simultaneamente.

4.2. Ensaios Biológicos

4.2.1. Ensaio de Micronúcleo em Sangue Periférico

O ensaio de micronúcleos em sangue periférico foi realizado segundo Hayashi et al. [42] com modificações de Oliveira et al. [43]. Uma alíquota de 20 µL de sangue periférico foi adicionada à lâmina previamente revestida com 20 µL de Alaranjado de acridina (1,0 mg/mL). Em seguida, uma lamínula foi depositada sobre o material biológico. A lâmina permaneceu em freezer (20 °C) por duas semanas. A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência (Bioval®, Modelo L 2000 A), com objetiva de 400x, filtro de excitação de 420–490 nm e filtro de barreira de 520 nm. Duas mil células/animal foram analisadas.

4.2.2. Ensaio de fagocitose esplênica

Vinte microlitros de Alaranjado de acridina (1,0 mg/mL) foram utilizados para cobrir a superfície de uma lâmina previamente aquecida. Após 1/3 do baço macerado em solução salina, 100 µL de suspensão celular foram colocados na lâmina corada. Em seguida, foi colocada uma lamínula. As lâminas foram armazenadas em um freezer para posterior análise. A análise foi realizada usando um microscópio de fluorescência (Bioval®, Modelo L 2000 A) com uma ampliação de 400 com um filtro de 420–490 nm e um filtro de barreira de 520 nm. Cem células por animal foram analisadas. A análise das células com evidência ou ausência de fagocitose baseou-se na descrição de Hayashi et al. [42] com modificações de Carvalho et al. [6].

4.2.3. Ensaio de Morte Celular

Cem microlitros de solução macerada de fígado e/ou rim foram usados para fazer uma extensão em um lado de vidro. Após esse processo, a lâmina foi fixada em Carnoy por 10 min e, logo após, submetida a diferentes concentrações decrescentes de etanol (95–25%).

Em seguida, foi submetido a banhos de tampão McIlvane por 10 min, corado em Alaranjado de acridina (0,01%, 5 min) e lavado em tampão McIlvane por 10 min. A identificação de células em apoptose foi realizada por meio da análise dos padrões de fragmentação do DNA [6].

4.2.4. Cálculo da Porcentagem de Redução de Danos (DR%)

O percentual de redução de danos é utilizado para avaliar a capacidade quimiopreventiva de uma substância quando associada a uma substância que esteja induzindo danos amplos. Para esta avaliação, foi utilizada a fórmula proposta por [44,45]:

$$RD \text{ ou } ID (\%) = \left(\frac{\text{Média controle positivo} - \text{média grupo associado}}{\text{Média controle positivo} - \text{média controle negativo}} \right) \times 100$$

A porcentagem de redução de danos também foi adaptada para ensaios de fagocitose e morte celular.

4.3. Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando ANOVA com pós teste de Tukey usando o GraphPad Prism Software (versão 3.02; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os valores foram expressos como média±EPM e o nível de significância foi $p < 0,05$.

4.4. Ancoragem Molecular

4.4.1. Detalhes computacionais

O protocolo virtual, incluindo docking molecular, foi realizado no computador DELL® Workstation, com processador Intel® Xeon E5-1660, 3,3 GHz, 4 CPUs, placa gráfica NVIDIA® GeForce RTX 2060, RAM 8 GB, sob o sistema operacional Windows®.

4.4.2. Preparação de Proteína

A estrutura cristalina baseada em difração de raios-X de um B-DNA Dodecamer (PDB ID: 1BNA) <https://doi.org/10.1073/pnas.78.4.2179> (acessado em 10 de maio de 2022) foi recuperada do banco de dados de proteínas <https://www.rcsb.org/> (acessado em 10 de maio de 2022) com resolução de 1,9 Å para a estrutura cristalina do DNA sintético dodecâmero d (CpGpCpGpApApTpTpCpGpCpG). As moléculas de água foram removidas operando o Discovery Studio BIOVIA [46].

4.4.3. Modelagem Molecular

O conjunto de 3 compostos foi construído no programa ChemDraw <https://www.perkinelmer.com/product/chemdraw-professional> chemdrawpro (acessado em 10 de maio de 2022) a partir de estruturas 2D da série. Todas as geometrias foram virtualmente construídas e otimizadas usando mecânica molecular (MM+) e métodos semiempíricos AustinModel 1 (AM1) usando o programa HyperChem 7 <http://www.hyper.com> (acessado em 10 de agosto de 2022). Os arquivos de saída foram

convertidos em arquivos de entrada .mol2 no programa Discovery Studio BIOVIA usando Open Babel (http://openbabel.org/wiki/Main_Page) e depois convertidos em arquivos .pdb como arquivos de entrada em HDock <http://hdock.phys.hust.edu.cn/> (acessado em 10 de agosto de 2022).

Para prever a melhor orientação e conformação dos compostos para o BDNA in silico, foi utilizado o programa de servidor web HDock.

4.4.4. Seleção de Alvo e Simulações de Docking Molecular

A estrutura cristalizada do B-DNA sintético Dodecamer foi obtida através do RSCB PDB sob o código 1BNA. <https://www.rcsb.org/structure/1BNA> (acessado em 10 de maio de 2022). Em seguida, simulações de docking foram realizadas para cada candidato a inibidor no alvo correspondente. Este procedimento foi realizado utilizando o servidor web HDock [47]. Assim, foi avaliado o escore Docking.

Antes do encaixe usando HDock, o B-DNA e os compostos foram carregados como arquivos.pdb no servidor web. Os complexos gerados pelo HDock foram selecionados usando o melhor modelo entre os resultados, que apresentou o melhor escore de docking. As estruturas complexas do sítio da proteína (.pdb) e dos ligantes (.pdb) foram inseridas no programa visualizador BIOVIA Discovery Studio para detalhar as interações entre os ligantes e as bases de DNA participantes.

5. Conclusões

Em conclusão, **1** tem aplicabilidade clínica e pode ser candidato a desenvolver uma nova geração do agente quimioterápico. Além disso, o **1** possui características que podem ser utilizadas como adjuvante quimioterápico em associação com a ciclofosfamida e a cisplatina, uma vez que o **1** aumenta a frequência de morte celular induzida pela quimioterapia. Em relação à associação desses compostos, também foi relatado que o efeito quimiopreventivo de **1**, quando associado à ciclofosfamida e cisplatina, pode prevenir efeitos adversos (indução de dano ao DNA em células não tumorais) sem interferir no mecanismo de ação da quimioterapia drogas e, portanto, sem reduzir a indução de morte celular.

Referências

1. Vitor, N.; Meza, A.; Gomes, R.S.; Rafique, J.; DE Lima, D.P.; Beatriz, A. Straightforward synthesis of cytosporone analogs AMS35AA and AMS35BB. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2021**, *93*, e20201347. [[CrossRef](#)]
2. Navarro, S.D.; Pessatto, L.R.; Meza, A.; de Oliveira, E.J.T.; Auharek, S.A.; Vilela, L.C.; de Lima, D.P.; de Azevedo, R.B.; Kassuya, C.A.L.; Cáceres, O.I.A.; et al. Resorcinolic lipid 3-heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one is a strategy for melanoma treatment. *Life Sci.* **2018**, *209*, 300–312. [[CrossRef](#)]
3. Stepanenko, I.Y.; Strakhovskaia, M.G.; Belenikina, N.S.; Nikolaev, I.A.; Miliukin, A.L.; Kozlova, A.N.; Revina, A.A.; El'-Registan, G.I. Protection of *Saccharomyces cerevisiae* against oxidative and radiation-caused damage by alkyl hydroxybenzenes. *Mikrobiologiya* **2004**, *73*, 204–210.

4. Rabacow, A.P.M.; Meza, A.; De Oliveira, E.J.T.; De David, N.; Vitor, N.; Antonioli-Silva, A.C.M.B.; De Fátima Cepa Matos, M.; Perdomo, R.T.; Da Silva Gomes, R.; De Lima, D.P.; et al. Evaluation of the antitumor potential of the resorcinolic lipid 3-heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one in breast cancer cells. *Anticancer Res.* **2018**, *38*, 4565–4576. [[CrossRef](#)]
5. Navarro, S.D.; Beatriz, A.; Meza, A.; Pesarini, J.R.; Gomes, R.d.S.; Karaziack, C.B.; Cunha-Laura, A.L.; Monreal, A.C.; Romão, W.; Lacerda Júnior, V.; et al. A new synthetic resorcinolic lipid 3-heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: Evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *75*, 132–142. [[CrossRef](#)]
6. Oliveira, R.J.; Mantovani, M.S.; Pesarini, J.R.; Mauro, M.O.; da Silva, A.F.; Souza, T.R.; Ribeiro, L.R. 6-Dimethylaminopurine and cyclohexamide are mutagenic and alter reproductive performance and intrauterine development in vivo. *Genet. Mol. Res.* **2015**, *14*, 834–849. [[CrossRef](#)]
7. OECD. Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure; OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4; OECD Publishing: Paris, France, 2022. [[CrossRef](#)]
8. Cordelli, E.; Bignami, M.; Pacchierotti, F. Comet assay: A versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicol. Res.* **2021**, *10*, 68–78. [[CrossRef](#)]
9. Sommer, S.; Buraczewska, I.; Kruszewski, M. Micronucleus assay: The state of art, and future directions. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1534. [[CrossRef](#)]
10. Mehra, S.; Chadha, P. Naphthalene-2-sulfonate induced toxicity in blood cells of freshwater fish *Channa punctatus* using comet assay, micronucleus assay and ATIR-FTIR approach. *Chemosphere* **2021**, *265*, 129147. [[CrossRef](#)]
11. Alhmoud, J.F.; Woolley, J.F.; Al Moustafa, A.E.; Malki, M.I. DNA Damage/Repair Management in Cancers. *Cancers* **2020**, *12*, 1050. [[CrossRef](#)]
12. Carvalho, P.C.; Santos, E.A.; Schneider, B.U.; Matuo, R.; Pesarini, J.R.; Cunha-Laura, A.L.; Monreal, A.C.; Lima, D.P.; Antonioli, A.C.; Oliveira, R.J. Diaryl sulfide analogs of combretastatin A-4: Toxicogenetic, immunomodulatory and apoptotic evaluations and prospects for use as a new chemotherapeutic drug. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, *40*, 715–721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ishii, P.L.; Prado, C.K.; Mauro, M.d.O.; Carreira, C.M.; Mantovani, M.S.; Ribeiro, L.R.; Dichi, J.B.; Oliveira, R.J. Evaluation of *Agaricus blazei* in vivo for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2011**, *59*, 412–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Oliveira, R.J.; da Cruz Leite Santos, N.; Pesarini, J.R.; de Oliveira, B.C.; Berno, C.R.; de Araújo, F.H.S.; da Silveira, I.O.M.F.; Nascimento, R.O.; Brochado Antonioli-Silva, A.C.M.; Duenhas Monreal, A.C.; et al. Assessment of genetic integrity, splenic phagocytosis and cell death potential of (Z)-4-((1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3dihydro-1H-pyrazol-4-yl) amino)-4-oxobut-2-enoic acid and its effect when combined with commercial chemotherapeutics. *Genet. Mol. Biol.* **2018**, *41*, 154–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bazo, A.P.; Rodrigues, M.A.; Sforcin, J.M.; de Camargo, J.L.; Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M. Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **2002**, *22*, 183–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Swan, D.; Gurney, M.; Krawczyk, J.; Ryan, A.E.; O'Dwyer, M. Beyond DNA damage: Exploring the immunomodulatory effects of cyclophosphamide in multiple myeloma. *Hemasphere* **2020**, *4*, e350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

17. Du, J.; Zhang, A.; Li, J.; Liu, X.; Wu, S.; Wang, B.; Wang, Y.; Jia, H. Doxorubicin-induced cognitive impairment: The mechanistic insights. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 673340. [[CrossRef](#)]
18. Brown, A.; Kumar, S.; Tchounwou, P.B. Cisplatin-Based Chemotherapy of Human Cancers. *J. Cancer Sci. Ther.* **2019**, *11*, 97.
19. Zhan, Y.; Du, X.; Chen, H.; Liu, J.; Zhao, B.; Huang, D.; Li, G.; Xu, Q.; Zhang, M.; Weimer, B.C.; et al. Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 548–556. [[CrossRef](#)]
20. Hao, L.; Wang, X.; Zhang, D.; Xu, Q.; Song, S.; Wang, F.; Li, C.; Guo, H.; Liu, Y.; Zheng, D.; et al. Studies on the preparation, characterization and pharmacokinetics of Amoitone B nanocrystals. *Int. J. Pharm.* **2012**, *433*, 157–164. [[CrossRef](#)]
21. Maruyama, K.; Tsukada, T.; Ohkura, N.; Bandoh, S.; Hosono, T.; Yamaguchi, K. The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily (review). *Int. J. Oncol.* **1998**, *12*, 1237–1243. [[CrossRef](#)]
22. Li, Q.X.; Ke, N.; Sundaram, R.; Wong-Staal, F. NR4A1, 2, 3—An orphan nuclear hormone receptor family involved in cell apoptosis and carcinogenesis. *Histol. Histopathol.* **2006**, *21*, 533–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Winoto, A.; Littman, D.R. Nuclear hormone receptors in T lymphocytes. *Cell* **2002**, *109*, S57–S66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Lin, B.; Kolluri, S.K.; Lin, F.; Liu, W.; Han, Y.H.; Cao, X.; Dawson, M.I.; Reed, J.C.; Zhang, X.K. Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* **2004**, *116*, 527–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Moll, U.M.; Marchenko, N.; Zhang, X.K. p53 and Nur77/TR3—Transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene* **2006**, *25*, 4725–4743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Thompson, J.; Winoto, A. During negative selection, Nur77 family proteins translocate to mitochondria where they associate with Bcl-2 and expose its proapoptotic BH3 domain. *J. Exp. Med.* **2008**, *205*, 1029–1036. [[CrossRef](#)]
27. Rohs, R.; Bloch, I.; Sklenar, H.; Shakked, Z. Molecular flexibility in ab initio drug docking to DNA: Binding-site and binding-mode transitions in all-atom Monte Carlo simulations. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 7048–7057. [[CrossRef](#)]
28. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.C. A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation. *J. Comput.- Aided Mol. Des.* **1995**, *9*, 532–549. [[CrossRef](#)]
29. Han, X.; Gao, X. Sequence specific recognition of ligand-DNA complexes studied by NMR. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 551–581. [[CrossRef](#)]
30. Neidle, S.; Nunn, C.M. Crystal structures of nucleic acids and their drug complexes. *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15*, 1–15. [[CrossRef](#)]
31. Ren, J.; Chaires, J.B. Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands. *Biochemistry* **1999**, *38*, 16067–16075. [[CrossRef](#)]
32. Wemmer, D.E. Designed sequence-specific minor groove ligands. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 439–461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Bischoff, G.; Hoffmann, S. DNA-binding of drugs used in medicinal therapies. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 312–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Chaires, J.B. Energetics of drug-DNA interactions. *Biopolymers* **1997**, *44*, 201–215. [[CrossRef](#)]
35. Haq, I.; Ladbury, J. Drug–DNA recognition: Energetics and implications for design. *J. Mol. Recognit.* **2000**, *13*, 188–197. [[CrossRef](#)]

36. Korkmaz, A.; Topal, T.; Oter, S. Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. *Cell Biol. Toxicol.* **2007**, *23*, 303–312. [[CrossRef](#)]
37. Mills, K.A.; Chess-Williams, R.; McDermott, C. Novel insights into the mechanism of cyclophosphamide-induced bladder toxicity: Chloroacetaldehyde's contribution to urothelial dysfunction in vitro. *Arch. Toxicol.* **2019**, *93*, 3291–3303. [[CrossRef](#)]
38. Fuertes, M.A.; Castilla, J.; Alonso, C.; Pérez, J.M. Cisplatin biochemical mechanism of action: From cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 257–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Oliveira, R.J.; Navarro, S.D.; de Lima, D.P.; Meza, A.; Pesarini, J.R.; da Silva Gomes, R.; Karaziack, C.B.; de Oliveira Mauro, M.; Cunha-Laura, A.L.; Monreal, A.C.; et al. A novel cytosporone 3-heptyl-4,6-dihydroxy-3H-isobenzofuran-1-one: Synthesis; toxicological, apoptotic and immunomodulatory properties; and potentiation of mutagenic damage. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 561. [[CrossRef](#)]
40. Berno, C.R.; Rós, B.d.T.; da Silveira, I.O.; Coelho, H.R.; Antonioli, A.C.; Beatriz, A.; de Lima, D.P.; Monreal, A.C.; Sousa, F.G.; da Silva Gomes, R.; et al. 4-Aminoantipyrine reduces toxic and genotoxic effects of doxorubicin, Cisplatin, and cyclophosphamide in male mice. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2016**, *805*, 19–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Araújo, F.H.S.; Figueiredo, D.R.; Auharek, S.A.; Pesarini, J.R.; Meza, A.; Gomes, R.S.; Monreal, A.C.D.; Antonioli-Silva, A.C.M.B.; Lima, D.P.; Kassuya, C.A.L.; et al. In vivo chemotherapeutic insight of a novel isocoumarin (3-hexyl-5,7-dimethoxy-isochromen-1-one): Genotoxicity, cell death induction, leukometry and phagocytic evaluation. *Genet. Mol. Biol.* **2017**, *40*, 665–675. [[CrossRef](#)]
42. Hayashi, M.; Morita, T.; Kodama, Y.; Sofuni, T.; Ishidate, M., Jr. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res. Lett.* **1990**, *245*, 245–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Oliveira, R.J.; Baise, E.; Mauro, M.d.O.; Pesarini, J.R.; Matuo, R.; Silva, A.F.; Ribeiro, L.R.; Mantovani, M.S. Evaluation of chemopreventive activity of glutamine by the comet and the micronucleus assay in mice's peripheral blood. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2009**, *28*, 120–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Manoharan, K.; Banerjee, M.R. β -Carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biol. Int. Rep.* **1985**, *9*, 783–789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Waters, M.D.; Brady, A.L.; Stack, H.F.; Brockman, H.E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutat. Res./Rev. Genet. Toxicol.* **1990**, *238*, 57–85. [[CrossRef](#)]
46. BIOVIA Discovery Studio Visualizer; version 20; Dassault Systèmes: San Diego, CA, USA, 2021.
47. Yan, Y.; Zhang, D.; Zhou, P.; Li, B.; Huang, S.Y. HDock: A web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, W365–W373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Conclusão

Diante dos resultados pode-se inferir que o ZIM e Phthalide tem aplicabilidade clínica e podem ser candidatos ao desenvolvimento de uma nova geração de agentes quimioterápicos. O ZIM é genotóxico e causa danos genômicos e cromossômicos. Além disso, ele causa ativação da fagocitose esplênica e aumenta a frequência de morte celular no fígado e nos rins. Já a Phthalide é genotóxica, por aumentar a frequência de micronúcleos. Além disso, causa ativação da fagocitose esplênica e aumento a frequência de morte celular no fígado e nos rins.

Em associação, o ZIM tem efeito quimiopreventivo e, portanto, interfere no mecanismo de ação dos quimioterápicos comerciais cisplatina, doxorrubicina e ciclofosfamida ao reduzir a frequência de danos no DNA e, portanto, a frequência de morte celular. Esse fato desaconselha o uso associado desses compostos visto que esses perderiam ou teriam reduzidos os seus efeitos anticancerígenos. Já Phthalide potencializou os efeitos da cisplatina e da ciclofosfamida por aumentar a indução de danos no DNA e, por consequência, a indução de morte celular. Esses resultados indicam que a Phthalide pode ser considerada um adjuvante quimioterápico e, portanto, o seu uso combinado favorece o tratamento anticancer.

Referências

Araújo, F.H.S.; Figueiredo, D.R.; Auharek, S.A.; Pesarini, J.R.; Meza, A.; Gomes, R.S.; Monreal, A.C.D.; Antonioli-Silva, A.C.M.B.; Lima, D.P.; Kassuya, C.A.L.; et al. In vivo chemotherapeutic insight of a novel isocoumarin (3-hexyl-5,7-dimethoxy-isochromen-1-one): Genotoxicity, cell death induction, leukometry and phagocytic evaluation. **Genet. Mol. Biol.** v. 40, p. 665–675, 2017.

Belbekhouche, S.; Guerrouache, M.; Carbonnier, B. Thiol–maleimide michael addition click reaction: a new route to surface modification of porous polymeric monolith. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 217, n. 8, p. 997-1006, 2016.

Berno, C. R.; de Toledo Ros, B.; da Silveira, I. O. M. F.; Coelho, H. R.; Antonioli, A. C. M. B.; Beatriz, A.; de Lima, D. P.; Monreal, A. C. D.; Sousa, F. G.; da Silva Gomes, R.; Oliveira, R. J. 4-Aminoantipyrine reduces toxic and genotoxic effects of doxorubicin, cisplatin, and cyclophosphamide in male mice. **Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.** v. 805, p. 19–24, 2016

Bethune, J.; Wieland, F. T. Assembly of COPI and COPII Vesicular Coat Proteins on Membranes. **Annu. Rev. Biophys.** v. 47, p. 63–83, 2018.

Bouwman, P.; Jonkers, J. The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. **Nat. Rev. Cancer.** v.12, p. 587–598, 2012

Brady, S. F.; Wagenaar, M. M.; Singh, M. P., Janso, J. E.; Clardy, J. The cytosporones, new octaketide antibiotics isolated from an endophytic fungus. **Org. Lett.**, v. 2, p. 4043-4046, 2000.

Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E., Soerjomataram, I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. **Cancer**, v. 127, n. 16, p. 3029-3030, 2021.

Buitrago-González, T. P.; Calderón-Ospina, C. A.; Vallejos-Narváez, A. Dipirona: Beneficios subestimados o riesgos sobredimensionados? Revisión de la literatura. **Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas**, v. 43, p. 173-195, 2014.

Carvalho, P.C.; Santos, E.A.; Schneider, B.U.; Matuo, R.; Pesarini, J.R.; Cunha-Laura, A.L.; Monreal, A.C.; Lima, D.P.; Antonioli, A.C.; Oliveira, R.J. Diaryl sulfide analogs of combretastatin A-4: Toxicogenetic, immunomodulatory and apoptotic evaluations and prospects for use as a new chemotherapeutic drug. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v. 40, p. 715–721, 2015.

Chabner, B. A.; Roberts, T. G., Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. **Nat. Rev. Cancer.** v. 5, p. 65–72, 2005.

Chou, T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 621-681, 2006.

Collins, S. J. Retinoic acid receptors, hematopoiesis and leukemogenesis. **Curr. Opin. Hematol.** v. 15, p. 346–351, 2008.

Cooper, G. The Development and Causes of Cancer. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sunderland (MA): **Sinauer Associates**; 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>

Cunha, S.; Oliveira, S. M.; Rodrigues, M. T.; Bastos, R. M.; Ferrari, J.; de Oliveira, C. M. A.; Kato, L.; Napolitano, H. B.; Vencato, I.; Lariucci, C. Structural studies of 4-aminoantipyrine derivatives. **J. Mol. Struct.** v. 752, p. 32–39, 2005.

Garnock-Jones, K. P.; Keating, G. M.; Scott, L. J. Trastuzumab: A review of its use as adjuvant treatment in human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive early breast cancer. **Drugs.** v. 70, p. 215–239, 2010.

Goldstein, M.; Kastan, M. B. The DNA damage response: implications for tumor responses to radiation and chemotherapy. **Annual review of medicine**, v. 66, p. 129-143, 2015.

Hansford, S.; Huntsman, D. G. boveri at 100: theodor boveri and genetic predisposition to cancer. **The Journal of Pathology**, v. 234, n. 2, p. 142-145, 2014

Hayashi, M.; Morita, T.; Kodama, Y.; Sofuni, T.; Ishidate, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutat. Res. Lett.** v. 245, p. 245–249, 1990.

Heerklotz, H; Seelig, J. Correlation of membrane/ water partition coefficients of detergents with the critical micelle concentration. **Biophys. J.**, v. 78, p. 2435–2440, 2000.

Heerklotz, H; Seelig, J. Detergent-like action of the antibiotic peptide surfactin on lipid membranes. **Biophys. J.**, v.81,1547–1554, 2001.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). O que é o câncer. 2022. Disponível em: <[https:// gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer](https://gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer) >. Acesso em: 06 out 2023.

Ishii, P.L.; Prado, C.K.; Mauro, M.d.O.; Carreira, C.M.; Mantovani, M.S.; Ribeiro, L.R.; Dichi, J.B.; Oliveira, R.J. Evaluation of *Agaricus blazei* in vivo for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. **Regul. Toxicol. Pharmacol.** v. 59, p. 412–422, 2011.

Jamasbi E, Hamelian M, Hossain MA, Varmira K. The cell cycle, cancer development and therapy. **Mol Biol Rep.** v 49, p. 10875-10883, 2022.

Jha, A.; Mukherjee, C.; Prasad, A. K.; Parmar, V. S.; Vadaparti, M.; Das, U.; Clercq, E. D.; Balzarini, J.; Stables, J. P.; Shrivastav, A.; Sharma, R. K.; Dimmock, J. R. Derivatives of aryl amines containing the cytotoxic 1, 4-dioxo-2-butenyl pharmacophore. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 5, p. 1510-1515, 2010.

Kobayashi, H.; Sugiyama, C.; Morikawa, Y.; Hayashi, M.; Sofuni, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Communications**, v. 2, p. 103-115, 1995.

Kozubek, A. Higher cardol homologues (5-alkenylresorcinols) from rye affect the red cell membrane-water transport. **Z. Naturforsch.**, v. 40, 80–84, 1985.

Kozubek, A.; Tyman, J. H. P. Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity. **Am. Chem. Soc.**, v. 99, p. 1-25, 1999.

Kozubek, A.; Demel, R. A. Permeability changes of erythrocytes and liposomes by 5-(n alk(en)yl)resorcinols from rye. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.603, p. 220–227, 1980.

Kumar V, Alhaj-Moustafa M, Bojanini L, Sher T, Roy V, Manochakian R, Vishnu P, Bodepudi S, Shareef Z, Ahmed S, Jani P, Paulus A, Grover A, Alegria VR, Ailawadhi M, Chanan-Khan A, Ailawadhi S. Timeliness of Initial Therapy in Multiple Myeloma: Trends and Factors Affecting Patient Care. **JCO Oncol Pract.**;16(4):e341-e349, 2020.

Machado, K. E.; OLIVEIRA, K. M.; ANDREOSI, H.M.; BUDNIAK, L.D.S; MORAES, A.C.R.; GASPAR, P.C.; SANTOS-SILVA, M.C. Apoptotic Events Induced by Maleimides on Human Acute Leukemia Cell Lines. **Chemical Research in Toxicology**, v. 26, n. 12, p. 1904-1916, 2013.

Mahle, F.; Guimaraes, T. D.; Meira, A. V.; Correa, R.; Cruz, R. C. B.; Cruz, A. B.; Nunes, R. J.; Cechinel, V.; de Campos-Buzzi, F. Synthesis and biological evaluation of N-antipyrine-4-substituted amino-3-chloromaleimide derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* v. 45, p. 4761–4768, 2010.

Manoharan, K.; Banerjee, M. R. β -Carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. **Cell Biology International Reports**, v. 9, n. 9, p. 783-789, 1985.

Meza, A.; Santos, E. A.; Gomes, R. S.; De Lima, D. P.; Beatriz, A. Cytosporones and Related Compounds, A Review: Isolation, Biosynthesis, Synthesis and Biological Activity of Promising Fungal Resorcinolic Lipids. **Current Organic Synthesis**, v. 12, p. 618-638, 2015.

Moskowitz, C. H., Nademanee, A., Masszi, T., Agura, E., Holowiecki, J., Abidi, M. H., Walewski, J. Brentuximab vedotin as consolidation therapy after autologous stem-cell transplantation in patients with Hodgkin's lymphoma at risk of relapse or progression (AETHERA): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet.* v. 385, p. 1853-1862, 2015.

Mukerjee, S. O imperador de todos os males: Uma biografia do câncer. Companhia Das Letras, São Paulo, 1 edition, 2012.

Navarro, S. D.; Beatriz, A.; Meza, A.; Pesarini, J. R.; Gomes, R. S.; Karaziack, C. B.; Cunha-laura, A. L.; Monreal, A. C. D.; Romao, W.; Junior, V. L.; Mauro, M. M.; Oliveira, R. J. A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3Hisobenzofuran- 1-one: Evaluation of toxicology and ability to potentiate the

mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, p. 132- 142, 2014.

Oliveira, E. J. T.; Pessatto, L. R.; de Freitas, R. O. N.; Pelizaro, B. I.; Rabacow, A. P. M.; Vani, J. M.; Monreal, A. C. D.; Mantovani, M. S.; de Azevedo, R. B.; Antonioli-Silva, A. C. M. B.; et al. New Bis copper complex ((Z)-4-((4 chlorophenyl) amino)-4-oxobut-2-enoyl) oxy): Cytotoxicity in 4T1 cells and their toxicogenic potential in Swiss mice. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 356, p. 127–138, 2018a.

Oliveira, R.J.; da Cruz Leite Santos, N.; Pesarini, J.R.; de Oliveira, B.C.; Berno, C.R.; de Araújo, F.H.S.; da Silveira, I.O.M.F.; Nascimento, R.O.; Brochado Antonioli-Silva, A.C.M.; Duenhas Monreal, A.C.; et al. Assessment of genetic integrity, splenic phagocytosis and cell death potential of (Z)-4-((1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3dihydro-1H-pyrazol-4-yl) amino)-4-oxobut-2-enoic acid and its effect when combined with commercial chemotherapeutics. **Genet. Mol. Biol.** v. 41, p. 154–166, 2018b.

Oliveira, R.J.; Mantovani, M.S.; Pesarini, J.R.; Mauro, M.O.; da Silva, A.F.; Souza, T.R.; Ribeiro, L.R. 6-Dimethylaminopurine and cyclohexamide are mutagenic and alter reproductive performance and intrauterine development in vivo. **Genet. Mol. Res.** v. 14,p. 834–849, 2015.

Porter, D. C.; Farmaki, E.; Altília, S.; Schools, G. P.; West, D. K.; Chen, M.; Chang, B. D.; Puzyrev, A. T.; Lim, C. U.; Rokow-Kittell, R.; Friedhoff, L. T.; Papavassiliou, A. G.; Kalurupalle, S.; Hurteau, G.; Shi, J.; Baran, P. S.; Gyorffy, Wentland, M. P.; Broude, E. V.; Kiaris, H.; Roninson, I. B. Cyclin-dependent kinase 8 mediates chemotherapyinduced tumor-promoting paracrine activities. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 109, p. 13799–13804, 2012.

Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.** v. 175, p. 184–191, 1988

Stasiuk, M, Jaromin, A; Kozubek, A. The effect of merulinic acid on biomembranes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1667, p. 215–221, 2004.

Stasiuk, M.; Kozubek, A. Biological activity of phenolic lipids. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 67, p. 841-860, 2010.

Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

Teixeira, L. A.; Araújo Neto, L. A. Câncer de mama no Brasil: medicina e saúde pública no século XX. *Saúde e Sociedade*, v. 29, p. e180753, 2020

Vichaya, E. G.; Chiu, G. S.; Krukowski, K.; Lacourt, T. E.; Kavalaars, A.; Dantzer, R.; Heijnen, C. J.; Walker, A. K. Mechanisms of chemotherapy-induced behavioral toxicities. **Frontiers in neuroscience**, v. 9, p. 131, 2015.

Vitor, N.; Meza, A.; Gomes, R.S.; Rafique, J.; DE Lima, D.P.; Beatriz, A. Straightforward synthesis of cytosporone analogs AMS35AA and AMS35BB. **An. Acad. Bras. Cienc** v. 93, p. e20201347, 2021

Voblikova, V. D.; Kobrina, N. S.; Gerasimova, N. M.; Pavlona, Z. N.; Dem'yanova, G. F.; Murygina, V. P.; Volosova, L. I.; Muromtsev, G. S. A new plant regulator of microbial origin. **Chem. Nat. Compd.**, v. 21, n. 3, p. 362-365, 1985.

Waters, M.D.; Brady, A.L.; Stack, H.F.; Brockman, H.E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutat. Res./Rev. Genet. Toxicol.** v. 238, p. 57–85, 1990.

Yokota, J. Tumor progression and metastasis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 497-503, 2000.

Yoshida, T.; Zhang, G.; Haura, E. B. Targeting epidermal growth factor receptor: central signaling kinase in lung cancer. *Biochem. Pharmacol.* 2010, 80, 613–623.
Yusefi, A.R.; Lankarani KB, Bastani P, Radinmanesh M , Kavosi Z. Risk factors for gastric cancer: a systematic review. **Asian Pac J Cancer Prev [Internet]**. v. 19, p. 591-603, 2018.

Zhan, Y.; Xiping, D.; Hangzi, C.; Jingjing, L.; Bixing, Z.; Danhong, H.; LI, G.; XU, Q.; Zhang, M.; Weimer, B. C.; Chen, D.; Cheng, Z.; Zhang, L.; LI, Q.; LI, S.; ZHENG, Z.; SONG, S.; HUANG, Y.; YE, Z.; SU, W.; LIN, S. C.; SHEN, Y.; WU, Q. Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77. **Nat. Chem. Biol.**, v. 4, n. 9, p. 548-556, 2008.

ANEXO A

ZIM, a Norbornene Derived from 4-Aminoantipyrine, Induces DNA Damage and Cell Death but in Association Reduces the Effect of Commercial Chemotherapeutics

Rodrigo Juliano Oliveira,^{*,†} Ingridhy Ostaciana Maia Freitas da Silveira,[‡] Silvia C. das Neves, Barbara Mitsuyasu, Allana C. Martins, Claudia Berno, Jiyan Mohammad, Halie Raj, Flavio H. S. de Araujo, Cristiane Regina Hortelan, Luana Machado, Eufânio N. da Silva Júnior, Marcelo L. B. Vilela, Valter Aragão Nascimento, Adilson Beatriz, and Roberto da Silva Gomes^{*}



Cite This: *Chem. Res. Toxicol.* 2023, 36, 66–82



Read Online

ACCESS |



Metrics & More



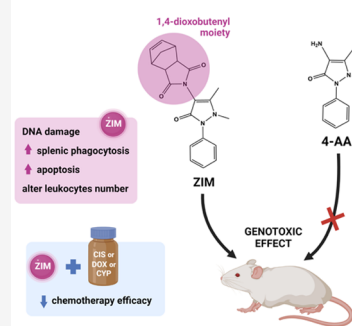
Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Cancer incidence is increasing, and the drugs are not very selective. These drugs cause adverse effects, and the cells become resistant. Therefore, new drugs are needed. Here, we evaluated the effects of ZIM, a candidate for chemotherapy, and 4-AA alone and in association with commercial chemotherapeutic agents. Subsequently, the results of ZIM and 4-AA were compared. Male Swiss mice were treated with doses of 12, 24, or 48 mg/kg ZIM or 4-AA alone or in association with cisplatin (6 mg/kg), doxorubicin (16 mg/kg), and cyclophosphamide (100 mg/kg). Biometric parameters, DNA damage (comet and micronuclei), cell death, and splenic phagocytosis were evaluated. DNA docking was also performed to confirm the possible interactions of ZIM and 4-AA with DNA. 4-AA has been shown to have low genotoxic potential, increase the frequency of cell death, and activate phagocytosis. ZIM causes genomic and chromosomal damage in addition to causing cell death and activating phagocytosis. In association with chemotherapeutic agents, both 4-AA and ZIM have a chemopreventive effect and, therefore, reduce the frequency of DNA damage, cell death, and splenic phagocytosis. The association of 4-AA and ZIM with commercial chemotherapeutic agents increased the frequency of lymphocytes compared to chemotherapeutic agents alone. Molecular docking demonstrated that ZIM has more affinity for DNA than 4-AA and its precursors (1 and 2). This was confirmed by the lower interaction energy of the complex (−119.83 kcal/mol). ZIM can break the DNA molecule and, therefore, its chemotherapeutic effect can be related to DNA damage. It is considered that ZIM has chemotherapeutic potential. However, it should not be used in combination with cisplatin, doxorubicin, and cyclophosphamide as it reduces the effects of these drugs.

In vivo evaluation



ZIM possible mechanism of action



1. INTRODUCTION

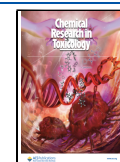
Cancer's high mortality rate is related to the limitations that the disease and its treatments impose due to high molecular heterogeneity and the development of resistance mechanisms of cancer cells during treatment with antineoplastics.¹ The accumulation of mutations in DNA can generate differentiated characteristics of normal cells, resulting in uncontrolled proliferation.² Conventional chemotherapy treatment uses drugs to damage DNA.^{3–5} These anticancer drug approaches target DNA/protein involved in the cell proliferation step.⁶ However, DNA-damage-inducing agents have side effects such as nausea, vomiting, diarrhea, and fever, affecting the patient's quality of life.^{7,8} Therefore, the search for new drugs with greater efficacy and fewer side effects is considered a research priority.

1,4-Dioxobutenyl and 4-aminoantipyrine moieties have a variety of pharmacological activities. They are viable candidates for the synthesis of new chemotherapeutic agents.^{7,9} More

specifically, the 1,4-dioxo-butenyl group has presented promising biological activities in the treatment of cancer.^{10,11} In fact, previous studies have shown that the synthesis of compounds that include fragments of 4-aminoantipyrine and maleimide has antibacterial and analgesic properties, as well as a promising cytotoxicity profile in preclinical models.^{12–16} Furthermore, previous studies have shown the use of cantharidin, a terpenoid secreted by many species of blister beetles,¹⁷ and its derivatives to treat leukemia, melanoma, liver, lung, and breast cancer (Figure 1).^{18,19}

Received: September 6, 2022

Published: December 22, 2022



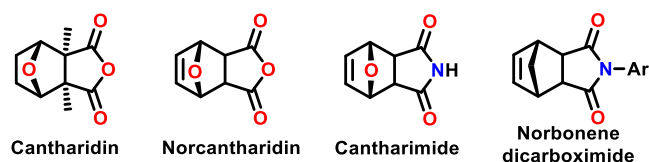


Figure 1. Cantharidin and derivatives.

Building on our earlier work,^{13,20,21} we first synthesized **ZIM**, a norbornene dicarboximide based on the 1,4-dioxo-butenyl/4-aminoantipyrine scaffold. We then evaluated the synthesized **ZIM** in a mouse model for its genotoxic and apoptotic potential alone and in combination with three chemotherapeutic agents currently used in clinical settings (cisplatin-**CIS**, doxorubicin-**DOX**, and cyclophosphamide-**CYP**). We also virtually studied and compared the ability of **4-AA**, **2**, **3**, and **ZIM** (Figure 2) to induce DNA damage. Next, we evaluated **ZIM** synthesized in a Swiss mouse model. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of **ZIM** and **4-AA** on DNA integrity, cell death induction, activation of splenic phagocytosis, and differential blood cell counts. The effects of these compounds in association with commercial chemotherapeutics (cisplatin-**CIS**, doxorubicin-**DOX**, and cyclophosphamide-**CYP**) were also evaluated. Finally, the possible interaction of **4-AA**, **ZIM**, and their precursors (**1** and **2**) with DNA was evaluated by molecular docking to describe the possible mechanism of action.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. ZIM Synthesis. Unless stated otherwise, reactions were performed in flame-dried glassware under a positive pressure of nitrogen using anhydrous solvents. CH_2Cl_2 was purified through a PPT/Glass Contour Solvent Purification System under argon. Hexane and Et_2O were freshly distilled from CaH_2 before use. Other commercial-grade reagents and solvents were used without further purification unless otherwise stated. Thin-layer chromatography (TLC) was performed using Merck silica gel 60 F254 precoated plates (0.25 mm), and visualization was done by UV or I_2 , KMnO_4 , CAM, or PMA staining. Flash chromatography was performed using Silicycle SilicaFlash F60 (40–63 μm particle size). NMR spectra were recorded on a 300 MHz Bruker Avance Spectrometer at the Federal University of Mato Grosso do Sul. ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts are reported as δ using residual solvent as an internal standard and expressed as singlet (s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), and multiplet (m). High-resolution mass spectral analyses were performed using a Bruker microTOFII ESI spectrometer. Melting points (mp) are uncorrected and were recorded on a Fisher–Johns melting point apparatus.

2.1.1. Synthesis of 2-(1,5-Dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-4,7-methanoisindole-1,3(2H)-dione (ZIM**).** To a rapidly stirred solution of maleic anhydride **1a** (3.00 g, 30.57 mmol) in acetone (15.00 mL) at room temperature was slowly added a solution of 4-aminoantipyrine **4-AA** (6.21 g, 30.57 mmol) in acetone (15 mL). The resulting reaction mixture was vigorously stirred at room temperature until the completion of the reaction as judged by TLC. The reaction mixture was filtered under vacuum, and the solid was washed with hexane (3×10 mL). The solid was dried over vacuum and recrystallized from ethanol/ H_2O (1:1) to afford the maleamic acid **1** (8.75 g, 95% yield) as a pale-yellow solid.

To a rapidly stirred solution of sodium acetate (0.33 g, 3.96 mmol) and acetic anhydride (3.36 mL, 35.73 mmol) was slowly added the maleamic acid **1** (3.00 g, 9.93 mmol) at room temperature. The resulting reaction mixture was vigorously stirred at 80°C until the completion of the reaction as judged by TLC. The organic compound was extracted with CHCl_3 (15 mL), treated with saturated NaHCO_3 solution (15 mL), washed with brine (20 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated in vacuo. The resulting solid was purified by recrystallization from hexane to afford the desired maleimide **3** (2.54 g, 95% yield) as a yellow solid.

Finally, to a rapidly stirred solution of maleimide **3** (1.00 g, 3.59 mmol) in CH_2Cl_2 (10 mL) was slowly added the cyclopentadiene (6.11 mL, 7.27 mmol) at room temperature. The resulting reaction mixture was vigorously stirred at room temperature until the completion of the reaction as judged by TLC. The reaction mixture was cooled down to room temperature. The solid was filtered, dried under vacuum, and purified by recrystallization from hexane to afford the desired polycyclic compound **ZIM** (1.00 g, 80% yield) as a white solid.

2.1.1.1. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm). 1.60 (d, 1H, $J_{\text{cis}} = 9.0$); 1.76 (d, 1H, $J_{\text{cis}} = 9.0$); 2.02 (s, 3H); 3.12 (s, 3H); 3.43 (m, 2H); 3.46 (m, 2H); 6.26 (s, 2H); 7.30 (m, 5H). **^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm):** 11.1; 35.3; 45.1; 46.4; 52.5; 102.3; 125.0; 127.5; 129.3; 134.1; 135.1; 151.7; 160.3; 176.3. **HRMS (ESI):** $[\text{M} + \text{Na}]^+$, $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$, calcd. 349.1426; found: 349.1429. Mp = 247°C .

2.2. Chemotherapy Drugs. **2.2.1. Chemotherapeutics.** Chemotherapeutics were obtained commercially and administered in a single dose, according to Berno et al.¹⁴ Doxorubicin (**DOX**) (Glenmark Farmacêutica Ltda, N° REG MS 1.1013.0232.002-4, Brazil) was diluted in distilled water and administered at a dose of 16 mg/kg body weight (p.c.) intraperitoneally (i.p.). Cisplatin (**CIS**) (ACCORD Farmacêutica, N° REG MS 1.5537.0002.003-7, Brazil) was administered at a dose of 6 mg/kg (p.c., i.p.). This compound was obtained in liquid form and did not require dilution. Cyclophosphamide (**CYP**) (Genuxal, Baxter Hospitalar Ltda, N° REG MS 1.00683.0168.003-1, Brazil) was diluted in distilled water and administered at a dose of 100 mg/kg (p.c., i.p.).

2.2.2. Chemotherapeutic Prototypes. **4-AA** was obtained from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (CAS-83-07-8). **4-AA** and **ZIM** were

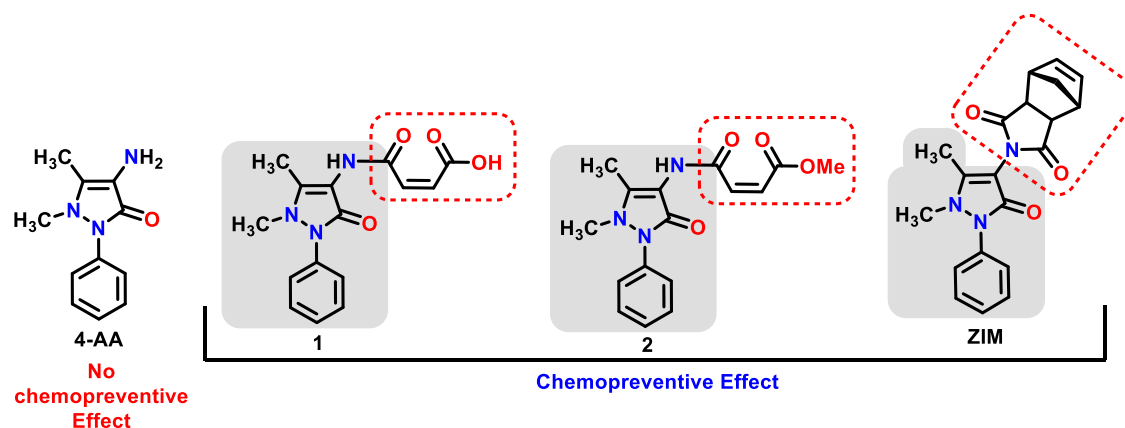


Figure 2. Chemopreventive effect comparison of compounds containing 4-AA and 1,4-dioxo-butenyl moieties. Gray: 4-aminoantipyrine moiety; red: 1,4-dioxobutenyl moieties. Compound **1** refers to ref 13, and compound **2** refers to ref 20.

dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and then diluted in saline with 5% glucose (the final DMSO concentration was 5%).¹⁴ The concentrations of 4-AA and ZIM (for effectiveness comparison) were 12, 24, and 48 mg/kg for each experiment. The dilution vehicle (saline solution with 5% glucose containing DMSO at a final concentration of 5%) was used as a negative control. All administrations were performed simultaneously by the intraperitoneal (i.p.) route, and the dilution vehicle proportion of 0.1 mL/10 g of body weight (b.w.) was maintained.

2.3. Experimental Design. The present study was approved by The Animal Ethics Committee of the Federal University of Mato Grosso do Sul, Brazil (protocol no. 966/2018) and conducted according to the guidelines of the Universal Declaration on Animal Welfare.

One hundred and forty adult male Swiss mice (8–10 weeks old; average weight of 35 g) were obtained from the State Agency of Sanitary Monitoring (known in Brazil by the Portuguese acronym IAGRO) and kept in polypropylene boxes with wood-shaving bedding. The animals were maintained under controlled temperature (22 ± 2 °C), relative humidity of $55 \pm 10\%$, and 12:12 h light-dark cycles. Mice were fed with commercial chow (Nuvital, Nuvilab, Brazil) and filtered water *ad libitum*.

Mice were acclimated for 7 days before they were divided randomly into 28 experimental groups ($n = 5$). Each group was assigned to a different treatment of chemotherapeutics (CHEMO); chemotherapeutic prototypes (CHEM-P); association of chemotherapeutics & chemotherapeutic prototypes (ASSOC) or the dilution vehicle (CONTROL) (Figure S1A).

Treatments were administered in a single dose via intraperitoneal injection (i.p.).¹⁴ CHEMO groups received either DOX, CIS, or CYP at 16, 6, or 100 mg/kg body weight (b.w.), respectively. CHEM-P received either 4-AA or ZIM at three different dosages: 12, 24, or 48 mg/kg (b.w.). The dilution vehicle of CHEM-P was administered at 0.1 mL/10 g (b.w., i.p.) as a replacement for treatment in the negative control group (Figure S1A).

Peripheral blood was collected every 24 h during the experimental period until they were euthanized at 72 h after treatment. Liver, kidney, and spleen samples were harvested (Figure S1B).

2.4. Biology Assays. **2.4.1. Comet Assay.** Single-cell gel electrophoresis (SCGE) was performed using a peripheral blood sample collected 24 h after treatment according to protocol²² with modifications.²³ Briefly, 100 cells/mouse were visually analyzed under a BIOVAL L2000A fluorescence microscope (BIOVAL, China) with 40× objective lens and a combination of blue excitation filter (420–490 nm) and 520 nm barrier filter.²⁴

2.4.2. Micronucleus Assay (MNT). Peripheral blood samples collected 24, 48, and 72 h after treatments were used to verify the presence of micronuclei in peripheral blood in mice according to the protocol previously described with modifications.²⁵ In brief, 20 μ L of the sample was deposited on a slide previously covered by 20 μ L of acridine orange [1 mg/mL] and kept in a freezer (-20 °C) until the analysis day. A total of 2000 cells/mouse were analyzed under a BIOVAL L2000A fluorescence microscope (BIOVAL, China) with 40× objective lens and a combination of blue excitation filter (420–490 nm) and 520 nm barrier filter.

2.4.3. Cell Death Assay. Liver and kidney samples were harvested after mice euthanasia and macerated in saline solution; 100 μ L of this sample suspension was smeared on a slide. After drying, the slides were fixed in Carnoy's Solution for 5 min and immersed in a decreasing gradient of ethanol (95% > 75% > 50% > 25%) before being washed with McIlvaine buffer for 5 min. The slides were stained with acridine orange [1 mg/mL] for 5 min and washed with McIlvaine buffer. DNA fragmentation patterns of 200 cells/mice were used to identify apoptotic cells under a BIOVAL L2000A fluorescence microscope (BIOVAL, China) with 40× objective lens and a combination of blue excitation filter (420–490 nm) and 520 nm barrier filter.^{26,27}

2.4.4. Phagocytosis Assay. A fragment of approximately one-third of the total spleen size was harvested after euthanasia and macerated in saline solution; 100 μ L of this suspension was smeared on a slide previously covered by 20 μ L of acridine orange [1 mg/mL].²⁵

A total of 200 cells/mice were analyzed under a BIOVAL L2000A fluorescence microscope (BIOVAL, China) with 40× objective lens and a combination of blue excitation filter (420–490 nm) and 520 nm barrier filter to determine the presence and/or absence of phagocytosis.²³

2.4.5. Damage Reduction Percentage (DR). DR is used to evaluate the chemopreventive capacity of a compound associated with a known genotoxic agent.^{28,29} In the present study, the DR, in addition to the chemopreventive effectiveness study, was calculated for statistically significant parameters of phagocytosis and apoptosis assay according to the equation below

$$\text{DR (\%)} = \left(\frac{\text{positive control mean} - \text{compounds association mean}}{\text{positive control mean} - \text{negative control mean}} \right) \times 100$$

Negative DR was interpreted as an increase of damage, as described previously.²⁷

2.4.6. Statistical Analysis. The Student *t*-test determined the statistical significance of the parametric data, and results were expressed as mean $\pm$ standard deviation. The significance level was $p < 0.05$, and the statistical test was performed using the GraphPad Prism 3.02 software (GraphPad Software, Inc.).

2.5. DNA Docking. **2.5.1. Computational Details.** The virtual protocol, including molecular docking, was performed on the DELL Workstation computer, with Intel Xeon E5–1660 processor, 3.3 GHz, 4 CPUs, NVIDIA GeForce RTX 2060 graphics card, RAM 8 GB, under the Windows operating system.

2.5.2. Protein Preparation. The X-ray diffraction-based crystal structure of a B-DNA Dodecamer was retrieved from Protein Data Bank³⁰ (PDB ID: 1BNA) with 1.9 Å of resolution for the crystal structure of the synthetic DNA dodecamer d (CpGpCpGpApTpTpCpGpCpG). The water molecules were removed by operating BIOVIA Discovery Studio v4.5 (Accelrys) (Figure 3).

2.5.3. Molecular Docking. 4-AA, 1, 2, and ZIM were built in ChemDraw. All geometries were virtually constructed and optimized in molecular mechanics (MM+) and semiempirical Austin Model 1 (AM1) methods using HyperChem 7 program.³¹ The output files were converted to input files.mol2 of the Discovery Studio BIOVIA program using Open Babel,³² and then converted to .pdb files as input files to HDock.³³ The HDock web server program was used to predict *in silico* the best orientation and conformation of the compounds to the BDNA.

2.5.4. Target Selection and Molecular Docking Simulations. The synthetic β -DNA Dodecamer crystallized structure was obtained from Protein Data Bank³⁰ (PDB ID: 1BNA). Then, docking simulations were performed for each inhibitor candidate into the corresponding target. This procedure was performed using HDock web server³³ and the resulting docking score was evaluated.

Prior to docking using HDock, the B-DNA and the compounds were uploaded as .pdb files into the web server. The complexes generated by HDock were selected using the best model between the results, which presented the best docking score. The complex structures of the protein site (.pdb) and the ligands (.pdb) were inserted in the BIOVIA Discovery Studio visualizer program to detail the interactions between the ligands and the participating DNA bases.

3. RESULTS

3.1. Synthesis of 2-(1,5-Dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-4,7-methanoisindole-1,3(2H)-dione (ZIM). Scheme 1 shows the synthetic route of ZIM.

Maleic acid 1 was obtained by the ring-opening reaction of maleic anhydride 1a and 4-AA. The reaction of 1 with sodium acetate and acetic anhydride provided the maleimide 3. Finally, the 4 + 2 cycloaddition reaction of 3 and cyclopentadiene provided the polycyclic ZIM.

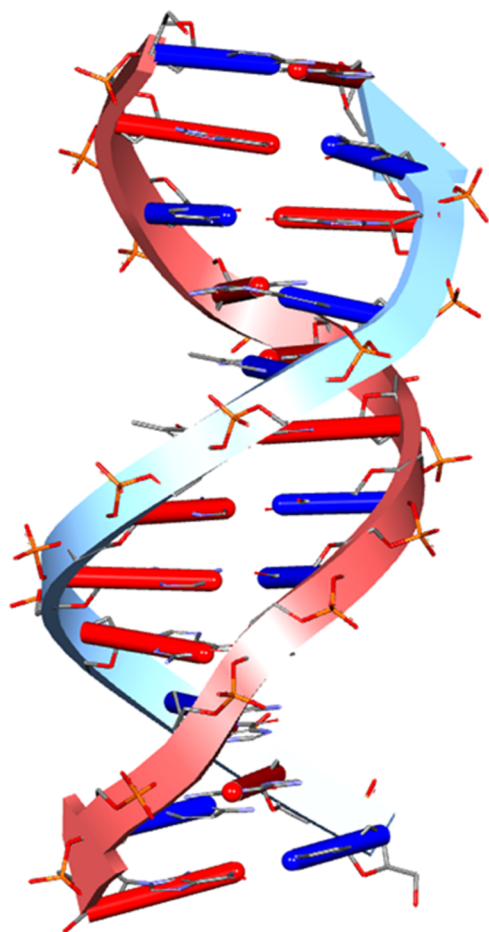


Figure 3. Visualization of Structure of B-DNA Dodecamer (1BNA) after removing water molecules using Discovery Studio BIOVIA. Different colors represent DNA chains: blue (Chain A), orange (bases of Chain A), red (Chain B), and cyan (bases of Chain B).

3.2. Biology Assays. **3.2.1. Genotoxicity Assessment: DNA Damage.** CIS did not increase significantly ($p > 0.05$) the frequency of damage cells (only 1.5 $\times$ increase) or in the DNA damage score (only 1.61 $\times$ increase). DOX and CYP increased ($p < 0.05$) both damage cell frequency and the DNA damage score. The increase in the frequency of damage cells was 2.58 $\times$ and 4.53 $\times$, and the DNA damage score was 3.11 $\times$ and 5.32 $\times$ for DOX and CYP, respectively (Figure 4A). 4-AA did not increase ($p > 0.05$) the frequency of damage cells. However, there was a significant increase ($p < 0.05$) in DNA damage score at the highest dose (48 mg/kg). ZIM increased ($p < 0.05$) the

frequency of genomic damage for the three tested doses. The observed increase was 4.03 $\times$, 4.67 $\times$, and 3.55 $\times$ for 12, 24, and 48 mg/kg, respectively. For the damage score, the increase was 4.41 $\times$, 5.16 $\times$, and 3.78 $\times$ for the same doses, respectively (Figure 4A).

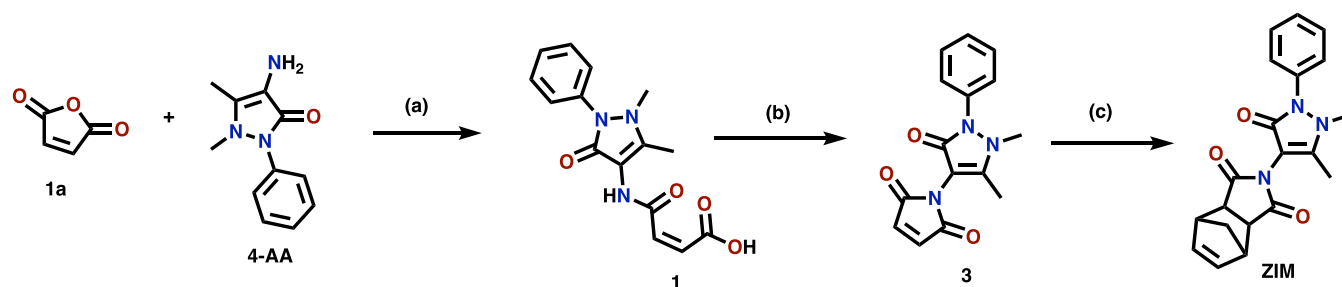
In association with CIS, 4-AA did not change significantly ($p > 0.05$) the frequency of damaged cells. However, an increase ($p < 0.05$) in the score was observed for the highest dose (48 mg/kg) (Figure 4B). For this dose, the damage increment was 67.74% (Figure 4C). ZIM, in association with CIS, did not change ($p > 0.05$) the frequency of damage cells or the DNA damage score for any of the doses tested (Figure 4B). The association did not show a significant percentage of reduction/increase in damage since the number of damage cells did not vary significantly.

In association with DOX, 4-AA reduced ($p < 0.05$) the frequency of damage cells for the highest dose (48 mg/kg). 4-AA also reduced ($p < 0.05$) the DNA damage score for the two highest doses (24 and 48 mg/kg) (Figure 4D). The damage reduction percentages were 34.69 and 55.10% for 24 and 48 mg/kg, respectively (Figure 4E). In the association of ZIM with DOX, a reduction ($p < 0.05$) in the frequency of damage cells was observed for doses of 24 and 48 mg/kg, and a reduction in the DNA damage score only for 48 mg/kg (Figure 4D). The damage reduction percentages were 26.94 and 47.35% for 24 and 48 mg/kg, respectively (Figure 4E).

In association with CYP, 4-AA reduced ($p < 0.05$) the frequency of damage cells and the DNA damage score for all doses (Figure 4F). The damage reduction percentage was 52.97, 58.90, and 46.12% for 12, 24, and 48 mg/kg, respectively (Figure 4G). ZIM did not change ($p > 0.05$) the frequency of damage cells or the DNA damage score at any of the doses (Figure 4F).

3.2.2. Genotoxicity Assessment: Chromosome Damage. CIS, DOX, and CYP increased the frequency of micronuclei in 8.05 $\times$, 4.16 $\times$, and 8.37 $\times$ for 24 h; 5.50 $\times$, 3.26 $\times$, and 4.81 $\times$ for 48 h; and 2.18 $\times$, 9.76 $\times$ and 13.23 $\times$ for 72 h, respectively (Figure 5A). 4-AA increased ($p < 0.05$) the frequency of micronuclei for the highest dose (48 mg/kg) in 24 h (1.79 $\times$) and the two lowest doses (12 and 24 mg/kg) in 72 h (1.82 $\times$ and 1.94 $\times$, respectively). After 48 h, a reduction (2.07 $\times$; $p < 0.05$) was observed in the frequency of micronuclei for 12 mg/kg. ZIM increased ($p < 0.05$) the micronucleus frequency for the three doses in all evaluation times, except for the 48 mg/kg dose in 48 h evaluation. In a 24 h period, the increases were 1.60 $\times$, 2.78 $\times$, and 2.61 $\times$; for 48 h, the increases were 1.45 $\times$, 2.15 $\times$, and 1.41 $\times$; and for 72 h, the increases were 4.71 $\times$, 4.05 $\times$, and 4.47 $\times$ for 12, 24, and 48 mg/kg doses, respectively (Figure 5A).

Scheme 1. Synthetic Strategy for Obtaining the Selected Compounds^a



^a(a) acetone, rt, 1 h, 95% yield; (b) acetic anhydride, sodium acetate, rt, 1 h, 95% yield; (c, d) cyclopentadiene, rt, 30 min, 80% yield.

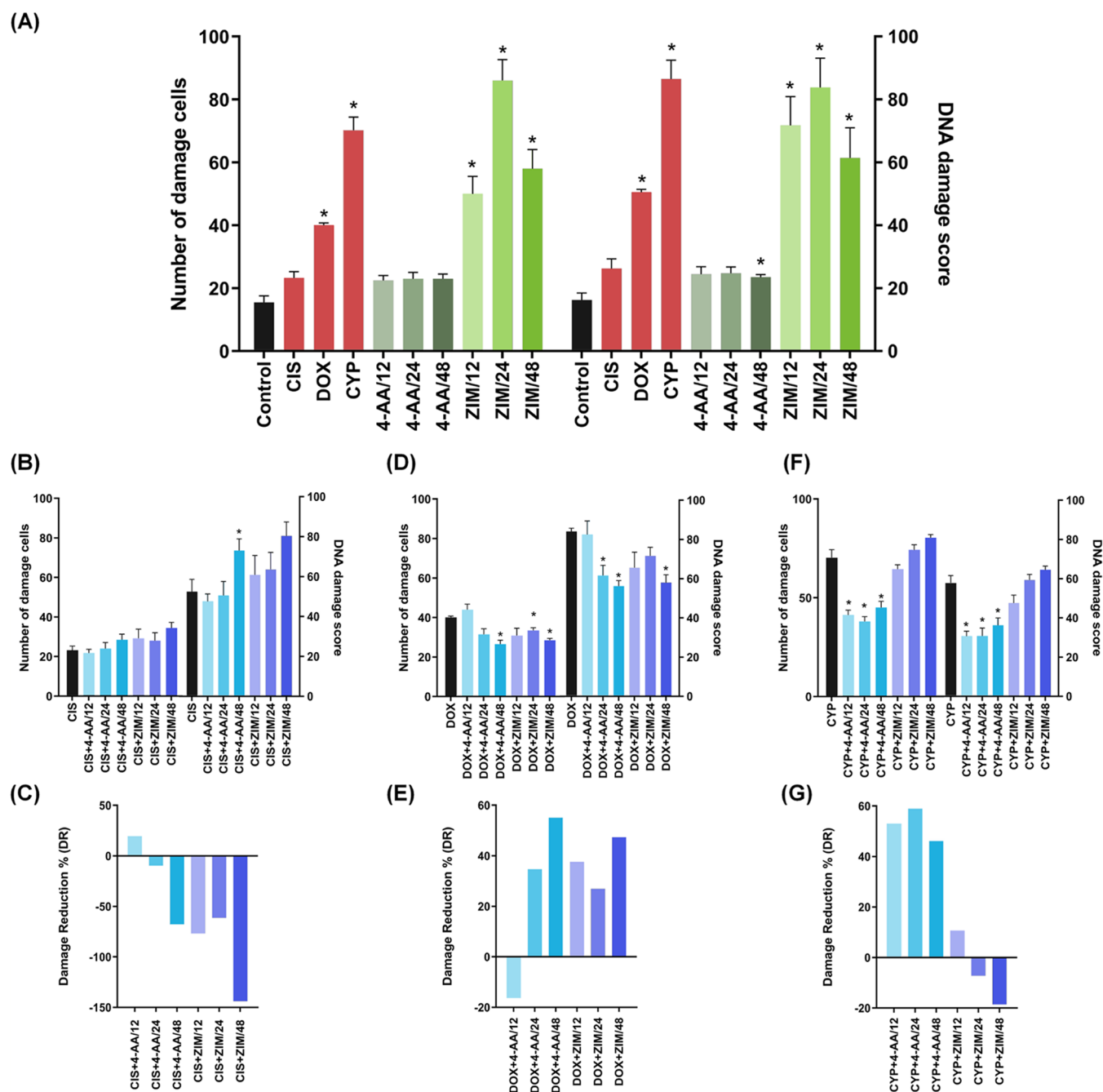


Figure 4. Genotoxicity assessment: DNA damage (Comet Assay and percentage of DR). **A.** Number of damage cells and the DNA damage score for chemotherapeutics (CIS, DOX, or CYP) and chemotherapeutic prototypes (4-AA or ZIM) treatments with the vehicle dilution treatment as control. **B.** Number of damage cells and the DNA damage score for CIS combined with chemotherapeutic prototypes (CIS+4-AA or CIS+ZIM) treatments with CIS group as control. **C.** Damage Reduction percentage of CIS combined with chemotherapeutic prototypes (CIS+4-AA or CIS+ZIM) groups. **D.** Number of damage cells and the DNA damage score for DOX combined with chemotherapeutic prototypes (DOX+4-AA or DOX+ZIM) treatments with the DOX group as control. **E.** Damage reduction percentage of DOX combined with chemotherapeutic prototypes (DOX+4-AA or DOX+ZIM) groups. **F.** Number of damage cells and the DNA damage score for CYP combined with chemotherapeutic prototypes (CYP+4-AA or CYP+ZIM) treatments with CYP group as control. **G.** Damage Reduction percentage of CYP combined with chemotherapeutic prototypes (CYP+4-AA or CYP+ZIM) groups. Legend: CIS = cisplatin; DOX = doxorubicin; CYP = cyclophosphamide; * = $p < 0.05$ (T-Student).

In association with CIS, 4-AA reduced ($p < 0.05$) the frequency of micronuclei for all doses at all evaluated times (Figure 5B), and the damage reduction percentages ranged from 46.09 to 58.21% (Figure 5C). These results demonstrate the chemopreventive effects of 4-AA over CIS at all doses. On the other hand, ZIM showed a chemopreventive effect through the reduction ($p < 0.05$) of the frequency of micronuclei for all doses

at 24 and 72 h (Figure 5B), and the percentages of damage reduction ranged from 38.36 to 83.26% (Figure 5C). At 48 h, chemopreventive activity ($p < 0.05$) was observed only for the intermediate dose (Figure 5B), and the percentage of damage reduction was 42.39% (Figure 5C). In association with DOX, 4-AA reduced ($p < 0.05$) the frequency of micronuclei only for the lowest and highest doses at 24 h (Figure 5D), and the damage

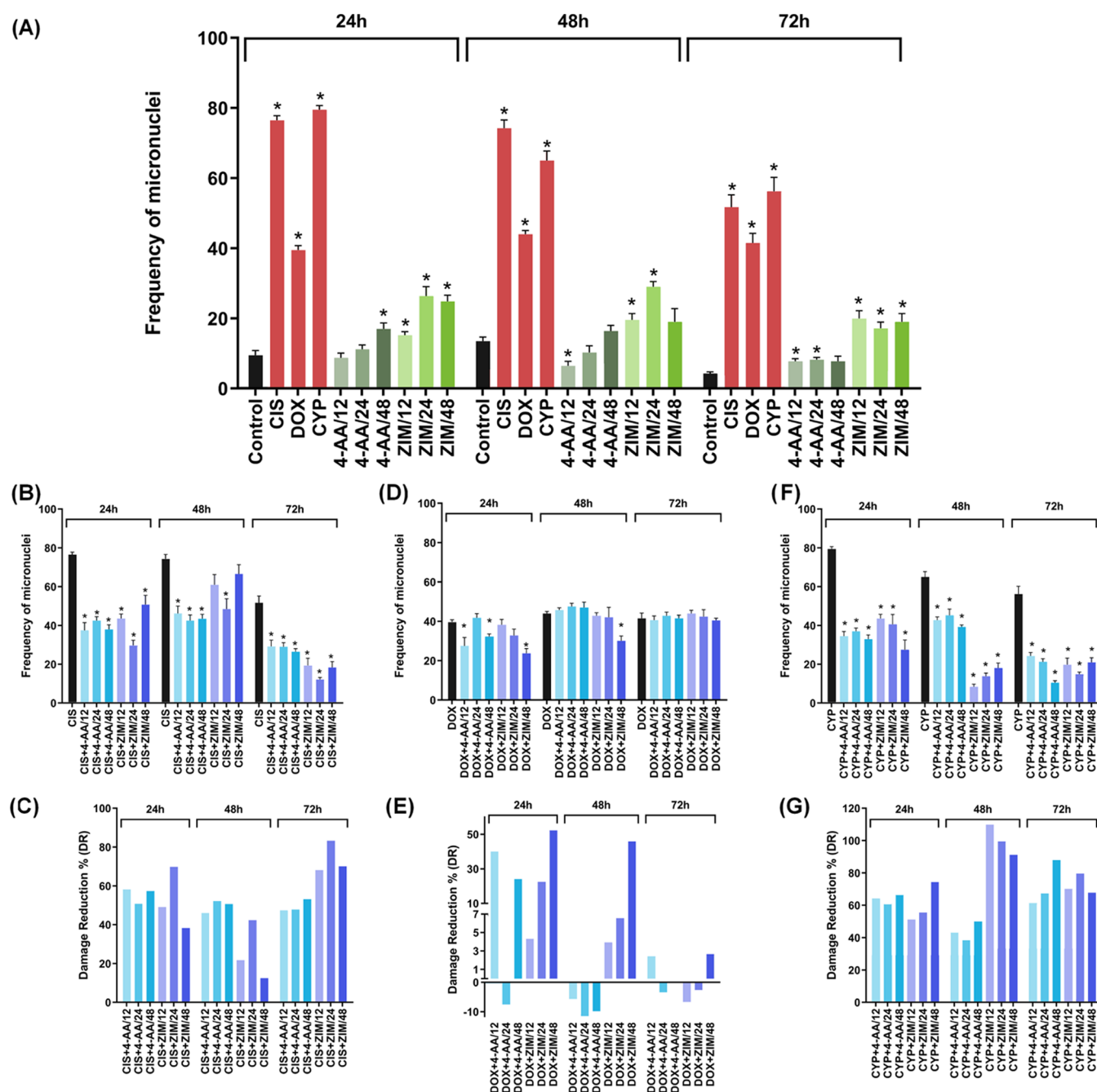


Figure 5. Genotoxicity assessment: Chromosome damage (MNT assay and percentage of DR). **A.** Frequency of micronuclei for chemotherapeutics (CIS, DOX, or CYP) and chemotherapeutic prototypes (4-AA or ZIM) treatments with the vehicle dilution treatment as control. **B.** Frequency of micronuclei for CIS combined with chemotherapeutic prototypes (CIS+4-AA or CIS+ZIM) treatments with CIS group as control. **C.** Damage Reduction percentage of CIS combined with chemotherapeutic prototypes (CIS+4-AA or CIS+ZIM) groups. **D.** Frequency of micronuclei for DOX combined with chemotherapeutic prototypes (DOX+4-AA or DOX+ZIM) treatments with DOX group as control. **E.** Damage Reduction percentage of DOX combined with chemotherapeutic prototypes (DOX+4-AA or DOX+ZIM) groups. **F.** Frequency of micronuclei for CYP combined with chemotherapeutic prototypes (CYP+4-AA or CYP+ZIM) treatments with CYP group as control. **G.** Damage Reduction percentage of CYP combined with chemotherapeutic prototypes (CYP+4-AA or CYP+ZIM) groups. Legend: CIS = cisplatin; DOX = doxorubicin; CYP = cyclophosphamide; * = $p < 0.05$ (T-Student).

reduction percentages were 40.00 and 24.17% for 12 and 48 mg/kg, respectively (Figure 5E). ZIM reduced ($p < 0.05$) the frequency of micronuclei only at the highest dose at 24 and 48 h (Figure 5D), and the percentages of damage reduction were 52.33 and 45.90, respectively (Figure 5E). In association with CYP, 4-AA showed a chemopreventive effect ($p < 0.05$) for all doses at all evaluated times (Figure 5F), and the percentages of damage reduction ranged from 38.35 to 87.98% (Figure 5G).

ZIM had the same effect (Figure 5F), and the damage reduction percentages ranged from 51.21 to 109.90% (Figure 5G). The percentage of damage reduction above 100% indicates that ZIM for 12 mg/kg at 48 h also reduced basal damage, which means it reduced the basal frequency of micronuclei compared to the frequency of the negative control group (Figure 5G).

3.2.3. Cell Death Assay. CIS, DOX, and CYP increased ($p < 0.05$) the frequency of cell death in liver and kidney. The

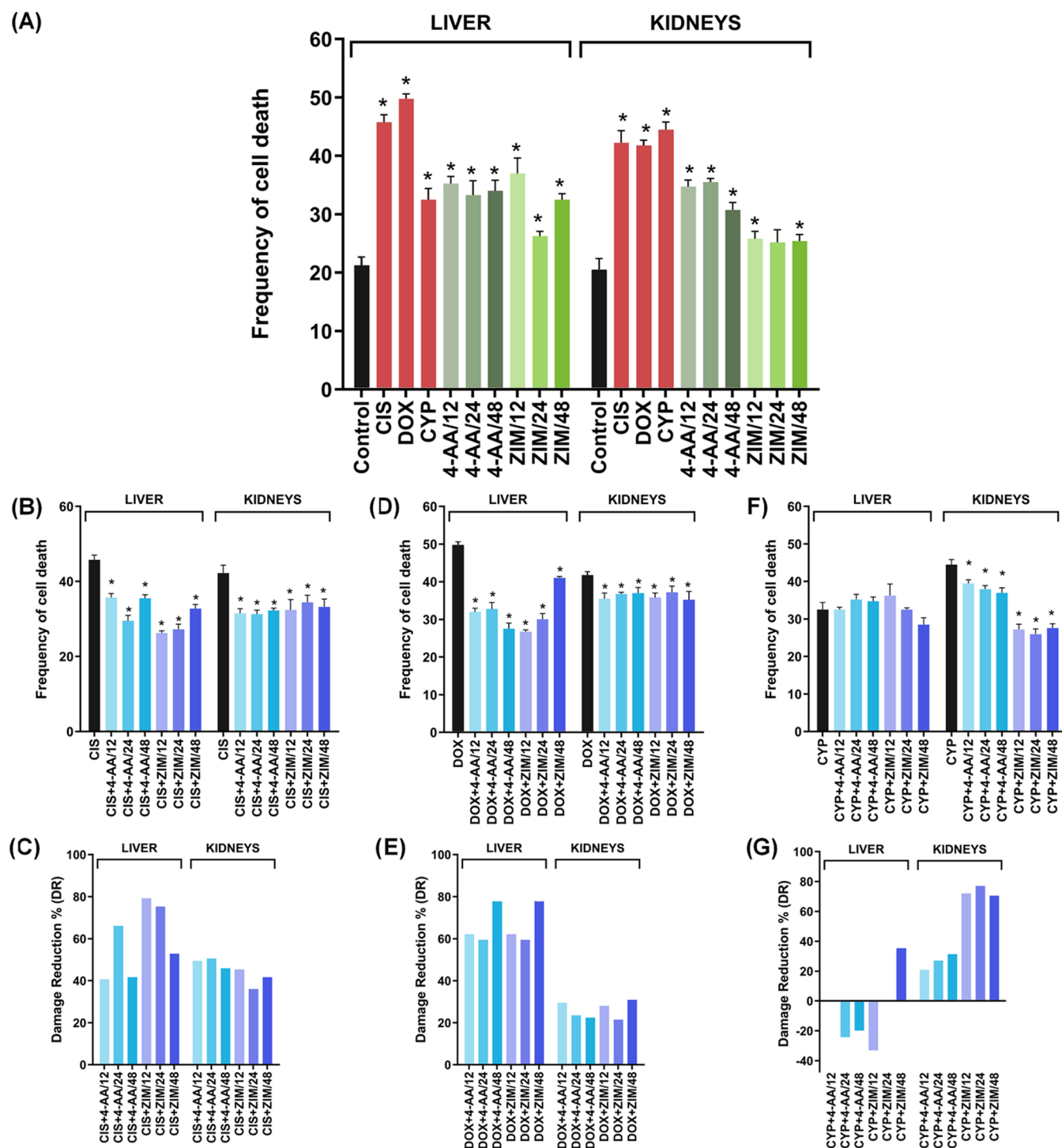


Figure 6. Cell death assay and percentage of DR. **A.** Frequency of cell death for chemotherapeutics (CIS, DOX, or CYP) and chemotherapeutic prototypes (4-AA or ZIM) treatments with the vehicle dilution treatment as control. **B.** Frequency of cell death for CIS combined with chemotherapeutic prototypes (CIS+4-AA or CIS+ZIM) treatments with CIS group as control. **C.** Damage Reduction percentage of CIS combined with chemotherapeutic prototypes (CIS+4-AA or CIS+ZIM) groups. **D.** Frequency of cell death for DOX combined with chemotherapeutic prototypes (DOX+4-AA or DOX+ZIM) treatments with DOX group as control. **E.** Damage Reduction percentage of DOX combined with chemotherapeutic prototypes (DOX+4-AA or DOX+ZIM) groups. **F.** Frequency of cell death for CYP combined with chemotherapeutic prototypes (CYP+4-AA or CYP+ZIM) treatments with CYP group as control. **G.** Damage Reduction percentage of CYP combined with chemotherapeutic prototypes (CYP+4-AA or CYP+ZIM) groups. Legend: CIS = cisplatin; DOX = doxorubicin; CYP = cyclophosphamide; * = $p < 0.05$ (T-Student).

increase of cell death in liver was 2.16 $\times$, 2.35 $\times$, and 1.53 $\times$, and in kidney was 2.06 $\times$, 2.03 $\times$, and 2.17 $\times$ for CIS, DOX, and CYP, respectively (Figure 6A).

4-AA increased ($p < 0.05$) the frequency of cell death in liver and kidney for all doses. The liver increase was 1.67 $\times$, 1.57 $\times$,

and 1.61 $\times$, and the kidney increase was 1.69 $\times$, 1.73 $\times$, and 1.50 $\times$ for 12, 24, and 48 mg/kg doses, respectively. ZIM also increased ($p < 0.05$) the frequency of cell death in the liver and kidneys for all concentrations, except for the 24 mg/kg dose in kidney. The liver increase was 1.75 $\times$, 1.24 $\times$, and 1.54 $\times$, and kidney was

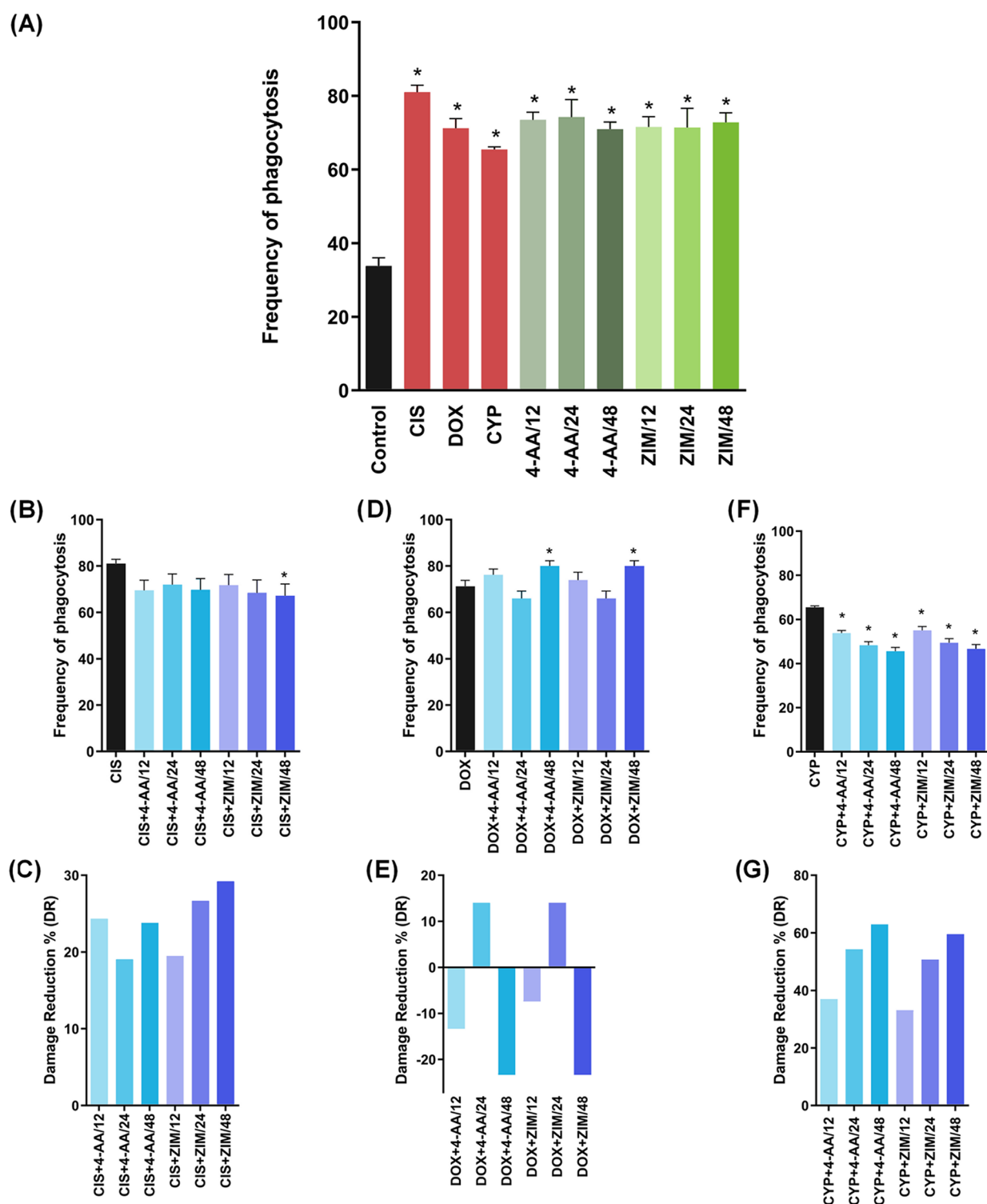


Figure 7. Frequency of splenic phagocytosis percentage of DR. **A.** Frequency of phagocytosis for chemotherapeutics (CIS, DOX, or CYP) and chemotherapeutic prototypes (4-AA or ZIM) treatments with the vehicle dilution treatment as control. **B.** Frequency of cell death for CIS combined with chemotherapeutic prototypes (CIS+4-AA or CIS+ZIM) treatments with CIS group as control. **C.** Damage reduction percentage of CIS combined with chemotherapeutic prototypes (CIS+4-AA or CIS+ZIM) groups. **D.** Frequency of phagocytosis for DOX combined with chemotherapeutic prototypes (DOX+4-AA or DOX+ZIM) treatments with DOX group as control. **E.** Damage reduction percentage of DOX combined with chemotherapeutic prototypes (DOX+4-AA or DOX+ZIM) groups. **F.** Frequency of phagocytosis for CYP combined with chemotherapeutic prototypes (CYP+4-AA or CYP+ZIM) treatments with CYP group as control. **G.** Damage reduction percentage of CYP combined with chemotherapeutic prototypes (CYP+4-AA or CYP+ZIM) groups. Legend: CIS = cisplatin; DOX = doxorubicin; CYP = cyclophosphamide; * = $p < 0.05$ (T-Student).

1.26×, 1.23×, and 1.24× for 12, 24, and 48 mg/kg, respectively (Figure 6A).

4-AA reduced ($p < 0.05$) the frequency of cell death in liver induced by CIS, DOX, and in kidney induced by CIS, DOX, and

Table 1. Differential Blood Cell Count Results for Treatments with 4-AA

cell types		lymphocytes (Ref: 55–95%)	neutrophils (Ref: 10–40%)	basophils (Ref: 0–0.3%)	eosinophils (Ref: 0–0.4%)	monocytes (Ref: 0.1–3.5%)
CHEM-P	negative control	78.50 ± 3.23	23.75 ± 5.12	0.50 ± 0.29	1.50 ± 0.65	2.25 ± 0.85
	4-AA[12 mg/kg]	76.25 ± 2.14 ^a	15.75 ± 2.46 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	1.75 ± 0.75 ^a	1.00 ± 0.7 ^a
	4-AA[24 mg/kg]	81.50 ± 0.87 ^a	13.50 ± 1.44 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.71 ^a	2.00 ± 0.71 ^a
	4-AA[48 mg/kg]	70.50 ± 1.66 ^a	24.25 ± 1.65 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	2.50 ± 0.29 ^a	1.75 ± 0.48 ^a
CIS COMB	CIS[6 mg/kg]	64.50 ± 1.94 ^{a*}	28.50 ± 1.94 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	2.25 ± 0.25 ^a	0.25 ± 0.25 ^a
	CIS[6 mg/kg] + 4-AA[12 mg/kg]	76.00 ± 2.04 ^{b*}	19.50 ± 1.44 ^{b*}	0.25 ± 0.25 ^b	2.50 ± 0.65 ^b	1.25 ± 0.95 ^b
	CIS[6 mg/kg] + 4-AA[24 mg/kg]	74.50 ± 3.12 ^{b*}	22.00 ± 2.35 ^b	0.25 ± 0.25 ^b	2.00 ± 0.41 ^b	1.25 ± 0.75 ^b
	CIS[6 mg/kg] + 4-AA[48 mg/kg]	67.75 ± 3.86 ^b	22.50 ± 2.53 ^b	1.00 ± 0.71 ^b	1.75 ± 0.48 ^b	1.50 ± 0.65 ^b
DOX COMB	DOX[16 mg/kg]	57.25 ± 6.36 ^{a*}	26.25 ± 4.80 ^a	0.25 ± 0.25 ^a	3.50 ± 1.94 ^a	2.00 ± 0.58 ^a
	DOX[16 mg/kg] + 4-AA[12 mg/kg]	75.25 ± 2.17 ^{c*}	21.75 ± 2.32 ^c	0.00 ± 0.00 ^c	1.00 ± 0.41 ^c	1.25 ± 0.25 ^c
	DOX[16 mg/kg] + 4-AA[24 mg/kg]	64.50 ± 5.17 ^c	31.75 ± 4.33 ^d	0.00 ± 0.00 ^c	2.00 ± 1.08 ^c	2.00 ± 0.58 ^c
	DOX[16 mg/kg] + 4-AA[48 mg/kg]	78.25 ± 2.81 ^{c*}	17.75 ± 1.55 ^c	0.75 ± 0.48 ^c	1.50 ± 0.25 ^c	1.50 ± 0.96 ^c
CYP COMB	CYP[100 mg/kg]	60.50 ± 2.87 ^{a*}	34.00 ± 2.80 ^a	0.75 ± 0.48 ^a	2.25 ± 0.85 ^a	2.50 ± 0.87 ^a
	CYP[100 mg/kg] + 4-AA[12 mg/kg]	67.50 ± 3.97 ^d	28.25 ± 3.04 ^d	0.50 ± 0.29 ^d	1.25 ± 0.48 ^d	1.25 ± 0.48 ^d
	CYP[100 mg/kg] + 4-AA[24 mg/kg]	75.25 ± 2.17 ^{d*}	21.75 ± 1.38 ^{d*}	0.67 ± 0.29 ^d	1.00 ± 0.00 ^d	1.00 ± 0.00 ^d
	CYP[100 mg/kg] + 4-AA[48 mg/kg]	80.00 ± 2.52 ^{d*}	18.00 ± 2.12 ^{d*}	0.25 ± 0.25 ^d	1.25 ± 0.25 ^d	1.00 ± 0.41 ^d

^aData presented in mean ± SD. Legends: Ref = reference value; 4-AA = 4-aminoantipyrine; CHEM-P = chemotherapeutic prototype; CIS = cisplatin; DOX = doxorubicin; CYP = cyclophosphamide; COMB = combination of chemotherapeutic & chemotherapeutic prototype; statistically compared to the negative control group. ^bStatistically compared to the DOX group. ^cStatistically compared to the CIS group. ^dStatistically compared to the CF group; *statistically significant difference ($p < 0.05$; t -Student); * = $p < 0.05$ (T -Student).

CYP (Figure 6B,D,F). The percentage of damage reduction for CIS in liver was 40.65, 66.06, and 41.67% (Figure 6C) and for DOX was 62.06, 59.44, and 77.80% (Figure 6E) for 12, 24, and 48 mg/kg, respectively. The damage reduction percentage for CYP was 0, −24.23, and −19.82%. These values do not have statistical significance ($p > 0.05$) (Figure 6G). The damage reduction percentage for CIS in kidney was 49.42, 50.57, and 45.98% (Figure 6C); that for DOX was 29.41, 23.53, and 22.35% (Figure 6E); and that for CYP was 20.83, 27.08, and 31.25% (Figure 6G) for 12, 24, and 48 mg/kg, respectively.

ZIM reduced ($p < 0.05$) the frequency of cell death in the liver induced by CIS and DOX, and in kidney induced by CIS, DOX, and CYP (Figure 6B,D,F). The damage reduction percentage for CIS in liver was 79.27, 75.20, and 52.84% (Figure 6C), and for DOX was 62.06, 59.44, and 77.80% (Figure 6E) for 12, 24, and 48 mg/kg, respectively. The damage reduction percentage for CYP was −33.04, 0, and 35.24%. However, there was no significant reduction ($p > 0.05$) (Figure 6G). The damage reduction percentage for CIS in kidney was 45.29, 36.09, and 41.61% (Figure 6C); for DOX was 28.00, 21.41, and 30.82% (Figure 6E); and for CYP was 72.08, 77.08, and 70.42% (Figure 6G) for 12, 24, and 48 mg/kg, respectively.

3.2.4. Splenic Phagocytosis. CIS, DOX, and CYP increased ($p < 0.05$) the frequency of splenic phagocytosis by 2.4×, 2.11×, and 1.94× for 12, 24, and 48 mg/kg, respectively (Figure 7A). 4-AA increased ($p < 0.05$) splenic phagocytosis by 2.18×, 2.20×, and 2.10× for 12, 24, and 48 mg/kg, respectively. ZIM also increased ($p < 0.05$) by 2.12×, 2.11×, and 2.16× for the same doses, respectively (Figure 7A). 4-AA did not interfere ($p > 0.05$) the frequency of CIS-induced splenic phagocytosis (Figure 7B,C). The 48 mg/kg dose of 4-AA increased ($p < 0.05$) splenic phagocytosis when associated with DOX (Figure 7D). The damage increment was 23.33% (Figure 7E). All concentrations of 4-AA associated with CYP reduced ($p < 0.05$) the frequency of splenic phagocytosis (Figure 7F), and the percentages of damage reduction were 37.01, 54.33, and 62.99% for 12, 24, and 48 mg/kg, respectively (Figure 7G).

Only the highest dose of ZIM reduced ($p < 0.05$) the frequency of splenic phagocytosis when associated with CIS (Figure 7B,C) and increased ($p < 0.05$) when associated with DOX (Figure 7D). The damage reduction and percentage increase were around 29.21 and 23.33% for CIS and DOX, respectively (Figure 7C,E). In association with CYP, a reduction ($p < 0.05$) of splenic phagocytosis was observed (Figure 7F) in 31.49, 50.71, and 59.53% for 12, 24, and 48 mg/kg, respectively (Figure 7G).

3.2.5. Differential Blood Cell Count. A preliminary analysis showed that the negative control group had basophils and eosinophils above the reference values. The same result was observed for 4-AA when the animals were treated with CIS and 48 mg/kg 4-AA when the animals were treated with DOX and 48 mg/kg 4-AA. The animals treated with CYP and the association of CYP with the two lowest doses of 4-AA (12 and 24 mg/kg) also showed a frequency of basophils above the reference value. However, no significant differences were found ($p > 0.05$) between the groups when applying the statistical analysis. It was also observed that all animals from the different experimental groups presented a frequency of basophils above the reference values, including the negative control. No significant differences ($p > 0.05$) were found when applying the statistical analysis. These facts suggest that these alterations are unrelated to the treatments (Table 1).

In addition to the increase in basophils and eosinophils in the negative control group, the treatment of the animals with ZIM in association with CIS, DOX, and CYP, regardless of the dose of ZIM, also showed a frequency of basophils above the reference values. No significant difference ($p > 0.05$) was observed after statistical analysis, which suggests that this result is not due to the treatments. For eosinophils, all groups had a frequency above the reference values, except for the DOX associated with the lowest dose of ZIM (12 mg/kg) and CYP associated with ZIM (48 mg/kg). After statistical analysis, no significant difference ($p > 0.05$) was observed. For ZIM alone (12 mg/kg), CIS associated with ZIM (48 mg/kg), and DOX associated

Table 2. Differential Blood Cell Count Results for Treatments with ZIM

cell types		lymphocytes (Ref: 55–95%)	neutrophils (Ref: 10–40%)	basophils (Ref: 0–0.3%)	eosinophils (Ref: 0–0.4%)	monocytes (Ref: 0.1–3.5%)
CHEM-P	negative control	78.50 ± 3.23	23.75 ± 5.12	0.50 ± 0.29	1.50 ± 0.65	2.25 ± 0.85
	ZIM[12 mg/kg]	67.60 ± 1.68 ^{a*}	26.20 ± 0.55 ^a	0.20 ± 0.22 ^a	2.00 ± 0.61 ^a	4.00 ± 1.46 ^a
	ZIM[24 mg/kg]	76.80 ± 4.44 ^a	17.20 ± 3.42 ^a	0.40 ± 0.27 ^a	3.00 ± 1.17 ^a	2.60 ± 1.48 ^a
	ZIM[48 mg/kg]	69.20 ± 5.52 ^a	24.20 ± 4.46 ^a	0.40 ± 0.27 ^a	2.80 ± 0.65 ^a	3.20 ± 0.82 ^a
CIS COMB	CIS[6 mg/kg]	64.50 ± 1.94 ^{a*}	28.50 ± 1.94 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	2.25 ± 0.25 ^a	0.25 ± 0.25 ^a
	CIS[6 mg/kg] + ZIM[12 mg/kg]	82.80 ± 2.77 ^{b*}	11.60 ± 3.75 ^{b*}	0.80 ± 0.65 ^b	1.80 ± 0.82 ^b	3.00 ± 1.27 ^b
	CIS[6 mg/kg] + ZIM[24 mg/kg]	77.40 ± 3.01 ^{b*}	16.60 ± 3.01 ^{b*}	0.80 ± 0.42 ^b	4.20 ± 1.52 ^b	1.00 ± 1.12 ^b
	CIS[6 mg/kg] + ZIM[48 mg/kg]	64.60 ± 4.86 ^b	27.60 ± 5.29 ^b	1.80 ± 0.82 ^b	2.00 ± 0.71 ^b	4.00 ± 1.46 ^b
DOX COMB	DOX[16 mg/kg]	57.25 ± 6.36 ^{a*}	26.25 ± 4.80 ^a	0.25 ± 0.25 ^a	3.50 ± 1.94 ^a	2.00 ± 0.58 ^a
	DOX[16 mg/kg] + ZIM[12 mg/kg]	80.60 ± 1.86 ^{c*}	15.80 ± 1.56 ^c	1.80 ± 0.65 ^c	0.40 ± 0.45 ^c	1.40 ± 0.67 ^c
	DOX[16 mg/kg] + ZIM[24 mg/kg]	77.00 ± 2.55 ^{c*}	15.80 ± 1.43 ^c	2.00 ± 1.00 ^c	1.00 ± 0.50 ^c	4.20 ± 1.60 ^c
	DOX[16 mg/kg] + ZIM[48 mg/kg]	76.80 ± 2.51 ^{c*}	17.20 ± 3.07 ^c	1.60 ± 0.67 ^c	1.40 ± 1.04 ^c	3.00 ± 1.62 ^c
CYP COMB	CYP[100 mg/kg]	60.50 ± 2.87 ^{a*}	34.00 ± 2.80 ^a	0.75 ± 0.48 ^a	2.25 ± 0.85 ^a	2.50 ± 0.87 ^a
	CYP[100 mg/kg] + ZIM[12 mg/kg]	66.20 ± 2.86 ^d	27.20 ± 1.64 ^d	1.80 ± 0.89 ^d	1.40 ± 0.24 ^d	3.40 ± 0.84 ^d
	CYP[100 mg/kg] + ZIM[24 mg/kg]	79.00 ± 2.32 ^{d*}	17.80 ± 1.92 ^{d*}	0.80 ± 0.65 ^d	1.00 ± 0.50 ^d	1.40 ± 0.45 ^d
	CYP[100 mg/kg] + ZIM[48 mg/kg]	72.40 ± 12.36 ^d	26.40 ± 12.56 ^d	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^d	1.20 ± 1.08 ^d

^aData presented in mean ± SD. Legends: Ref = reference value; CHEM-P = chemotherapeutic prototype; CIS = cisplatin; DOX = doxorubicin; CYP = cyclophosphamide; COMB = combination of chemotherapeutic & chemotherapeutic prototype; statistically compared to the negative control group. ^bStatistically compared to the DOX group. ^cStatistically compared to the CIS group. ^dStatistically compared to the CF group; *statistically significant difference ($p < 0.05$; t -Student).

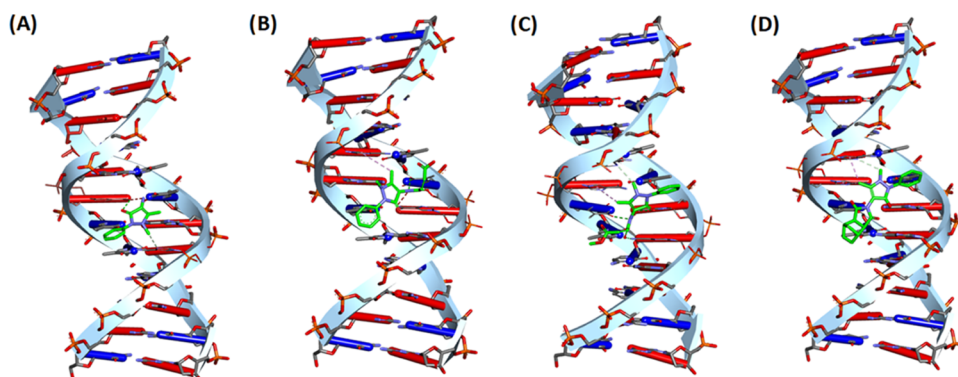


Figure 8. Interactions between the compounds (green carbons) and B-DNA: A. 4-aminoantipyrine 4-AA; B. compound 1; C. compound 2; and D. compound ZIM.

with ZIM (24 mg/kg), the results showed that the monocyte frequencies were higher than the reference values (Table 2).

For lymphocytes, it was observed that CIS, DOX, and CYP reduce ($p < 0.05$) their frequencies. However, when CIS is administered in association with 4-AA, an increase ($p < 0.05$) in the frequency of lymphocytes was observed in the two lowest concentrations (12 and 24 mg/kg). An increase ($p < 0.05$) was also observed when DOX was associated with 12 and 48 mg/kg 4-AA and in the association of CYP with 24 and 48 mg/kg 4-AA. There was a significant reduction ($p < 0.05$) in the frequency of neutrophils in the association of CIS with 12 mg/kg 4-AA and in the association of CYP with 24 and 48 mg/kg 4-AA. For the other parameters, no statistically significant differences were observed ($p > 0.05$) (Table 1).

3.3. Molecular Docking. Nucleic acids have crucial roles in several essential cellular processes, including cellular reproduction and protein biosynthesis.³⁴ Ligand binding to macromolecules plays a key role in biology and medicine as a steering mechanism in biological processes. Molecules that bind to DNA could disturb the replication process, which affects cell proliferation or the transcription process, inhibiting gene expression. More specifically, the binding of drugs to proteins

and DNA has been of great interest in recent years using both experimental and theoretical methods. Owing to the central role of DNA in replication and transcription, DNA has been a major target for antibiotic, anticancer, and antiviral drugs.³⁵

The effects of nucleic acid binding into drugs are known for various diseases, such as cancer.³⁶ Most DNA binding drugs are low-molecular-weight aromatic compounds, often carrying positive charges.³⁷ The different modes of drug binding to DNA include intercalation between adjacent base pairs and intrusion into the minor groove and the major groove. Intercalation and minor-groove binding are the majority of DNA-binding modes of small ligands.^{38–40} Sequence specificity of drug–DNA binding is limited owing to the restricted size of drugs but is generally higher for minor and major groove binders than for intercalators.^{38,39}

Intercalation requires a significant deformation owing to forming a binding cavity,^{39,40} in contrast to minor and major groove binding that does not require significant conformational DNA changes.⁴⁰ The majority of DNA-binding drugs bind at the B-DNA and show a higher affinity for AT-rich sequences.^{40,41} The structure with sequences with alternating A (DA) and T (DT) bases are generally narrow, allowing favorable van der

Waals contacts between the drug and the DNA^{40,42} in contrast to GC-rich sequences where bulky amino groups of guanine bases affect the groove geometry.^{38,40} Studies on drug–DNA binding were performed to elucidate the energetic origins of the binding in terms of intermolecular forces and induced conformational changes and to develop new drug design strategies.^{43,44}

The DNA major groove offers more specific contacts for establishing hydrogen bonds with the drug, but van der Waals contacts are less favorable owing to groove dimensions.³⁸ Also, the major groove is often occupied by proteins whose biological activity can be affected by minor-groove binding drugs.³⁸ Drug–DNA binding is, in most cases, noncovalent, although covalent bonds may be formed with reactive ligands.^{39,40}

The most negative binding energy shows a more potent DNA-binding affinity. Thus, the DNA-binding affinities show a more significant interaction with the compounds at the structure's major groove region.

We decided to perform molecular docking with DNA and 4-AA, 1, 2, and ZIM to provide input for the DNA damage results and compare their binding affinity.^{45,46}

Interaction mode and binding affinity docking studies have been performed on compounds 4-AA, 1, 2, and ZIM (Figure 8) with B-DNA (PDB ID: 1BNA) to explore the most feasible binding site. As shown in Figure 7, the compounds interact with DNA at the major groove, showing a high affinity for the A-T-rich region. The resulting relative binding energies of docked 4-AA, 1, 2, and ZIM are shown in Table 3.

Table 3. Ligand–Receptor Complex Interaction Energies with B-DNA (Crystallized)

compound	docking score (kcal/mol)
4-AA	−85.91
1	−111.93
2	−117.35
ZIM	−119.83

The interactions between the B-DNA and the four compounds are shown in Figure 9. In addition, the results indicate that there is certain hydrogen-bonding interaction between the complexes and DNA.

4. DISCUSSION

When animals were treated with 4-AA alone, it was found that none of the doses increased the frequency of cells with DNA damage evaluated by the comet assay. However, the evaluation

of the DNA damage score showed that the highest dose increased this parameter. The chromosome damage by the micronuclei assay showed that the highest dose increased the frequency of this biomarker in 24 h. The same occurred for the lowest dose in 48 h and the two lowest doses in 72 h. These results suggest attention to the genotoxic effect of 4-AA. However, according to this experimental data, this compound seems to have a low capacity to cause DNA damage at both genomic and chromosomal levels up to a dose of 48 mg/kg. We reported that 4-AA is not genotoxic, does not increase the frequency of genomic or chromosomal lesions up to 24 mg/kg, and can increase the frequency of cell death in the liver and kidneys without activating splenic phagocytosis.¹⁴ Additionally, we demonstrated that 4-AA also increases the frequency of cell death in liver and kidneys.¹⁴ However, it caused an increase in splenic phagocytosis at all tested doses, where two of them were the same as our previous data (12 and 24 mg/kg)¹⁴ and a third higher dose (48 mg/kg).

Also, 4-AA did not interfere with the differential blood cell count. However, we reported that the 24 mg/kg dose of 4-AA increased the frequency of lymphocytes and reduced that of neutrophils.¹⁴ Therefore, the results of this study do not corroborate our previous findings. It possibly occurred because activated splenic phagocytosis and the removal of damaged cells (micronucleated cells, for instance) by the spleen may have favored the homeostasis of the animals and, therefore, did not induce any change in the cell count of the blood. This fact is documented in different types of studies^{13,47–49} and even in products derived from 4-AA.^{13,14,20}

4-AA has a chemopreventive effect and reduces the effects of CIS, DOX, and CYP chemotherapeutics as it reduces the frequency of DNA damage (comet and/or micronuclei).¹⁴ We observed that in association with CIS, 4-AA did not prevent genomic damage (comet assay). However, it prevented chromosome damage (micronucleus assay). This report demonstrates a high chemopreventive effect of 4-AA against CIS. Compared to the association with DOX, 4-AA showed lower chemoprevention, but this was in both genomic and chromosomal damage. When associated with CYP, 4-AA showed the best chemoprevention rates for both genomic and chromosomal damage. Thus, we also endorse that 4-AA reduces DNA damage, especially if associated with CYP. Therefore, this compound can reduce the effect of chemotherapeutic agents that have DNA damage induction as a mechanism of action. Thus, its association is not recommended.

The association of 4-AA with CIS and DOX reduces the frequency of cell death in the liver, and the association with CIS

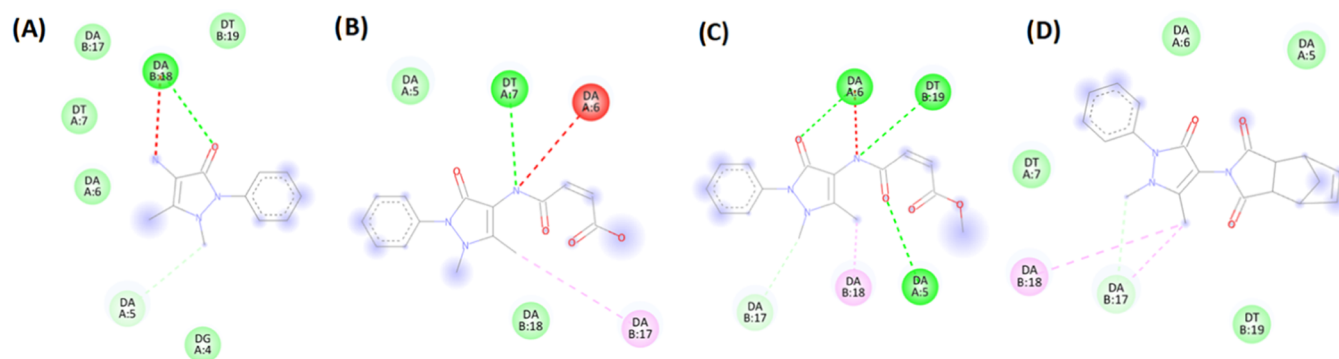
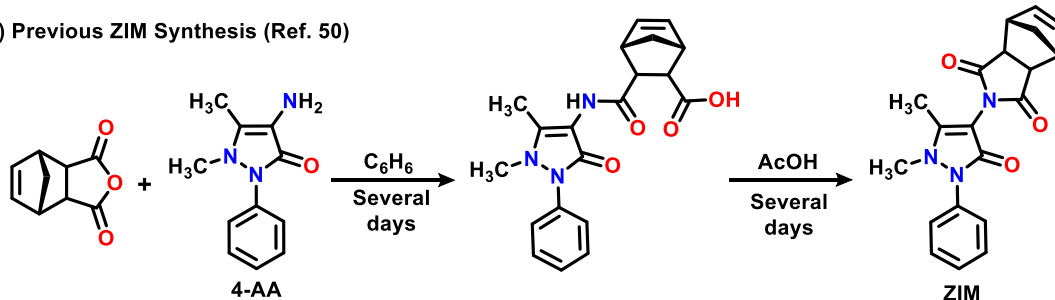
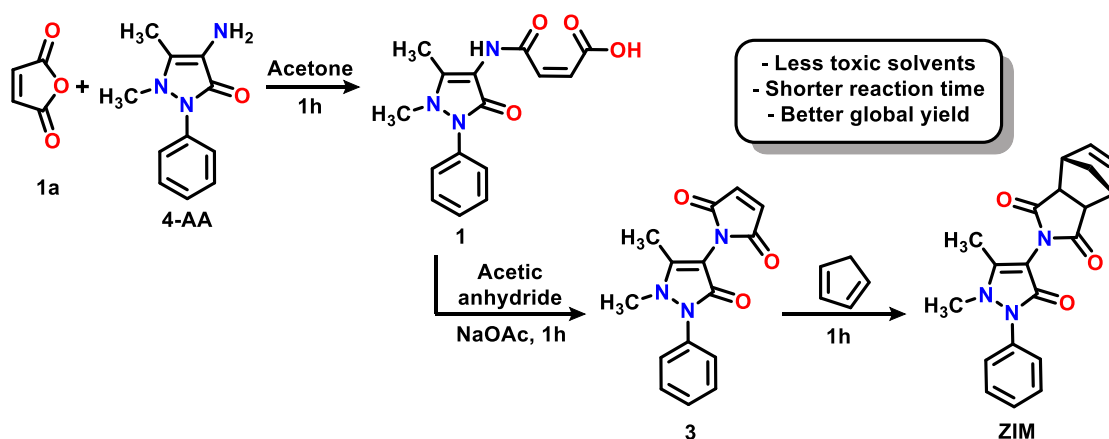


Figure 9. Interactions of A. 4-aminoantipyrene (4-AA); B. compound 1; C. compound 2; and D. ZIM.

Scheme 2. Comparison of Literature Approach (2A) and Our Approach (2B) for the Synthetic Strategy for Obtaining ZIM

(2A) Previous ZIM Synthesis (Ref. 50)

(2B) Preparation and *in vivo* toxicogenic evaluation of ZIM derivative (Our work):

and CYP reduces the frequency of cell death in the kidneys.¹⁴ Our data demonstrate that 4-AA has a chemopreventive effect and interferes with the mechanism of action of chemotherapeutics (induction of DNA damage) and, consequently, reduces the frequency of cell death in the liver and kidney when associated with CIS and DOX. For the liver, our data corroborate what was described by us previously.¹⁴ But for kidney, our data are contradictory regarding the effect of 4-AA in association with DOX. We observed a reduction in the rate of cell death, and we did not observe any reduction.¹⁴ We also observed that 4-AA interferes with splenic phagocytosis associated with CIS. Only the highest dose of 4-AA increased phagocytosis associated with DOX and reduced phagocytosis when associated with CYP. These data contradict the previous report,¹⁴ which stated that 4-AA reduces phagocytosis in association with CIS and DOX and does not interfere with CYP. Furthermore, we found no influence of 4-AA on differential blood cell counts.¹⁴ We observed that 4-AA, in particular, increases the frequency of lymphocytes in association with CIS, DOX, and CYP.

There was only one report in the literature for the synthesis of a 4-aminoantipyrine derivative with a structure similar to norbornene carboximides that used a nucleophilic acyl substitution of 4-AA with a norbornene core with several days of reaction time (Scheme 2A).⁵⁰ In our approach, maleic acid 1a was obtained by the ring-opening reaction of maleic anhydride 1a and 4-AA. The reaction of 1 with sodium acetate and acetic anhydride provided the maleimide 3. Finally, the 4+2 cycloaddition reaction of 3 and cyclopentadiene provided the polycyclic compound 4 with a 3 h overall reaction time (Scheme 1B).²¹

We showed that ZIM could be involved in inhibiting the inflammatory response, the involvement of Prostaglandins in the formation of edema, and reducing the recruitment of polymorphonuclear cells and the neurogenic phase of pain, making ZIM a good anti-inflammatory prototype.²¹ However, it is the first time ZIM has been reported as an efficient genotoxic agent since ZIM induced an increase in the frequency of both genomic and chromosomal damage. It is noteworthy that the 24 mg/kg dose presented more genotoxic damage rather than the 48 mg/kg. Therefore, for ZIM, a dose–response correlation was not observed, which is not uncommon to be observed.²⁷

In association with CIS, ZIM did not change the frequency of genomic damage (comet assay). However, it showed prevention of chromosomal damage (micronucleus assay), which suggests an important chemopreventive effect since there are high percentages of DNA damage reduction. This result indicates that ZIM interferes with CIS's chemotherapeutic action mechanism, which is mediated by the induction of DNA damage.^{51,52} Only in the association of CIS with the highest dose of 4-AA (48 mg/kg) was a reduction in splenic phagocytosis. The absence of phagocytosis reduction at the lowest doses can be justified since the organism needs to add different modes of action to resume homeostasis to reduce the genotoxic effects induced by the chemotherapeutic agent. We assumed that at low doses of 4-AA, desmutagenesis and bioantimutagenesis occurred, and these actions were insufficient to reduce the frequency of cells with DNA damage.^{53,54} Thus, the organism still needed activation of splenic phagocytosis to remove cells that did not undergo DNA repair. Probably, splenic phagocytosis was not required at the highest association dose because the serum levels of 4-AA were sufficient to cause the

reduction of damage cells using only the desmutagenesis and bio-antimutagenesis modes of action and, therefore, not activating splenic phagocytosis.

Furthermore, cells that remained with DNA damage and were not phagocytosed may have been targeted for cell death by apoptosis, for example. This fact can be corroborated by the significant increase in cell death induced in liver and kidney using **ZIM** alone. However, a reduction in cell death in liver and kidney is also observed in association with **CIS**. This fact may be related to the decrease in genotoxic damage that may have occurred by different modes of action, such as desmutagenesis and/or bio-antimutagenesis.

Substances with a desmutagenic mode can interact directly with a genotoxic agent, its precursors, and/or its metabolites and inactivate them chemically or enzymatically.^{54–57} It is also suggested that these substances may act as if preparing the DNA so that it is less susceptible to damage and errors and/or to form a protective barrier that prevents genotoxic agents from causing damage.⁵⁸ Substances that act by bio-antimutagenesis can modulate enzymes responsible for DNA repair and replication. To this end, they increase replication fidelity, promote error-free repair, and/or inhibit error-prone repair systems. The simultaneous treatment protocol allows both modes of action to occur simultaneously when the chemotherapeutic agent and the possible chemoprotective agent are applied simultaneously.⁵⁸ Effects such as these are described for β -glucan,⁵⁸ glutamine,^{59,60} dietary fibers such as wheat,⁵⁹ and resistant starch,⁶¹ among others. However, it has also been described for synthetic compounds such as isocoumarin,⁴⁹ an acid (compound **1**, Figure 2),¹³ and an ester (compound **2**, Figure 2)²⁰ derived from **4-AA**.

It is also noteworthy that **CIS** alone caused a reduction in the frequency of lymphocytes. In association with **ZIM**, the frequencies were normalized, and very close to or even higher than those observed in the negative control. This fact suggests that **ZIM** can increase the frequency of lymphocytes even in the presence of **CIS**, which can cause a reduction in lymphocytes in patients undergoing chemotherapy.⁶² This low number of lymphocytes can impede the patient from undergoing a new cycle of chemotherapy as he may be immunosuppressed.⁶³ In these cases, before a new cycle of chemotherapy, it is important the patient's blood count is within the expected standards. Thus, although **ZIM** reduces the frequency of DNA damage and cell death induced by **CIS**, it may be an adjuvant capable of improving the immune response, as reported previously for resorcinolic lipids.⁶⁴

When comparing the effects of **ZIM** associated with **CIS**, **DOX**, and **CYP**, the results suggest that **ZIM** interacts differently with each of these chemotherapeutics and needs to be discussed differently.

Associated with **DOX**, **ZIM** demonstrated chemopreventive effect for both genomic (24 and 48 mg/kg) and chromosome damage (48 mg/kg). However, the chemopreventive effect is best observed for primary damage (genomic). These effects are less expressive than those observed for the association with **CIS** and **CYP**. Differently from what was observed for the association with **CIS**, **ZIM** potentiated phagocytic activity when associated with the highest dose of **DOX**. This result may be related to the lower chemopreventive effect observed in these treatments. Thus, **ZIM**, even acting by desmutagenesis and bio-antimutagenesis, could not contain the damage induced by **DOX**, which may have favored the expressive increase of splenic phagocytosis to eliminate more circulating cells that had DNA damage. It is

also noteworthy that treatment with **ZIM** alone can activate splenic phagocytosis. However, in the two lowest doses of the association, no phagocytosis activation was observed. The frequency of **DOX**-induced cell death in the liver and kidney was reduced in the presence of **ZIM**, similarly to the effect observed in the association with **CIS**. Thus, this fact may also be due to the chemopreventive process of **ZIM** that reduces the frequency of DNA damage and, therefore, reduces the induction of cell death mediated by these same damages.

Moreover, **ZIM** increased the frequency of lymphocytes associated with **DOX**. This fact had also been described for the association with **CIS**. Therefore, **ZIM** could modulate the differential blood cell count. Despite the health certificate for the animal colony used in this study (Institutional Review Board of the Federal University of Mato Grosso do Sul, Brazil (protocol code 966/2018, date of approval: 08/07/2018) for studies involving animals), animals from different experimental groups, including the control group, showed an increased frequency of basophils and eosinophils which can suggest parasitic infection. However, it does not directly or negatively impact the genotoxicity results, which is the main objective of this study.

The association of **CYP** with **ZIM** indicated the absence of chemoprevention for genomic damage. However, effective chemoprevention in chromosomal damage was observed. This result demonstrates similarity with what was observed for the association with **CIS**. Therefore, the chemopreventive effect of **ZIM** against the damage caused by **CYP** must also involve actions by desmutagenesis and bio-antimutagenesis. Notably, the antigenotoxic effects at the chromosomal level of **ZIM** in association with **CYP** are compared to those observed in the associations with **CIS** and **DOX**. In these associations, the highest percentages of damage reduction and even percentages above 100% were observed, which also indicates the prevention of basal damage (those observed in the negative control). This better DNA damage reduction may have occurred precisely in this association because **CYP** is an indirect-acting genotoxic agent, which means **CYP** needs to be metabolized in the liver causing DNA damage.

On the other hand, **CIS** and **DOX** have direct action once they do not need to be metabolized to cause DNA damage. The need to metabolize **CYP** gives more time for desmutagenesis of **ZIM**, protecting the DNA or inactivating **CYP** itself or its genotoxic metabolites that are formed gradually. It may also still provide more time for **ZIM** to modulate the enzymes involved in the bio-antimutagenesis process. Interestingly, there was a reduction in splenic activation in all associations of **ZIM** with **CYP**. This reduction, based on the need for phagocytosis, can be explained by the lower frequency of circulating damage cells since the chemopreventive process was the most efficient. It is also noteworthy that a reduction in cell death was observed only in the kidney. In the liver, the frequency did not decrease. We believe it occurred because the **CYP** metabolites generated in the liver cause immediate damage to the hepatocytes. Therefore, the levels of **ZIM** in the liver are insufficient to cause the chemopreventive effect observed in the blood and kidney. Furthermore, it was observed that **ZIM** also increased the frequency of lymphocytes in association with **CYP**. This fact suggests that **ZIM** can modulate the frequency of blood cells to reduce one of the side effects of chemotherapy, which is the immunosuppression also caused by **CYP**.

Compound **1** (Figure 2), a derivative of **4-AA** and **ZIM**, showed genotoxic activity inducing both genomic and chromosomal damage. Additionally, **1** was able to induce

splenic activation with increased phagocytosis, increased cell death in the liver and kidney, and increased frequency of lymphocytes.¹³ These results are very similar to **ZIM**. A comparison between their structures allows us to infer that the similarity in causing DNA damage is related to three attractive interactions ($N_{4-AA}-DT_{thymine\ 7}$ [strong] and $H_{CCH_3}-DA_{adenine\ 17}$ [moderate]) and one repulsive interaction ($N_{4-AA}-DA_{adenine\ 6}$ [strong]) of **1** and three attractive interactions ($H_{NCH_3}-DA_{adenosine\ 17}$ [moderate], $H_{CCH_3}-DA_{adenosine\ 17}$ [moderate] and $H_{CCH_3}-DA_{adenosine\ 18}$ [moderate]) with DNA which provides an energy difference of only -8.48 kcal/mol (**1** = -111.93 kcal/mol and **ZIM** = -119.83 kcal/mol).

Compound **1**, when associated with **CIS** and **CYP**, had a chemopreventive effect and interfered with the anticancer mechanism of the chemotherapeutic agents since it reduced the frequency of DNA damage and the frequency of cell death. However, in association with **DOX**, compound **1**, despite its chemopreventive activity, increased the frequency of cell death.¹³ This fact is different from what we found for **ZIM**, which, as described before, could be related to desmutagenesis and bio-antimutagenesis.

We also reported an ester (compound **2**, Figure 2), another derivative of **4-AA** and **ZIM**. Unlike **1** and **ZIM**, **2** is not genotoxic. It reduces the frequency of basal genomic damage and does not induce chromosomal damage. In addition, it causes low phagocytic activation. Even though the frequency of cell death increased.²⁰ This fact suggests that the induction of death for **2** is not mediated by DNA damage. It can be related to the ability to interact with DNA through 6 attractive interactions, but not between the nitrogen bases on the DNA as **1** and **ZIM** (see Figure 9C).

Compound **2**, when associated with the **CIS**, **DOX**, and **CYP**, reduces the chemotherapeutic effects of these drugs because it prevents the induction of DNA damage and, indirectly, reduces the rate of cell death,²⁰ which is also observed for **ZIM**.

5. CONCLUSIONS

In conclusion, **4-AA**, despite increasing the frequency of cell death when used alone, even without significantly increasing DNA damage, is not a good candidate to be used as an anticancer agent. Furthermore, the association of **4-AA** with commercial chemotherapeutics (**CIS**, **DOX**, and **CYP**), which cause anticancer effects by inducing DNA damage, is not recommended since their chemopreventive effect reduces the induction of damage in the DNA.¹⁴ These facts reduce the chemotherapeutic effects, and therefore, their combination is discouraged. The use of analgesic and antipyretic/antipyretic drugs is also discouraged, such as dipyrene.¹⁴

Regarding **ZIM**, it is genotoxic and causes both genomic and chromosomal damage. In addition, it causes activation of splenic phagocytosis and increases cell death in the liver and kidney. The frequency of DNA damage induced by **ZIM** is lower than that induced by **CIS**, **DOX**, and **CYP**. However, it maintains a level of cell death comparable to those induced by commercial chemotherapeutics. Therefore, **ZIM** is a chemotherapeutic candidate that can cause fewer side effects in healthy cells, such as DNA damage. However, its association with **CIS**, **DOX**, and **CYP** is not recommended once it maintains the characteristics of **4-AA** and has a considerable chemopreventive effect. This chemopreventive effect reduces the frequency of DNA damage and reduces the frequency of cell death. Therefore, **ZIM** negatively interferes with the commercial chemotherapeutics tested anticancer effect. **ZIM**, like **4-AA**, increases the frequency

of leukocytes which is a desirable condition for organisms exposed to chemotherapeutic drugs that can cause immunosuppression. However, the cost–benefit ratio is not favorable. Therefore, we do not favor the association of **ZIM** with **CIS**, **DOX**, and **CYP**.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrestox.2c00275>.

Experimental design of the *in vivo* study and copies of ¹H and ¹³C NMR spectra (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Rodrigo Juliano Oliveira – Stem Cell, Cell Therapy and Toxicological Genetics Research Centre (CeTroGen), Medical School, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul 79080-190, Brazil; Graduate Program in Health and Development in the Midwest Region, Medical School, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul 79070-900, Brazil; Email: rodrigo.oliveira@ufms.br

Roberto da Silva Gomes – Department of Pharmaceutical Sciences, North Dakota State University, Fargo, North Dakota 58102, United States; orcid.org/0000-0002-8075-9716; Email: roberto.gomes@ndsu.edu

Authors

Ingridhy Ostaciana Maia Freitas da Silveira – Institute of Chemistry, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul 79070-900, Brazil; Department of Pharmaceutical Sciences, North Dakota State University, Fargo, North Dakota 58102, United States

Silvia C. das Neves – Stem Cell, Cell Therapy and Toxicological Genetics Research Centre (CeTroGen), Medical School, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul 79080-190, Brazil; Graduate Program in Health and Development in the Midwest Region, Medical School, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul 79070-900, Brazil

Barbara Mitsuyasu – Department of Pharmaceutical Sciences, North Dakota State University, Fargo, North Dakota 58102, United States; Department of Chemical and Biological Sciences, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP 18618-689, Brazil

Allana C. Martins – Department of Pharmaceutical Sciences, North Dakota State University, Fargo, North Dakota 58102, United States

Claudia Berno – Stem Cell, Cell Therapy and Toxicological Genetics Research Centre (CeTroGen), Medical School, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul 79080-190, Brazil

Jiyan Mohammad – Department of Pharmaceutical Sciences, North Dakota State University, Fargo, North Dakota 58102, United States

Halie Raj – Department of Pharmaceutical Sciences, North Dakota State University, Fargo, North Dakota 58102, United States

Flavio H. S. de Araujo – Stem Cell, Cell Therapy and Toxicological Genetics Research Centre (CeTroGen), Medical

School, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul 79080-190, Brazil

Cristiane Regina Hortelan – Instituto Federal de Mato Grosso do Sul, Dourados, MS CEP 79833-520, Brazil

Luana Machado – Institute of Exact Sciences, Department of Chemistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG CEP 31270-901, Brazil; Department of Chemistry, Fluminense Federal University, Niteroi, RJ 24020-141, Brazil

Eufrânio N. da Silva Júnior – Institute of Exact Sciences, Department of Chemistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG CEP 31270-901, Brazil

Marcelo L. B. Vilela – Medical School, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul 79070-900, Brazil

Valter Aragão Nascimento – Graduate Program in Health and Development in the Midwest Region, Medical School, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul 79070-900, Brazil

Adilson Beatriz – Institute of Chemistry, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul 79070-900, Brazil; orcid.org/0000-0001-6864-6092

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.chemrestox.2c00275>

Author Contributions

[†]R.J.O. and I.O.M.F.d.S. contributed equally. CRediT: **Rodrigo Juliano Oliveira** conceptualization, project administration, writing-original draft, writing-review & editing; **Ingridhy Ostaciana Maia Freitas da Silveira** investigation; **Cláudia Berno** investigation, methodology, validation; **Flavio H.S. de Araújo** data curation; **Eufrânio N da Silva Júnior** investigation, methodology, writing-review & editing; .

Author Contributions

CRediT: **Rodrigo Juliano Oliveira** conceptualization, project administration, writing-original draft, writing-review & editing; **Ingridhy Ostaciana Maia Freitas da Silveira** investigation; **Silvia C. das Neves** investigation, methodology; **Barbara Mitsuyasu** formal analysis, validation; **Allana C. Martins** formal analysis, methodology, validation; **Cláudia Berno** investigation, methodology, validation; **Jiyan Mohammad** methodology, writing-original draft; **Halie Raj** validation, writing-original draft; **Flavio H.S. de Araújo** data curation; **Cristiane Regina Hortelan** investigation, methodology; **Luana Machado** investigation, methodology; **Eufrânio N da Silva Júnior** investigation, methodology, writing-review & editing; **Marcelo L.B. Vilela** investigation, methodology; **Roberto da Silva Gomes** conceptualization, investigation, project administration, supervision, writing-original draft, writing-review & editing.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by **NIH-COBRE** (1P20GM109024), **NDEPSCoR** (FAR0021960, FAR0034259, and FAR0035377), and **NDSU Start-up**. This study was also partially financed by the **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brazil (CAPES)**—Finance code 001. E.N.d.S.J. thanks **CNPq** (PQ 309774/2020-9 and Universal Project 405052/2021-9), **FAPEMIG** (PPM-00635-18 and *Rede de Pesquisa e Inovação*

para Bioengenharia de Nanossistemas-RED-00282-16), and **INCT-Catálise/CNPq/FAPESC**.

REFERENCES

- (1) Reimers, M. S.; Engels, C. C.; Kuppen, P. J.; van de Velde, C. J.; Liefers, G. J. How does genome sequencing impact surgery? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2014**, *11*, 610–618.
- (2) Helleday, T. DNA repair pathways as target for cancer therapy. *Toxicol. Lett.* **2012**, *211*, S9.
- (3) Garnock-Jones, K. P.; Keating, G. M.; Scott, L. J. Trastuzumab: A review of its use as adjuvant treatment in human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive early breast cancer. *Drugs* **2010**, *70*, 215–239.
- (4) Yoshida, T.; Zhang, G.; Haura, E. B. Targeting epidermal growth factor receptor: central signaling kinase in lung cancer. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *80*, 613–623.
- (5) Collins, S. J. Retinoic acid receptors, hematopoiesis and leukemogenesis. *Curr. Opin. Hematol.* **2008**, *15*, 346–351.
- (6) Porter, D. C.; Farmaki, E.; Altília, S.; Schools, G. P.; West, D. K.; Chen, M.; Chang, B. D.; Puzyrev, A. T.; Lim, C. U.; Rokow-Kittell, R.; Friedhoff, L. T.; Papavassiliou, A. G.; Kalurupalle, S.; Hurteau, G.; Shi, J.; Baran, P. S.; Gyorffy, B.; Wentland, M. P.; Broude, E. V.; Kiaris, H.; Roninson, I. B. Cyclin-dependent kinase 8 mediates chemotherapy-induced tumor-promoting paracrine activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 13799–13804.
- (7) Chabner, B. A.; Roberts, T. G., Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 65–72.
- (8) Vichaya, E. G.; Chiu, G. S.; Krukowski, K.; Lacourt, T. E.; Kavelaars, A.; Dantzer, R.; Heijnen, C. J.; Walker, A. K. Mechanisms of chemotherapy-induced behavioral toxicities. *Front. Neurosci.* **2015**, *9*, 131.
- (9) Bouwman, P.; Jonkers, J. The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 587–598.
- (10) Béthune, J.; Wieland, F. T. Assembly of COPI and COPII Vesicular Coat Proteins on Membranes. *Annu. Rev. Biophys.* **2018**, *47*, 63–83.
- (11) Machado, K. E.; de Oliveira, K. N.; Andreossi, H. M.; Bubniak Ldos, S.; de Moraes, A. C.; Gaspar, P. C.; Andrade Eda, S.; Nunes, R. J.; Santos-Silva, M. C. Apoptotic events induced by maleimides on human acute leukemia cell lines. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 1904–1916.
- (12) de Oliveira, E. J. T.; Pessatto, L. R.; de Freitas, R. O. N.; Pelizaro, B. I.; Rabacow, A. P. M.; Vani, J. M.; Monreal, A. C. D.; Mantovani, M. S.; de Azevedo, R. B.; Antonioli-Silva, A. C. M. B.; et al. New Bis copper complex ((Z)-4-((4-chlorophenyl) amino)-4-oxobut-2-enoyl) oxy): Cytotoxicity in 4T1 cells and their toxicogenic potential in Swiss mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, *356*, 127–138.
- (13) Oliveira, R. J.; da Cruz Leite Santos, N.; Pesarini, J. R.; de Oliveira, B. C.; Berno, C. R.; de Araújo, F. H. S.; da Silveira, I. O. M. F.; Nascimento, R. O.; Brochado Antonioli-Silva, A. C. M.; Duenhas Monreal, A. C.; et al. Assessment of genetic integrity, splenic phagocytosis and cell death potential of (Z)-4-((1, 5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2, 3dihydro-1H-pyrazol-4-yl) amino)-4-oxobut-2-enoic acid and its effect when combined with commercial chemotherapeutics. *Genet. Mol. Biol.* **2018**, *41*, 154–166.
- (14) Berno, C. R.; de Toledo Rós, B.; da Silveira, I. O. M. F.; Coelho, H. R.; Antonioli, A. C. M. B.; Beatriz, A.; de Lima, D. P.; Monreal, A. C. D.; Sousa, F. G.; da Silva Gomes, R.; Oliveira, R. J. 4-Aminoantipyrine reduces toxic and genotoxic effects of doxorubicin, cisplatin, and cyclophosphamide in male mice. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2016**, *805*, 19–24.
- (15) Cunha, S.; Oliveira, S. M.; Rodrigues, M. T.; Bastos, R. M.; Ferrari, J.; de Oliveira, C. M. A.; Kato, L.; Napolitano, H. B.; Vencato, I.; Lariucci, C. Structural studies of 4-aminoantipyrine derivatives. *J. Mol. Struct.* **2005**, *752*, 32–39.
- (16) Mahle, F.; Guimaraes, T. D.; Meira, A. V.; Correa, R.; Cruz, R. C. B.; Cruz, A. B.; Nunes, R. J.; Cechinel, V.; de Campos-Buzzi, F. Synthesis and biological evaluation of N-antipyrine-4-substituted

amino-3-chloromaleimide derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4761–4768.

(17) Jiang, M.; Lu, S.; Zhang, Y. The Potential Organ Involved in Cantharidin Biosynthesis in *Epicauta chinensis* Laporte (Coleoptera: Meloidae). *J. Insect Sci.* **2017**, *17*, No. 52.

(18) Wang, C. C.; Wu, C. H.; Hsieh, K. J.; Yen, K. Y.; Yang, L. L. Cytotoxic effects of cantharidin on the growth of normal and carcinoma cells. *Toxicology* **2000**, *147*, 77–87.

(19) Xie, J.; Zhang, Y.; Hu, X.; Lv, R.; Xiao, D.; Jiang, L.; Bao, Q. Norcantharidin inhibits Wnt signal pathway via promoter demethylation of WIF-1 in human non-small cell lung cancer. *Med. Oncol.* **2015**, *32*, No. 145.

(20) Juliano Oliveira, R.; Pereira, F. P. A. N.; Silveira, I. O. M. F.; Lima, R. V.; Berno, C. R.; Pesarini, J. R.; Antonioli-Silva, A. C. M. B.; Monreal, A. C. D.; Adilson, B.; Lima, D. P.; Gomes, R. D. S. Assessment of the toxicogenic effects and cell death potential of the ester (Z)-methyl 4-((1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)amino)-4-oxobut-2-anoate in combination with cisplatin, cyclophosphamide and doxorubicin. *Genet. Mol. Biol.* **2019**, *42*, 399–410.

(21) da Silveira, I. O.; Moslaves, I. S. B.; Muller, J. A. I.; Hortelan, C. R. W.; Juliano Oliveira, R.; Okuyama, T. T.; Fernandes, J.; Badenoch, B.; Janaina de Campos, L.; Almeida, L. D.; Mohammad, J.; Martins, A. C. F.; Beatriz, A.; da Silva Junior, E. N.; Cristina Toffoli-Kadri, M.; da Silva Gomes, R. Design, synthesis and in vivo evaluation of 1,4-dioxo-2-butenyl aryl amine derivatives as a promising anti-inflammatory drug prototype. *Bioorg. Chem.* **2022**, *124*, No. 105754.

(22) Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **1988**, *175*, 184–191.

(23) Carvalho, P. C.; Santos, E. A.; Schneider, B. U. C.; Matuo, R.; Pesarini, J. R.; Cunha-Laura, A. L.; Monreal, A. C. D.; Lima, D. P.; Antonioli, A. C. M. B.; Oliveira, R. J. Diaryl sulfide analogs of combretastatin A-4: Toxicogenetic, immunomodulatory and apoptotic evaluations and prospects for use as a new chemotherapeutic drug. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, *40*, 715–721.

(24) Kobayashi, H.; Sugiyama, C.; Morikawa, Y.; Hayaashi, M.; Sofuni, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun.* **1995**, *3*, 103–115.

(25) Hayashi, M.; Morita, T.; Kodama, Y.; Sofuni, T.; Ishidate, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res. Lett.* **1990**, *245*, 245–249.

(26) Rovozzo, G. C.; Burke, C. N. *A Manual of Basic Virological Techniques*; Prentice-Hall: Englewood Cliffs, N.J., 1973.

(27) Navarro, S. D.; Beatriz, A.; Meza, A.; Pesarini, J. R.; Gomes, R. D. S.; Karaziack, C. B.; Cunha-Laura, A. L.; Monreal, A. C. D.; Romão, W.; Lacerda Júnior, V.; Mauro, M. D. O.; Oliveira, R. J. A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: Evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *75*, 132–142.

(28) Manoharan, K.; Banerjee, M. R. β -Carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biol. Int. Rep.* **1985**, *9*, 783–789.

(29) Waters, M. D.; Brady, A. L.; Stack, H. F.; Brockman, H. E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutat. Res., Rev. Genet. Toxicol.* **1990**, *238*, 57–85.

(30) Burley, S. K.; Bhikadiya, C.; Bi, C. X.; Bittrich, S.; Chen, L.; Crichlow, G. V.; Christie, C. H.; Dalenberg, K.; Di Costanzo, L.; Duarte, J. M.; Dutta, S.; Feng, Z. K.; Ganesan, S.; Goodsell, D. S.; Ghosh, S.; Green, R. K.; Guranovic, V.; Guzenko, D.; Hudson, B. P.; Lawson, C. L.; Liang, Y. H.; Lowe, R.; Namkoong, H.; Peisach, E.; Persikova, I.; Randle, C.; Rose, A.; Rose, Y.; Sali, A.; Segura, J.; Sekharan, M.; Shao, C. H.; Tao, Y. P.; Voigt, M.; Westbrook, J. D.; Young, J. Y.; Zardecki, C.; Zhuravleva, M. RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, D437–D451.

(31) Hypercube HyperChem, hypercubeusa.com.

(32) Open Babel software, <http://openbabel.org> (accessed 01/12/2021).

(33) Yan, Y. M.; Zhang, D.; Zhou, P.; Li, B. T.; Huang, S. Y. HDock: a web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, W365–W373.

(34) Minchin, S.; Lodge, J. Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays Biochem.* **2019**, *63*, 433–456.

(35) Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **1988**, *175*, 184–191.

(36) Yamada, Y. Nucleic Acid Drugs-Current Status, Issues, and Expectations for Exosomes. *Cancers* **2021**, *13*, 5002.

(37) Peek, M. E.; Lipscomb, L. A.; Bertrand, J. A.; Gao, Q.; Roques, B. P.; Garbayjaureguiberry, C.; Williams, L. D. DNA Distortion in Bis-Intercalated Complexes. *Biochemistry* **1994**, *33*, 3794–3800.

(38) Bischoff, G.; Hoffmann, S. DNA-binding of drugs used in medicinal therapies. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 321–348.

(39) Han, X. G.; Gao, X. L. Sequence specific recognition of ligand-DNA complexes studied by NMR. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 551–581.

(40) Neidle, S.; Nunn, C. M. Crystal structures of nucleic acids and their drug complexes. *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15*, 1–15.

(41) Ren, J. S.; Chaires, J. B. Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *96*, 82.

(42) Wemmer, D. E. Designed sequence-specific minor groove ligands. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 439–461.

(43) Chaires, J. B. Energetics of drug-DNA interactions. *Biopolymers* **1997**, *44*, 201–215.

(44) Haq, I.; Ladbury, J. Drug-DNA recognition: energetics and implications for design. *J. Mol. Recognit.* **2000**, *13*, 188–197.

(45) Rohs, R.; Bloch, I.; Sklenar, H.; Shakked, Z. Molecular flexibility in ab initio drug docking to DNA: binding-site and binding-mode transitions in all-atom Monte Carlo simulations. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 7048–7057.

(46) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1995**, *9*, 532–549.

(47) Blaser, L. S.; Tramonti, A.; Egger, P.; Haschke, M.; Krahenbuhl, S.; Ratz Bravo, A. E. Hematological safety of metamizole: retrospective analysis of WHO and Swiss spontaneous safety reports. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2015**, *71*, 209–217.

(48) Oliveira, R. J.; Navarro, S. D.; de Lima, D. P.; Meza, A.; Pesarini, J. R.; da Silva Gomes, R.; Karaziack, C. B.; de Oliveira Mauro, M.; Cunha-Laura, A. L.; Monreal, A. C. D.; et al. A novel cytosporone 3-Heptyl-4,6-dihydroxy-3 H-isobenzofuran-1-one: synthesis; toxicological, apoptotic and immunomodulatory properties; and potentiation of mutagenic damage. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 1–15.

(49) Araújo, F. H. S. d.; Figueiredo, D. R. d.; Auharek, S. A.; Pesarini, J. R.; Meza, A.; Gomes, R. d. S.; Monreal, A. C. D.; Antonioli-Silva, A. C. M. B.; Lima, D. P. d.; Kassuya, C. A. L.; et al. In vivo chemotherapeutic insight of a novel isocoumarin (3-hexyl-5, 7-dimethoxy-isochromen-1-one): Genotoxicity, cell death induction, leukometry and phagocytic evaluation. *Genet. Mol. Biol.* **2017**, *40*, 665–675.

(50) Kas'yan, L. I.; Pal'chikov, V. A.; Tarabara, I. N.; Krishchik, I. V.; Kas'yan, A. O.; Shishkina, S. V.; Shishkin, O. V. Products of endic anhydride reaction with cyclic amines and their heterocyclization. *Russ. J. Org. Chem.* **2006**, *42*, 1642–1652.

(51) Basu, A.; Krishnamurthy, S. Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage. *J. Nucleic Acids* **2010**, *2010*, 1–16.

(52) Yimit, A.; Adebali, O.; Sancar, A.; Jiang, Y. C. Differential damage and repair of DNA-adducts induced by anti-cancer drug cisplatin across mouse organs. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, No. 309.

(53) Vukovic-Gacic, B.; Simic, D. Identification of natural antimutagens with modulating effects on DNA repair. *Basic Life Sci.* **1993**, *61*, 269–277.

(54) Kada, T.; Shimoi, K. Desmutagens and bio-antimutagens—their modes of action. *BioEssays* **1987**, *7*, 113–116.

(55) Hartman, P. E.; Shankel, D. M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environ. Mol. Mutagen.* **1990**, *15*, 145–182.

(56) Ferguson, L. R. Antimutagens as Cancer Chemopreventive Agents in the Diet. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1994**, *307*, 395–410.

(57) De Flora, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1998**, *402*, 151–158.

(58) Oliveira, R. J.; Mantovani, M. S.; Silva, A. F.; Pesarini, J. R.; Mauro, M. O.; Ribeiro, L. R. Compounds used to produce cloned animals are genotoxic and mutagenic in mammalian assays in vitro and in vivo. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2014**, *47*, 287–298.

(59) Oliveira, R. J.; Sasaki, E. S.; Monreal, A. C.; Monreal, M. T.; Pesarini, J. R.; Mauro, M. O.; Matuo, R.; Silva, A. F.; Zobiole, N. N.; Siqueira, J. M.; Ribeiro, L. R.; Mantovani, M. S. Pre-treatment with glutamine reduces genetic damage due to cancer treatment with cisplatin. *Genet. Mol. Res.* **2013**, *12*, 6040–6051.

(60) Pesarini, J. R.; Victorelli, S. G.; Vicentini, A. P.; Ferreira, L. K.; Mauro, M. O.; Matuo, R.; Oliveira, J. R.; Antonioli, A. C. M. B.; Mantovani, M. S.; Oliveira, R. J. Antigenotoxic and antimutagenic effects of glutamine supplementation on mice treated with cisplatin. *Genet. Mol. Res.* **2014**, *13*, 4820–4830.

(61) Navarro, S. D.; Mauro, M. O.; Pesarini, J. R.; Ogo, F. M.; Oliveira, R. J. Resistant starch: a functional food that prevents DNA damage and chemical carcinogenesis. *Genet. Mol. Res.* **2015**, *14*, 1679–1691.

(62) Zmay, T. N.; Kolovskaya, O. S.; Zmay, G. S.; Borodina, N. A. Effects of cisplatin on lymphocyte structure and functions in mice with ehrlich ascitic carcinoma. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2011**, *151*, 62–65.

(63) Merritt, R. E.; Mahtabifard, A.; Yamada, R. E.; Crystal, R. G.; Korst, R. J. Cisplatin augments cytotoxic T-lymphocyte-mediated antitumor immunity in poorly immunogenic murine lung cancer. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2003**, *126*, 1609–1617.

(64) Navarro, S. D.; Beatriz, A.; Meza, A.; Pesarini, J. R.; da Silva Gomes, R.; Karaziack, C. B.; Cunha-Laura, A. L.; Monreal, A. C. D.; Romão, W.; Júnior, V. L.; et al. A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *75*, 132–142.

Recommended by ACS

Variation of Benzo[a]pyrene, NNN, and NNK Levels in 16 Commercial Smokeless Tobacco Products

Selvin H. Edwards, An T. Vu, *et al.*

JANUARY 13, 2023
CHEMICAL RESEARCH IN TOXICOLOGY

READ 

Carbonyl Yields in Cigars under Three Smoking Regimens Using a Linear Smoking Machine

Mimy Young, Tricia L. Johnson, *et al.*

JANUARY 05, 2023
CHEMICAL RESEARCH IN TOXICOLOGY

READ 

New Insights into How Melatonin Ameliorates Bisphenol A-Induced Colon Damage: Inhibition of NADPH Oxidase

Yujie Yao, Shiwen Xu, *et al.*

JANUARY 12, 2023
JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY

READ 

Chlorpyrifos Oxon Activates Glutamate and Lysine for Protein Cross-linking

Diego Muñoz-Torrero, Oksana Lockridge, *et al.*

JANUARY 04, 2023
CHEMICAL RESEARCH IN TOXICOLOGY

READ 

Get More Suggestions >

ANEXO B

Article

3-Heptylidene-4,6-Dimethoxy-3*H*-Isobenzofuran-1-One Is Genotoxic, Increases the Frequency of Cell Death, and Potentiates the Effects of Cyclophosphamide and Cisplatin

Silvia Cordeiro das Neves ^{1,2} , Flavio Henrique de Araújo ¹, Willian Ayala Correa ³, Allana Cristina Faustino Martins ⁴ , Henrique Rodrigues Scherer Coelho ¹ , Marcelo Luiz Brandão Vilela ⁵, Valter Aragão do Nascimento ², Candida Aparecida Leite Kassuya ⁶ , Dênis Pires de Lima ³ , Adilson Beatriz ³ , Rodrigo Juliano Oliveira ^{1,2,*}  and Roberto da Silva Gomes ^{4,*} 

- ¹ Stem Cell, Cell Therapy and Toxicological Genetics Research Centre (CeTroGen), Medical School, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79080-190, MS, Brazil
 - ² Graduate Programme in Health and Development in the Midwest Region, Medical School, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, MS, Brazil
 - ³ Institute of Chemistry, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, MS, Brazil
 - ⁴ Department of Pharmaceutical Sciences, North Dakota State University, Fargo, ND 58102, USA
 - ⁵ Medical School, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, MS, Brazil
 - ⁶ School of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados 79070-900, MS, Brazil
- * Correspondence: rodrigo.oliveira@ufms.br (R.J.O.); roberto.gomes@ndsu.edu (R.d.S.G.)



Citation: das Neves, S.C.; de Araújo, F.H.; Correa, W.A.; Martins, A.C.F.; Coelho, H.R.S.; Vilela, M.L.B.; do Nascimento, V.A.; Kassuya, C.A.L.; de Lima, D.P.; Beatriz, A.; et al. 3-Heptylidene-4,6-Dimethoxy-3*H*-Isobenzofuran-1-One Is Genotoxic, Increases the Frequency of Cell Death, and Potentiates the Effects of Cyclophosphamide and Cisplatin. *Molecules* **2023**, *28*, 1044. <https://doi.org/10.3390/molecules28031044>

Academic Editors: Fernando de Carvalho da Silva, Vitor Francisco Ferreira and Luana Da Silva Magalhães Forezi

Received: 1 December 2022

Revised: 17 January 2023

Accepted: 18 January 2023

Published: 20 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: 3-heptylidene-4,6-dimethoxy-3*H*-isobenzofuran-1-one (Phthalide **1**) is the precursor of three resorcinol lipids that have been described as potential chemotherapeutic agents and capable of potentiating the effects of cyclophosphamide. In this study, we evaluated the genotoxic potential, cell-killing potential, and interactions with cyclophosphamide and cisplatin of phthalide **1**. Twelve groups were created from 120 mice: Negative Control, cyclophosphamide (100 mg/kg), cisplatin (6 mg/kg), Phthalide **1** (5, 10 and 20 mg/kg), and associations of **1** with cyclophosphamide and **1** with cisplatin. The results demonstrate that **1** increases ($p < 0.05$) the frequency of chromosomal damage, liver and kidney cell death, and splenic phagocytosis. The association of **1** with cyclophosphamide and cisplatin demonstrated a chemopreventive effect and, therefore, a reduction ($p < 0.05$) in the frequency of chromosomal damage. However, cell death and splenic phagocytosis did not suffer significant variations. As a result of the above, **1** has potential chemotherapeutic application and may be a candidate for developing a new generation of chemotherapeutics. In addition, it has characteristics to be used as a chemotherapy adjuvant in association with cyclophosphamide and cisplatin since it increases the frequency of cell death induced by chemotherapy. We also reported that the chemopreventive effect of **1**, in association with cyclophosphamide and cisplatin, can prevent adverse effects (induction of DNA damage in non-tumor cells) without interfering with the mode of action of chemotherapy drugs and, therefore, without reducing the induction of cell death.

Keywords: Phthalide **1**; in vivo; toxicology; chromosomal damage

1. Introduction

Resorcinolic lipids, such as cytosporones and their precursors, can interact with the phospholipid bilayers [1], help in the formation of liposomes [2], promote protection against oxidative stress [3], and inhibit bacterial growth [1,2] and tumor cells [4]. In addition, the resorcinol lipid cytosporone B induced apoptosis in tumor cells by interacting with the nuclear orphan receptor Nur77 [2,4]. This fact led different research groups to dedicate themselves to describing the possible chemotherapeutic effects of precursors and cytosporones.

We identified a precursor to synthetic cytosporone called 3-heptyl-3,4,6-trimethoxy-3*H*-isobenzofuran-1-one (AMS35AA, Figure 1) as a potential chemotherapeutic agent.

AMS35AA showed the ability to increase the frequency of cell death in liver and kidney nodes while promoting the activation of phagocytosis in the spleen, even in the absence of the induction of genotoxic damage. This fact also allowed us to suggest that AMS35AA may be the prototype of more selective chemotherapy since it does not induce DNA damage [5]. Navarro et al. [2] reported the anticancer effect of this compound in a B16F10-induced melanoma model in BC57BL/6 mice. This study demonstrated a reduction of up to 4.59× in tumor weight [2].

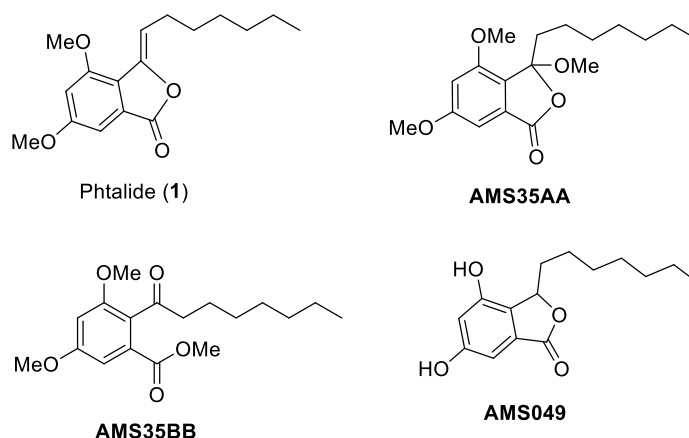


Figure 1. Chemical structures of cytosporone analogs.

The literature has also described the effects of cytosporone 3-heptyl-4,6-dihydroxy-3H-isobenzofuran-1-one (AMS049, Figure 1) [6]. The authors suggested that AMS049 is also a candidate for chemotherapy development. However, unlike AMS35AA, this compound induced genomic damage and increased comet frequency. Nevertheless, it maintained a good ability to induce cell death in the liver and kidneys [6].

We also demonstrated that 3,5-dimethoxy-2-octanoyl-benzoic acid methyl ester (AMS35BB, Figure 1) is an efficient candidate for developing a chemotherapy drug. AMS35BB also increased the frequency of cell death and caused genomic damage, unlike AMS35AA, which is similar to that described for AMS049.

To identify potential new cancer chemotherapeutic agents and explain the effects of cytosporones and their precursors on DNA, we devoted our research efforts to studying the effect of this class of compounds. Thus, we suggest that AMS35AA, AMS35BB, and AMS049 are good candidates for developing new chemotherapeutic agents. However, despite the structural similarities of these compounds, we did not observe a pattern in the biological responses. We also did not identify structural differences that could explain variations in biological responses.

To produce these three compounds, we started with the commercially available 3,5-dimethoxybenzoic acid, and by one-step acetylation, **1** was achieved (Figure 1). A methoxylation process created AMS35AA and AMS35BB, and via subsequent hydrogenation followed by demethylation, AMS049 was obtained. Thus, to elucidate the biological responses already described for these three compounds, we chose to evaluate **1** (3-heptylidene-4,6-dimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one), which is the common precursor. This study aimed to assess the genotoxic effects and the capacity to cause cell death of **1** alone or in association with cyclophosphamide and cisplatin.

The present research aimed to assess the genotoxic effects and ability to induce cell death of compound **1** and its effects in association with cyclophosphamide and cisplatin.

2. Results

The experimental animals started the experiment with similar weights ($p > 0.05$), maintained in the final weight. The mean initial weight ranged from 31.00 ± 0.75 to 32.90 ± 0.63 and the final weight from 29.70 ± 0.57 to 32.70 ± 0.36 (Figure 2A, Table 1).

The organ weights' evaluation showed no significant differences ($p > 0.05$) between the experimental groups for heart, lung, liver, and kidneys. However, there was an increase ($p < 0.05$) in spleen weight in all groups receiving **1** regardless of the dose (Figure 2B, Table 2).

The micronucleus assay demonstrated that cyclophosphamide and cisplatin were efficient in causing DNA damage, and the frequency of injured cells increased by $12.26\text{--}16.44\times$ and $11.11\text{--}15.06\times$ for cyclophosphamide and cisplatin, respectively (Figure 3A,B, Table 3).

Phthalide **1** was genotoxic at all doses tested ($p < 0.05$). The 5 mg/kg dose caused an increase in the micronucleus frequency by $4.36\times$, $4.72\times$, and $5.04\times$ for 24, 48, and 72 h, respectively. The dose of 10 mg/kg increased the micronuclei frequency by $4.46\times$, $4.79\times$, and $5.09\times$ for 24, 48, and 72 h, respectively. The dose of 20 mg/kg caused an increase of $4.47\times$, $4.88\times$, and $5.21\times$ for the same times, respectively (Figure 3A, Table 3).

The association of **1** with cyclophosphamide demonstrated a chemopreventive effect since it reduced ($p < 0.05$) the frequency of DNA damage (Figure 3A). Damage reduction percentages ranged from 41.22 to 43.27%. There were no significant differences between the tested doses. (Figure 3C).

The association of **1** and cisplatin also demonstrated a chemopreventive effect and, therefore, a significant reduction ($p < 0.05$) in the frequency of DNA damage (Figure 3B). Damage reduction percentages ranged from 21.08 to 29.50% (Figure 3D).

The splenic phagocytosis assay indicated that cyclophosphamide and cisplatin increased ($p < 0.05$) splendor phagocytosis by $1.26\times$ and $1.15\times$, respectively (Figure 4A,B).

Phthalide **1** also increased the frequency of phagocytosis by $1.69\times$, $1.68\times$, and $1.68\times$ at doses of 5, 10, and 20 mg/kg (Figure 4A, Table 4).

The association of **1** with cyclophosphamide and cisplatin did not reduce the frequency of phagocytosis, which is commonly induced by these chemotherapy agents (Figure 4A,B).

The cell death assay indicated that cyclophosphamide and cisplatin increased ($p < 0.05$) the frequency of cell death in the liver and kidney. Cyclophosphamide increased the frequency in the liver and kidney by $2.99\times$ and $1.97\times$, respectively (Figure 5A). Cisplatin increased by $2.54\times$ and $1.91\times$ for the same organs, respectively (Figure 5B).

Phthalide **1** increased ($p < 0.05$) the cell death frequency in the liver and kidney. The increase in the liver was $1.99\times$, $2.02\times$, and $2.05\times$ for 5, 10, and 20 mg/kg doses, respectively (Figure 3A). In the kidneys, the increases were $13.2\times$, $1.34\times$, and $1.35\times$ for the same doses, respectively (Figure 5A, Table 5).

Table 1. Mean $\pm$ Standard error of initial and final weight of Swiss mice treated with different doses of **1**.

Experimental Groups	Initial Weight	Final Weight
Control	31.00 ± 0.75^a	30.90 ± 0.97^a
1 5 mg/kg	32.90 ± 0.63^a	32.40 ± 0.75^a
1 10 mg/kg	31.60 ± 1.10^a	31.30 ± 0.95^a
1 20 mg/kg	32.70 ± 0.36^a	32.70 ± 0.36^a
cyclophosphamide (CYP)	31.80 ± 0.82^a	30.90 ± 0.47^a
CYP + 1 5 mg/kg	32.90 ± 0.68^a	32.20 ± 0.83^a
CYP + 1 10 mg/kg	32.90 ± 0.89^a	32.20 ± 0.77^a
CYP + 1 20 mg/kg	32.40 ± 0.95^a	32.00 ± 1.07^a
cisplatin (CIS)	31.50 ± 0.74^a	30.20 ± 0.84^a
CIS + 1 5 mg/kg	31.70 ± 1.12^a	30.20 ± 1.12^a
CIS + 1 10 mg/kg	31.40 ± 0.69^a	29.70 ± 0.57^a
CIS + 1 20 mg/kg	31.80 ± 0.82^a	30.60 ± 0.76^a

Negative control—DMSO 1%; cyclophosphamide—100 mg/kg b.w., i.p.; cisplatin—6 mg/kg b.w., i.p. **1**—Phthalide **1** at doses 5, 10, 20 mg/kg b.w., i.p. CYP + **1**—cyclophosphamide—100 mg/kg (b.w.; i.p.) + **1** at doses 5, 10, 20 mg/kg (b.w., i.p.); CIS + **1**—cisplatin—6 mg/kg (p.c.; i.p.) + **1** at doses 5, 10, 20 mg/kg (b.w., i.p.). Different letters indicate statistically significant differences. Statistical test: ANOVA/Tukey.

Table 2. Mean $\pm$ Standard error of the absolute weights of Swiss mice organs collected after the experimental period.

Experimental Groups	Heart	Lung	Liver	Kidneys	Spleen
Control	0.184 $\pm$ 0.009 ^a	0.187 $\pm$ 0.009 ^a	1.749 $\pm$ 0.039 ^a	0.472 $\pm$ 0.017 ^a	0.142 $\pm$ 0.010 ^a
1 5 mg/kg	0.179 $\pm$ 0.010 ^a	0.190 $\pm$ 0.007 ^a	1.772 $\pm$ 0.042 ^a	0.480 $\pm$ 0.017 ^a	0.234 $\pm$ 0.018 ^b
1 10 mg/kg	0.188 $\pm$ 0.010 ^a	0.189 $\pm$ 0.008 ^a	1.773 $\pm$ 0.038 ^a	0.479 $\pm$ 0.019 ^a	0.230 $\pm$ 0.015 ^b
1 20 mg/kg	0.187 $\pm$ 0.010 ^a	0.192 $\pm$ 0.009 ^a	1.772 $\pm$ 0.038 ^a	0.475 $\pm$ 0.017 ^a	0.231 $\pm$ 0.018 ^b
cyclophosphamide (CYP)	0.186 $\pm$ 0.007 ^a	0.192 $\pm$ 0.012 ^a	1.754 $\pm$ 0.042 ^a	0.478 $\pm$ 0.017 ^a	0.191 $\pm$ 0.008 ^{a,b}
CYP + 1 5 mg/kg	0.187 $\pm$ 0.006 ^a	0.193 $\pm$ 0.009	1.757 $\pm$ 0.052 ^a	0.476 $\pm$ 0.017 ^a	0.208 $\pm$ 0.012 ^b
CYP + 1 10 mg/kg	0.184 $\pm$ 0.008 ^a	0.195 $\pm$ 0.012 ^a	1.751 $\pm$ 0.049 ^a	0.478 $\pm$ 0.015 ^a	0.204 $\pm$ 0.008
CYP + 1 20 mg/kg	0.186 $\pm$ 0.011 ^a	0.192 $\pm$ 0.010 ^a	1.752 $\pm$ 0.050 ^a	0.481 $\pm$ 0.020 ^a	0.209 $\pm$ 0.010 ^b
cisplatin (CIS)	0.184 $\pm$ 0.006 ^a	0.196 $\pm$ 0.009 ^a	1.752 $\pm$ 0.044 ^a	0.479 $\pm$ 0.016 ^a	0.196 $\pm$ 0.008 ^{a,b}
CIS + 1 5 mg/kg	0.186 $\pm$ 0.010 ^a	0.197 $\pm$ 0.012 ^a	1.756 $\pm$ 0.051 ^a	0.477 $\pm$ 0.014 ^a	0.202 $\pm$ 0.012 ^b
CIS + 1 10mg/kg	0.187 $\pm$ 0.007 ^a	0.199 $\pm$ 0.010 ^a	1.754 $\pm$ 0.047 ^a	0.479 $\pm$ 0.017 ^a	0.203 $\pm$ 0.010 ^b
CIS + 1 20mg/kg	0.188 $\pm$ 0.006 ^a	0.195 $\pm$ 0.011 ^a	1.753 $\pm$ 0.055 ^a	0.476 $\pm$ 0.022 ^a	0.200 $\pm$ 0.005 ^b

Negative control—DMSO 1%; cyclophosphamide—100 mg/kg b.w., i.p.; cisplatin—6 mg/kg, b.w., ip. 1-1 at doses 5, 10, 20 mg/kg b.w., i.p. CYP + 1-cyclophosphamide—100 mg/kg (b.w.; i.p.) + 1 at doses 5, 10, 20 mg/kg (b.w., i.p.); CIS + 1-cisplatin—6 mg/kg (p.c.; i.p.) + 1 at doses 5, 10, 20 mg/kg (b.w., i.p.). Different letters indicate statistically significant differences. Statistical test: ANOVA/Tukey.

Table 3. Mean frequency $\pm$ Standard error of mean and percentage of damage reduction referring to micronucleus assays in peripheral blood of Swiss mice (males).

Experimental Groups	Average Frequency of Micronuclei			Damage Reduction Percentage		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Experiment 1						
Control	8.40 $\pm$ 0.30 ^a	7.50 $\pm$ 0.27 ^a	6.80 $\pm$ 0.20 ^a	-	-	-
cyclophosphamide (CYP)	103.00 $\pm$ 1.00 ^d	110.80 $\pm$ 0.97 ^d	111.80 $\pm$ 1.08 ^d	-	-	-
1 5 mg/kg	36.60 $\pm$ 0.54 ^b	35.40 $\pm$ 0.67 ^b	34.30 $\pm$ 0.67 ^b	-	-	-
1 10 mg/kg	37.50 $\pm$ 0.63 ^b	35.90 $\pm$ 0.69 ^b	34.60 $\pm$ 0.50 ^b	-	-	-
1 20 mg/kg	37.60 $\pm$ 0.45 ^b	36.60 $\pm$ 0.45 ^b	35.40 $\pm$ 0.67 ^b	-	-	-
CYP + 1 5 mg/kg	64.80 $\pm$ 0.59 ^c	66.70 $\pm$ 1.29 ^c	66.90 $\pm$ 1.28 ^c	41.43	42.69	42.76
CYP + 1 10 mg/kg	63.80 $\pm$ 0.78 ^c	66.10 $\pm$ 0.50 ^c	66.40 $\pm$ 0.47 ^c	41.22	43.27	43.23
CYP + 1 20 mg/kg	64.00 $\pm$ 1.23 ^c	67.80 $\pm$ 0.61 ^c	67.00 $\pm$ 0.80 ^c	41.22	41.62	42.66
Experiment 2						
Control	8.40 $\pm$ 0.30 ^a	7.50 $\pm$ 0.27 ^a	6.80 $\pm$ 0.20 ^a	-	-	-
cisplatin (CIS)	93.30 $\pm$ 0.84 ^d	103.10 $\pm$ 1.24 ^d	102.40 $\pm$ 1.08 ^d	-	-	-
1 5 mg/kg	36.60 $\pm$ 0.54 ^b	35.40 $\pm$ 0.67 ^b	34.30 $\pm$ 0.67 ^b	-	-	-
1 10 mg/kg	37.50 $\pm$ 0.63 ^b	35.90 $\pm$ 0.69 ^b	34.60 $\pm$ 0.50 ^b	-	-	-
1 20 mg/kg	37.60 $\pm$ 0.45 ^b	36.60 $\pm$ 0.45 ^b	35.40 $\pm$ 0.67 ^b	-	-	-
CIS + 1 5 mg/kg	75.10 $\pm$ 0.70 ^c	74.90 $\pm$ 0.65 ^c	74.10 $\pm$ 0.38 ^c	21.44	29.50	29.60
CIS + 1 10 mg/kg	74.10 $\pm$ 0.31 ^c	75.00 $\pm$ 0.74 ^c	74.20 $\pm$ 0.61 ^c	22.61	29.39	29.50
CIS + 1 20 mg/kg	75.40 $\pm$ 0.45 ^c	75.20 $\pm$ 0.94 ^c	75.10 $\pm$ 0.38 ^c	21.08	29.18	28.56

Negative control—DMSO 1%; cyclophosphamide—100 mg/kg b.w., i.p.; cisplatin—6 mg/kg, b.w., ip. 1-1 at doses 5, 10, 20 mg/kg b.w., i.p. CYP + 1-cyclophosphamide—100 mg/kg (b.w.; i.p.) + 1 at doses 5, 10, 20 mg/kg (b.w., i.p.); CIS + 1-cisplatin—6 mg/kg (p.c.; i.p.) + 1 at doses 5, 10, 20 mg/kg (b.w., i.p.). Different letters indicate statistically significant differences. Statistical test: ANOVA/Tukey.

Table 4. Absolute value, mean $\pm$ Standard error, and percentage referring to the splenic phagocytosis assay in Swiss mice.

Experimental Group	Total Cells Analyzed	Total Cells without Evidence of Phagocytosis			Total Cells with Evidence of Phagocytosis			
		A.V Mean ± SE Percentage			A.V Mean ± SE Percentage			
Experiment 1 (CYP)								
cyclophosphamide (CYP)	Control	1000	502	50.20 ± 0.64 ^c	50.2	498	49.80 ± 0.64 ^a	49.8
		1000	370	37.00 ± 0.71 ^b	37.0	630	63.00 ± 0.71 ^b	63.0
	1 5 mg/kg	1000	158	15.80 ± 1.40 ^a	15.8	842	84.20 ± 1.40 ^c	84.2
	1 10 mg/kg	1000	165	16.50 ± 0.80 ^a	16.5	835	83.50 ± 0.80 ^c	83.5
	1 20 mg/kg	1000	164	16.40 ± 0.62 ^a	16.4	836	83.60 ± 0.62 ^c	83.6
	CYP + 1 5 mg/kg	1000	374	37.40 ± 0.72 ^b	37.4	626	62.60 ± 0.72 ^b	62.6
	CYP + 1 10 mg/kg	1000	363	36.30 ± 0.70 ^b	36.3	637	63.70 ± 0.70 ^b	63.7
	CYP + 1 20 mg/kg	1000	367	36.70 ± 0.96 ^b	36.7	633	63.30 ± 0.96 ^b	63.3
Experiment 2 (CIS)								
cisplatin (CIS)	Control	1000	502	50.20 ± 0.64 ^c	50.2	498	49.80 ± 0.64 ^a	49.8
		1000	428	42.80 ± 1.00 ^b	42.8	572	57.20 ± 1.00 ^b	57.2
	1 5 mg/kg	1000	158	15.80 ± 1.40 ^a	15.8	842	84.20 ± 1.40 ^c	84.2
	1 10 mg/kg	1000	165	16.50 ± 0.80 ^a	16.5	835	83.50 ± 0.80 ^c	83.5
	1 20 mg/kg	1000	164	16.40 ± 0.62 ^a	16.4	836	83.60 ± 0.62 ^c	83.6
	CIS + 1 5 mg/kg	1000	424	42.40 ± 1.01 ^b	42.4	576	57.60 ± 1.01 ^b	57.6
	CIS + 1 10 mg/kg	1000	420	42.00 ± 0.40 ^b	42.0	580	58.00 ± 0.40 ^b	58.0
	CIS + 1 20 mg/kg	1000	419	41.90 ± 0.38 ^b	41.9	581	58.10 ± 0.38 ^b	58.1

Negative control—DMSO 1%; cyclophosphamide—100 mg/kg b.w., i.p.; cisplatin—6 mg/kg, b.w., i.p. 1-1 at doses 5, 10, 20 mg/kg b.w., i.p. CYP + 1-cyclophosphamide—100 mg/kg (b.w.; i.p.) + 1 at doses 5, 10, 20 mg/kg (b.w., i.p.); CIS + 1-cisplatin—6 mg/kg (p.c.; i.p.) + 1 at doses 5, 10, 20 mg/kg (b.w., i.p.). Legend: A.V.—Absolute value. Different letters indicate statistically significant differences. Statistical test: ANOVA/Tukey.

Table 5. Absolute value, mean $\pm$ Standard error of liver and kidney cells in apoptosis, Swiss mice (males), treated with different doses of 1, associated with cyclophosphamide and cisplatin.

Experimental Groups	Total Cells Analyzed	Total Cells in Apoptosis in the Liver A.V Mean ± SE Percentage			Total Cells in Apoptosis in the Kidneys A.V Mean ± SE Percentage		
Experiment 1 (CYP)							
Control	1000	118	11.80 ± 0.88 ^a	11.8	15.50 ± 0.69 ^a	15.5	
cyclophosphamide (CYP)	1000	353	35.30 ± 0.93 ^c	35.3	30.50 ± 0.56 ^c	30.5	
1 5 mg/kg	1000	235	23.50 ± 0.99 ^b	23.5	20.40 ± 0.43 ^b	20.4	
1 10 mg/kg	1000	238	23.80 ± 0.75 ^b	23.8	20.80 ± 0.66 ^b	20.8	
1 20 mg/kg	1000	242	24.20 ± 1.33 ^b	24.2	20.90 ± 0.61 ^b	20.9	
CYP + 1 5 mg/kg	1000	351	35.10 ± 0.91 ^c	35.1	31.10 ± 0.86 ^c	31.1	
CYP + 1 10 mg/kg	1000	356	35.60 ± 0.99 ^c	35.6	31.50 ± 0.49 ^c	31.5	
CYP + 1 20 mg/kg	1000	342	34.20 ± 0.94 ^c	34.2	32.30 ± 1.28 ^c	32.3	
Experiment 2 (CIS)							
Control	1000	118	11.80 ± 0.88 ^a	11.8	15.50 ± 0.69 ^a	15.5	
cisplatin (CIS)	1000	300	30.00 ± 0.57 ^c	30.0	29.60 ± 0.65 ^c	29.6	
1 5 mg/kg	1000	235	23.50 ± 0.99 ^b	23.5	20.40 ± 0.43 ^b	20.4	
1 10 mg/kg	1000	238	23.80 ± 0.75 ^b	23.8	20.90 ± 0.61 ^b	20.9	
1 20 mg/kg	1000	242	24.20 ± 1.33 ^b	24.2	20.80 ± 0.66 ^b	20.8	
CIS + 1 5 mg/kg	1000	301	30.10 ± 0.61 ^c	30.1	29.90 ± 0.39 ^c	29.9	
CIS + 1 10 mg/kg	1000	311	31.10 ± 0.55 ^c	31.1	29.60 ± 0.47 ^c	29.6	
CIS + 1 20 mg/kg	1000	305	30.50 ± 0.56 ^c	30.5	29.10 ± 0.66 ^c	29.1	

Negative control—DMSO 1%; cyclophosphamide—100 mg/kg b.w., i.p.; cisplatin—6 mg/kg, b.w., ip. 1-1 at doses 5, 10, 20 mg/kg b.w., i.p. CYP + 1 cyclophosphamide—100 mg/kg (b.w.; i.p.) + 1 at doses 5, 10, 20 mg/kg (b.w., i.p.); CIS + 1-cisplatin—6 mg/kg (p.c.; i.p.) + 1 at doses 5, 10, 20 mg/kg (b.w., i.p.). Legend: A.V.—Absolute value. Different letters indicate statistically significant differences. Statistical test: ANOVA/Tukey.

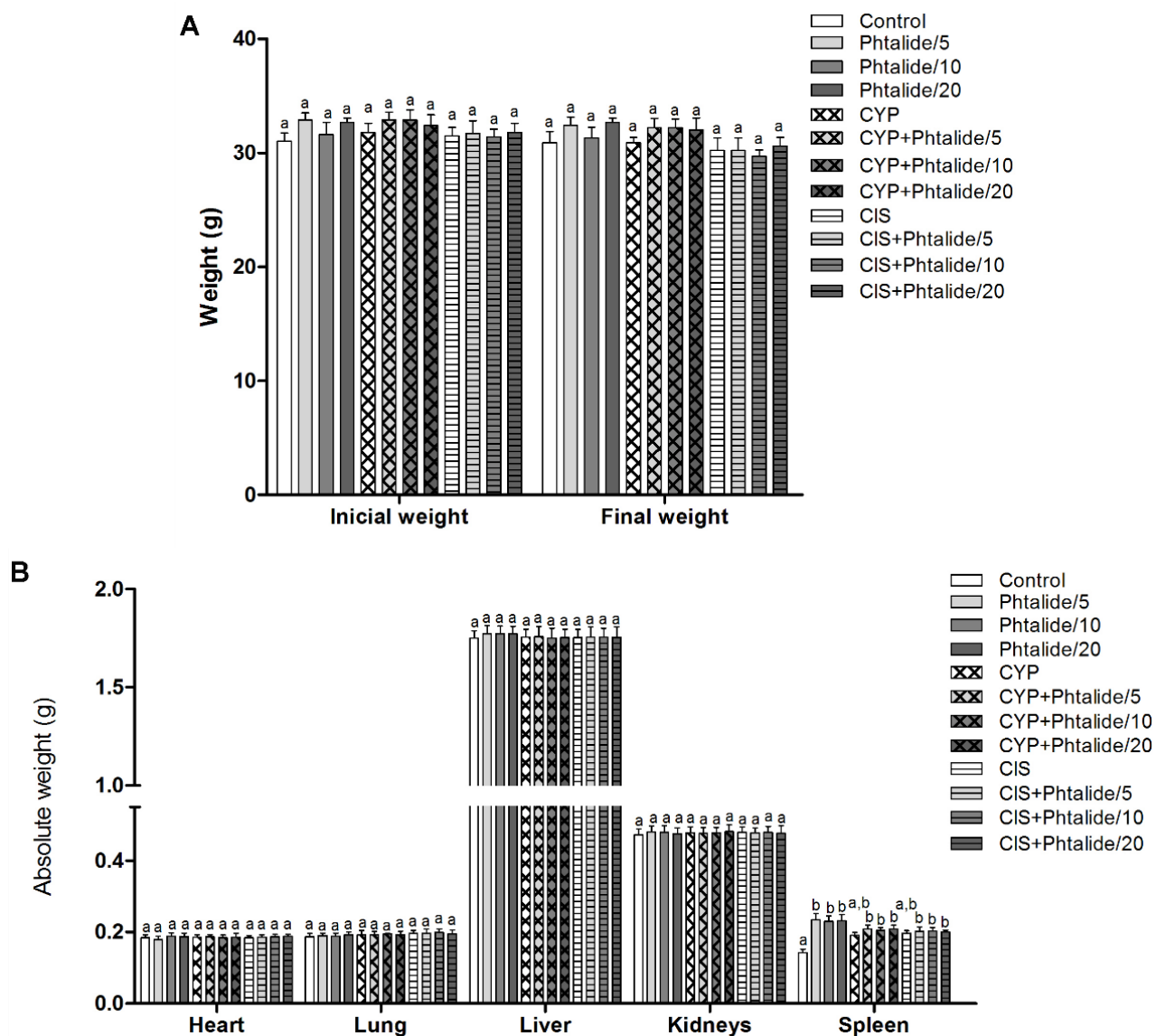


Figure 2. Biometric parameters of mice treated with Phthalide 1. (A) Initial and final weight; (B) Absolute organ weight: Heart, lung, kidneys, liver, and spleen. Legend: g: Gram; CYP: Cyclophosphamide; CIS: Cisplatin; Phthalide 1: 3-heptylidene-4,6-dimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one; Phthalide 1/5–5 mg/kg; Phthalide 1/10–10 mg/kg; Phthalide 1/20–20 mg/kg. Results are presented as mean $\pm$ SEM. Different letters indicate statistically significant differences (Statistical test: ANOVA/Tukey, $p < 0.05$).

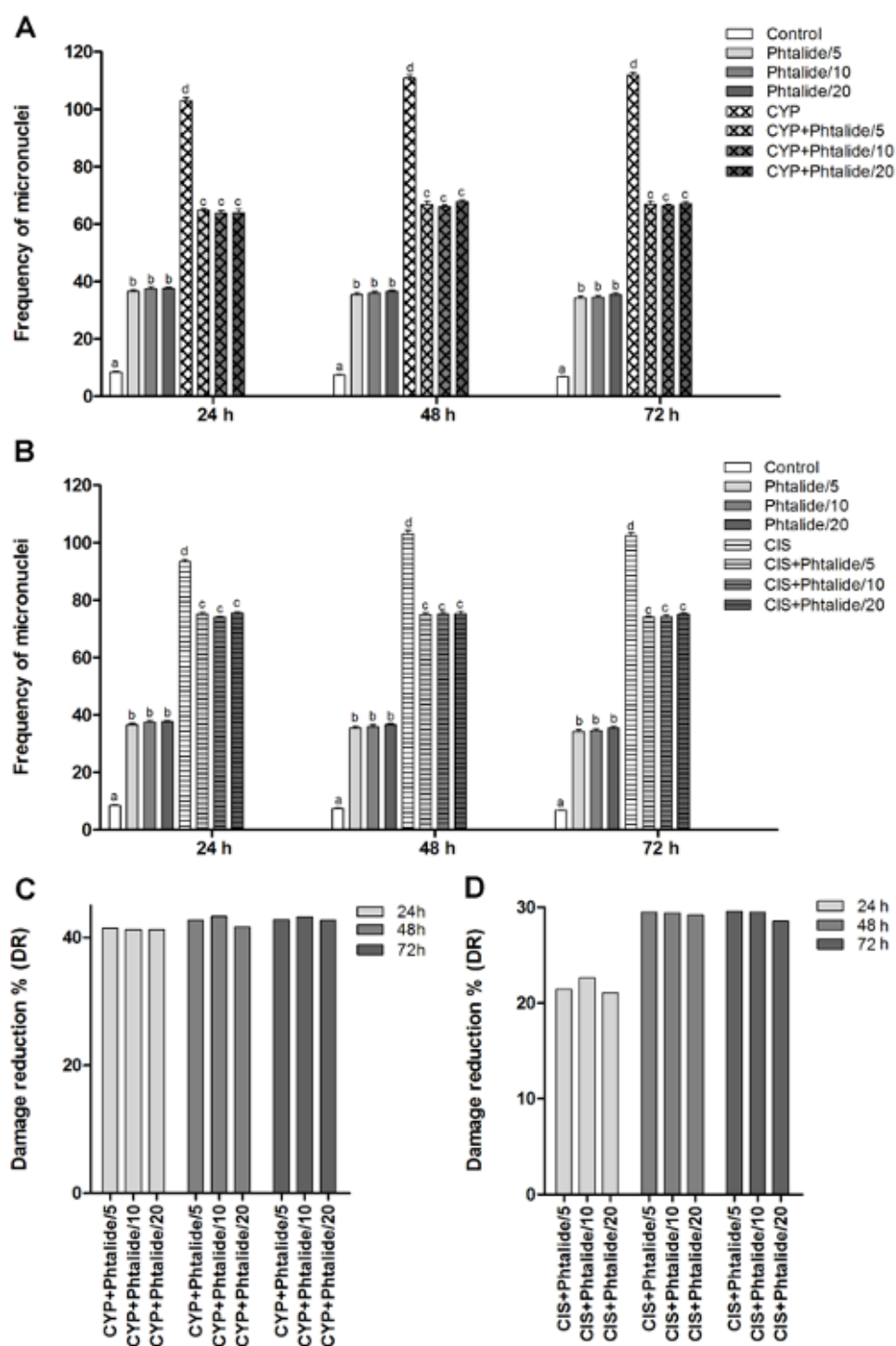


Figure 3. Frequency of micronuclei and percentage of damage reduction in different experimental groups. (A) Genotoxicity assessment: Chromosomal lesions in the compounds tested with 1 and 1 associated with cyclophosphamide; (B) Genotoxicity assessment: Chromosomal lesions in the compounds tested with 1 and 1 associated with cisplatin; (C) Percentage of damage reduction of 1 associated with cyclophosphamide; (D) Percentage of 1 damage reduction associated with cisplatin. Legend: g: Gram; CYP: Cyclophosphamide; CIS: Cisplatin; Phthalide 1: 3-heptylidene-4,6-dimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one; 1/5–5 mg/Kg; 1/10–10 mg/Kg; 1/20–20 mg/Kg. Results are presented as mean $\pm$ SEM. Different letters indicate statistically significant differences (Statistical test: ANOVA/Tukey, $p < 0.05$).

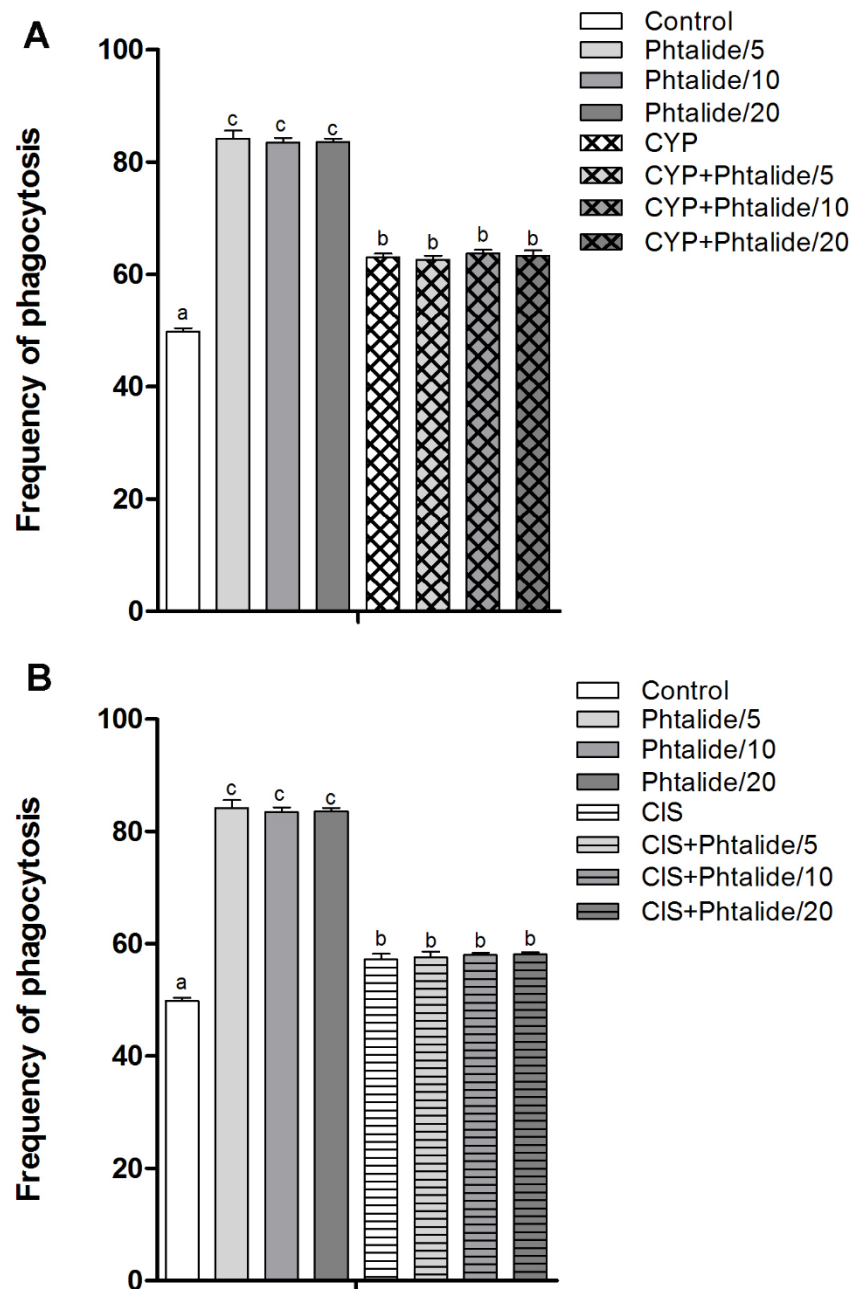


Figure 4. Frequency of splenic phagocytosis. **(A)** Splenic phagocytosis in groups treated with **1** and **1** associated with cyclophosphamide; **(B)** splenic phagocytosis in groups treated with **1** and **1** associated with cisplatin. Legend: g: Gram; CYP: Cyclophosphamide; CIS: Cisplatin; **1**: 3-heptylidene-4,6-dimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one; 1/5–5 mg/kg; 1/10–10 mg/kg; 1/20–20 mg/kg. Results are presented as mean $\pm$ SEM. Different letters indicate statistically significant differences (Statistical test: ANOVA/Tukey, $p < 0.05$).

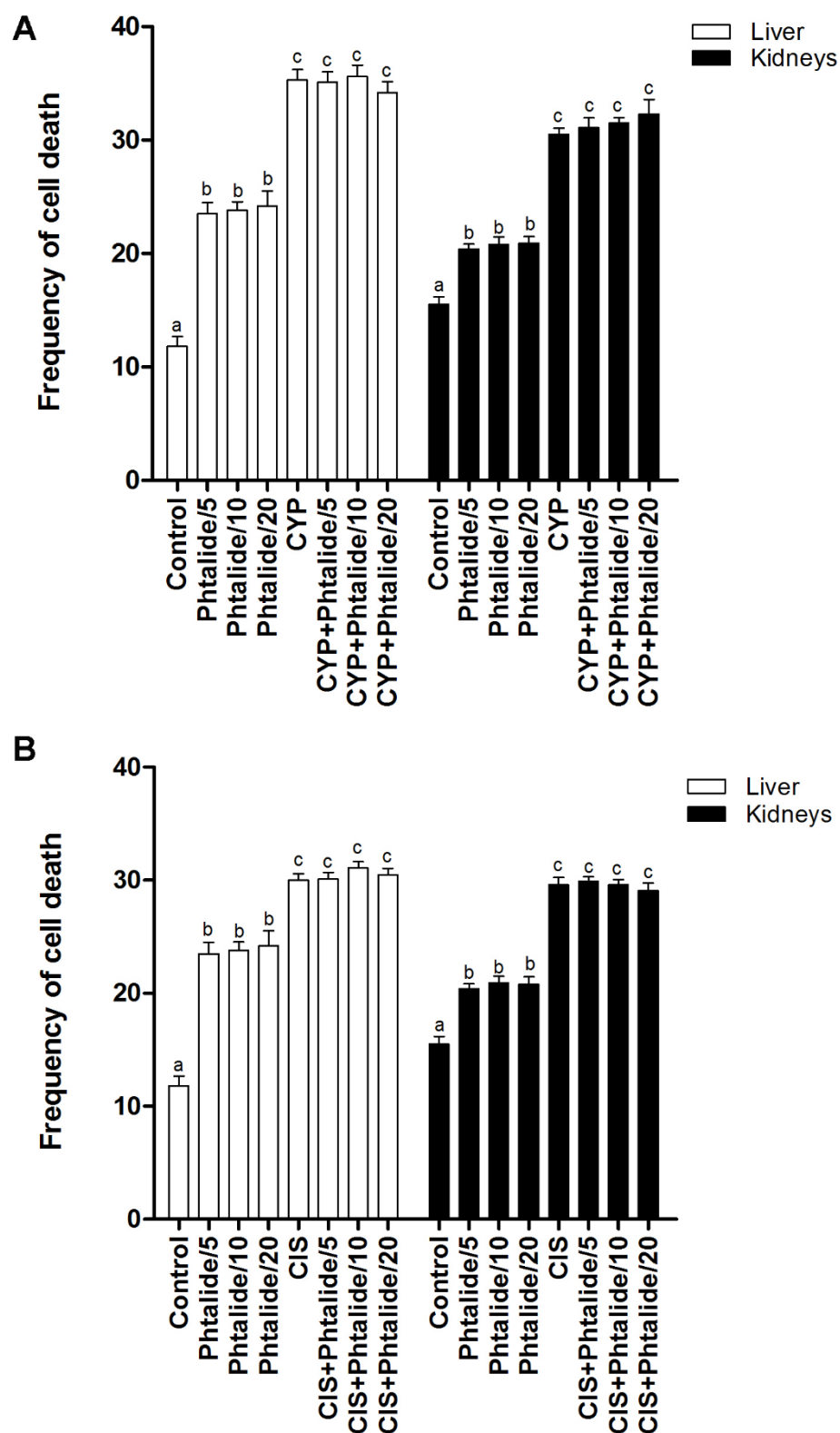


Figure 5. Frequency of cell death. (A) Evaluation of cell death in the groups treated with **1** and **1** associated with cyclophosphamide; (B) evaluation of cell death in groups treated with **1** and **1** associated with cisplatin. Legend: g: Gram; CYP: Cyclophosphamide; CIS: Cisplatin; **1**: 3-heptylidene-4,6-dimethoxy-3H-sobenzofuran-1-one; 1/5–5 mg/kg; 1/10–10 mg/kg; 1/20–20 mg/kg. Results are presented as mean $\pm$ SEM. Different letters indicate statistically significant differences (Statistical test: ANOVA/Tukey, $p < 0.05$).

The association of **1** with cyclophosphamide and cisplatin did not reduce ($p > 0.05$) the frequency of cell death in the liver and kidneys induced by these chemotherapy agents (Figure 5A,B, Table 5).

Molecular Modeling

To explore the most feasible binding site, interaction mode and binding affinity docking studies were performed on compounds **1**, cisplatin, and cyclophosphamide (Figure 6) with B-DNA (PDB ID: 1BNA). As shown in Figure 7, the compounds interact with DNA through interactions at the major groove, showing a high affinity for the A-T-rich region. The resulting relative binding energies of docked **1**, cyclophosphamide, and cisplatin are shown in Table 6.

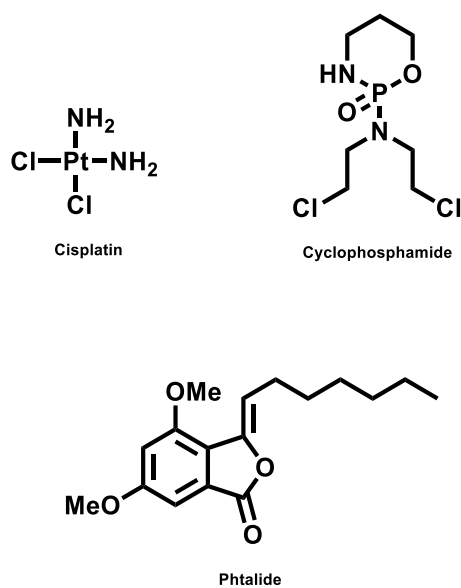


Figure 6. Structure of compounds.

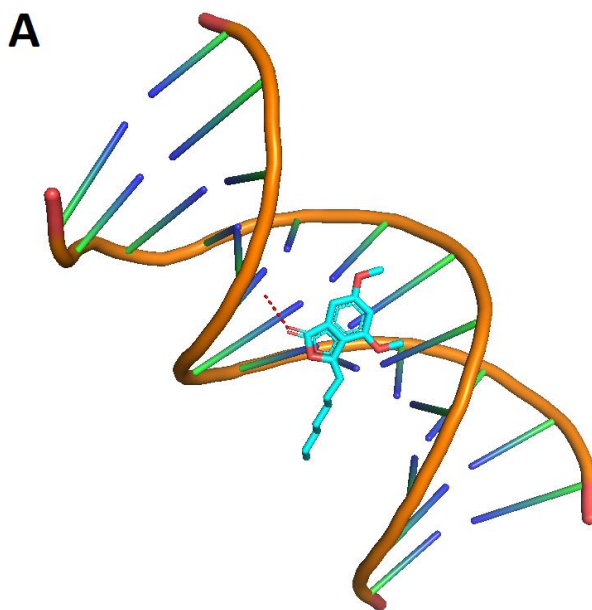


Figure 7. Cont.

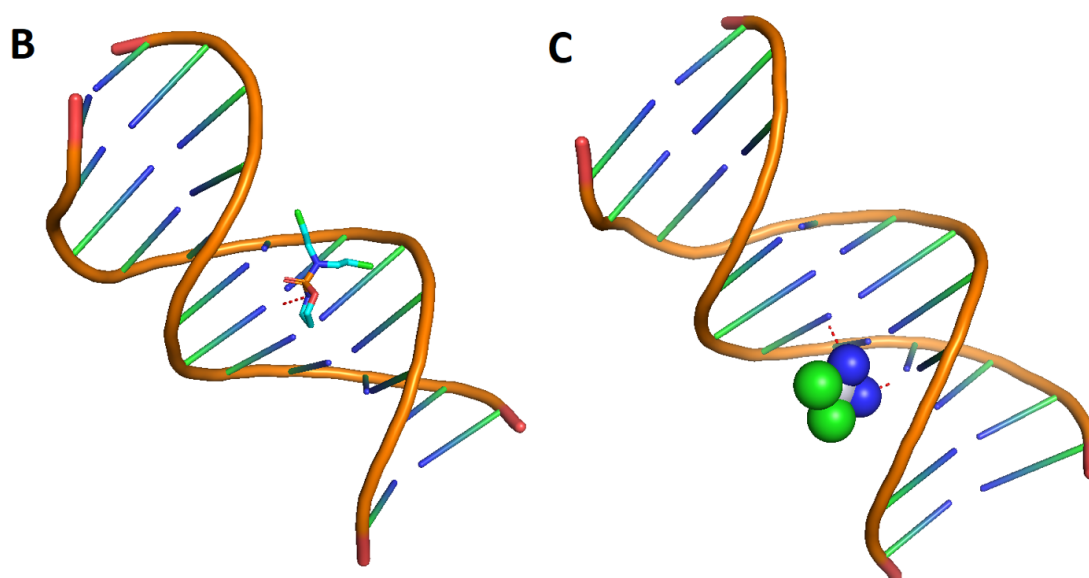


Figure 7. Interactions between the compounds (red dots) and B-DNA: **1** (A), cyclophosphamide (B), and cisplatin (C).

Table 6. Ligand–receptor complex interaction energies with B-DNA (crystallized).

Compound	Docking Score (kcal/mol)
1	−88.75
cyclophosphamide	−90.39
cisplatin	−69.81

The interactions between the B-DNA and the compounds are shown in Figure 7. In addition, the results indicate a certain hydrogen-bonding interaction between the Phthalide, cyclophosphamide, and cisplatin complexes and DNA.

3. Discussion

We described the synthesis of three resorcinol lipids (AMS35AA, AMS35BB, and AMS049) and their effects on short-term biomarkers for carcinogenesis. We also evaluated the effects of these three compounds in association with cyclophosphamide. We observed that all three lipids have important characteristics for developing new chemotherapeutics and/or chemotherapeutic adjuvants. Overall, we also demonstrated that these compounds could enhance the chemotherapeutic effects of cyclophosphamide either by increasing the frequency of DNA damage and cell death or by reducing adverse effects by increasing lymphocyte counts, for example [2,5,6]. However, when analyzing the biological responses of these three compounds, we did not observe a pattern, nor were we able to correlate the different responses to changes in the molecules. Thus, we chose to evaluate **1**, a common precursor of resorcinol lipids, in search of more information about its mechanisms of action.

Phthalide **1** did not induce changes in final weight and organ weight, except for spleen weight. Additionally, no clinical manifestations of toxicity were seen, such as dryness of the mucosa, opacity and bristling of the hair, behavioral abnormalities, skin lesions, lethargy, alterations in walking (locomotor hypoactivity), tremors, decreased food and water intake, and eventually death [7]. Thus, it is suggested that **1** did not induce toxicity. The observed enlargement of the spleen only in the groups treated with **1**, alone or in association with the chemotherapy drug cyclophosphamide, can be explained by the increase in splenic phagocytosis, which was mainly observed in the group treated with Phthalide **1** alone. The three resorcinol lipids that were produced from **1** also showed no signs of toxicity [2,5,6].

Regarding genotoxicity, it was observed that **1** induced an increase in the frequency of chromosomal damage by up to $5.21\times$. However, this same ability was not observed for the

resorptive lipids derived from it, AMS35AA, AMS35BB, and AMS049. These compounds did not cause chromosomal damage when using the same experimental model that was the Swiss mouse [5,6]. AMS35AA also did not induce chromosomal damage in C57BL/6 [2]. However, AMS35BB and AMS049 caused genomic damage [6]. Both genomic damage (assessed by the comet assay) and chromosomal damage (assessed by the micronucleus assay, for example) can be classified as genotoxic damage [8,9]. Genomic damage can be repaired, and chromosomal is already fixed in the cellular genome [10]. Notably, genomic damage can evolve into chromosomal damage [11]. It is considered that **1** causes genetic damage that is more severe than those observed for AMS35BB and AMS049.

In addition to inducing chromosomal damage, **1** also induced increased splenic phagocytosis. This finding was already expected since the spleen can remove micronucleated cells from circulation by activating splenic phagocytosis. Thus, phagocytosis can occur in response to DNA damage as a cellular defense mechanism against genotoxic agents [5,12–15]. AMS35AA also increased splenic phagocytosis. However, this compound did not increase the frequency of genotoxic damage [5]. It is not uncommon for this type of biological response to occur. According to Oliveira et al. [14], a phagocytosis increase was also registered for IR-01, even in the absence of genotoxic damage.

Phthalide **1** increased the frequency of cell death in both the liver and kidneys. This fact was also observed for the resorcinol lipids, AMS35AA, AMS35BB, and AMS049, derived from **1**. This fact allowed the authors to suggest a good antitumor effect for such compounds [5,6]. Furthermore, the antitumor effect has already been confirmed, for example, for AMS35AA in a solid tumor model induced by B16F10 [2].

A fact that drew attention was that **1** increased cell death in the presence of chromosomal damage. AMS35AA, on the other hand, increased cell death in the absence of genotoxic damage, while AMS35BB and AMS049 increased the frequency of cell death in the presence of genomic and non-chromosomal damage. These facts suggest that AMS35AA could be a more selective chemotherapy prototype because it induces cell death without causing DNA damage. This effect is an important feature for a selective antitumor action because, in this way, chemotherapy would no longer have the side effect of inducing damage to the DNA of healthy cells. The induction of DNA damage is a mechanism of action of many chemotherapy drugs, such as cyclophosphamide [16], doxorubicin [17], and cisplatin [18]. However, one of the side effects of these chemotherapy drugs is that they cause DNA damage [11] in all cells, whether they are tumors or not.

Despite the chromosomal damage induced by **1** and the genomic damage caused by AMS35BB and AMS049, these compounds maintain desirable characteristics for developing chemotherapeutic drugs. In this case, it is necessary to develop a cost–benefit ratio since one of the side effects of chemotherapeutic action is in this induction of DNA damage. However, as previously mentioned, several chemotherapeutic drugs on the market already have this mechanism of action/side effect [16–18].

The literature indicates that cell death induced by resorcinol lipids may be mediated by the Nur77 nuclear orphan receptor [19,20] or DNA damage [2,4].

AMS35AA showed cytotoxic effects in MCF-7 cells and induced cell death by apoptosis, mediated by DNA damage, which was confirmed by an increase in the frequency of injured cells in the comet test, as well as by an increase in the gene expression of ATR, p21, p53 and GADD45 [4]. According to Navarro et al. [2], AMS35AA is cytotoxic and genotoxic to B16F10 cells. Cell death occurred via apoptosis and was mediated by DNA damage as it increased the frequency of comets and the expression of ATR, p21, p53, and GAD45AA.

The Nur77 receptor (TR3 or NGFI-B), which is also an option for inducing cell death, is a unique transcription factor that belongs to the nuclear orphan receptor superfamily [21] and is capable of regulating proliferation, differentiation, and apoptosis [22,23]. In tumor cells, Nur77 is an oncogenic survival factor that induces apoptosis by activation in the nucleus and migration to the mitochondria. In mitochondria, it interacts with products of the Bcl-2 gene and induces its conformational change, triggering the release of Cytochrome C and, finally, apoptosis [24–26].

The molecular docking technique can contribute to rational drug design and mechanistic studies by placing a small molecule in the binding site of the DNA target-specific region, mainly in a non-covalent mode [27]. Molecular docking can rapidly assess the binding affinities and modes between a target substrate, such as DNA and diverse ligands [28].

Intercalation requires a significant deformation owing to the formation of a binding cavity [29,30] in contrast to minor and major groove binding that does not require major conformational changes of the DNA [29]. Most DNA-binding drugs bind at the B-DNA and show a higher affinity for AT-rich sequences [30,31]. The structure with sequences with alternating A and T bases is generally narrow, allowing favorable van der Waals contacts between the drug and the DNA [30,32] in contrast to GC-rich sequences where bulky amino groups of guanine bases affect the groove geometry [30,33]. Studies on drug–DNA binding were performed to elucidate the energetic origins of the binding in terms of intermolecular forces and induced conformational changes and to develop new drug design strategies [34,35].

The DNA major groove offers more specific contacts for establishing hydrogen bonds with the drug, but van der Waals contacts are less favorable owing to groove dimensions [33]. Furthermore, the major groove is often occupied by proteins whose biological activity can be affected by minor groove-binding drugs [33]. In most cases, drug–DNA binding is non-covalent, although covalent bonds may be formed with reactive ligands [29,30].

The most negative binding energy shows a more potent DNA-binding affinity. Thus, the DNA-binding affinities show a more significant interaction with the compounds at the structure's major groove region.

Cyclophosphamide is a well-known alkylating agent of the nitrogen mustard type. The phosphoramidate mustard, an activated form of cyclophosphamide, alkylates and/or binds to DNA. Its cytotoxic effect is primarily due to cross-linking of strands of DNA and RNA and the inhibition of protein synthesis [36,37]. This mechanism also corroborates the docking results, where the cyclophosphamide interacts between the DNA strands and destabilizes the structure.

Interestingly, the cisplatin mechanism of action is that the drug induces its cytotoxic properties through binding to nuclear DNA and subsequent interference with normal transcription, and/or DNA replication mechanisms [38]. This statement corroborates the docking results, where the cisplatin interacts with two different points of the DNA structure.

Phthalide docking results showed greater interaction value with the DNA structure in the major groove, similar to the cyclophosphamide interaction. This compound behavior can move the chemotherapeutics from the major groove, decreasing the interaction stability and reducing the time of interaction between DNA and the chemotherapeutics.

Phthalide **1**, in combination with cyclophosphamide and cisplatin, did not increase the frequency of phagocytosis. This fact was already expected since the association of **1** with chemotherapy agents had a chemopreventive effect, reducing the induction of DNA damage. Regarding this fact, it only reduces the frequency of circulating micronucleated cells and reduces splenic activity. As previously reported, the spleen sequesters cells with DNA damage, for example [5,12–15].

A similar situation was reported for AMS35BB and AMS049, where these two compounds prevented DNA damage (genomic damage) and chemopreventive action without changing the frequency of phagocytosis induced by cyclophosphamide [6]. Furthermore, despite preventing genomic damage, AMS35AA increased chromosomal damage induced by cyclophosphamide (even though it was not statistically significant) and increased splenic phagocytosis [5].

Phthalide **1** increased the frequency of cell death in association with cyclophosphamide and cisplatin, and it is suggested that this may have happened even in chemopreventive action. Despite **1** reducing DNA damage, there was still an increase in cell death. It is suggested that this fact may have occurred because resorcinol lipids can cause cell death mediated by activation of the orphan nuclear receptor Nur77 as previously reported [19,20]. Action via this route was also suggested for AMS35AA, AMS35BB, and AMS049 [5,6].

Given the above, we consider that **1**, as well as its derived lipids, has characteristics of interest for developing new chemotherapeutics since it increases the frequency of cell death. In addition, it is assumed that its mechanism of action will involve DNA damage since it increases the frequency of micronuclei, an important biomarker for other chemotherapeutic agents already commercialized.

Notably, similar to its derivatives, **1** can potentiate the effects of cyclophosphamide and thus increase the induction of cell death. Therefore, it could be an important chemotherapeutic adjunct. Additionally, its chemopreventive action can protect healthy cells without negatively interfering with the cell-death-inducing effects of cyclophosphamide. On the other hand, even protecting the DNA (chemopreventive action) continues to potentiate cell death induced by cyclophosphamide.

The present study and the comparison of the biological activities of Phthalide **1** with its derivatives did not allow for the elucidation of the different biological responses presented in this study and those already described [5,6]. Thus, we suggest more studies with methylated and non-methylated molecules to allow a structure-activity study.

Moreover, this work contributes unprecedentedly to the literature in the area by elucidating that **1** can also potentiate the chemotherapeutic effects of cisplatin since none of its derivatives have been tested in association with this chemotherapeutic.

4. Material and Methods

4.1. Chemical Agents, Animals, and Experimental Design

Two positive controls were used: Cyclophosphamide (Fosfaseron[®], Ítaca Laboratories, REG. M.S. No. 1.2603.0056.002-1; Batch 063020, Campo Grande, Brazil) at a dose of 100 mg/kg body weight (b.w.) administered intraperitoneally (i.p.) [5,39] and cisplatin (Intas Pharmaceuticals Laboratory LTD, REG. M.S.1.5537.0002.003-7; Matoda 382210, Índia) at a dose of 6 mg/kg (b.w.; i.p.) [14,40]. The cyclophosphamide was diluted in Mili-Q water.

Phthalide **1** was readily prepared by treating 3,5-dimethoxybenzoic acid with octanoyl chloride in the presence of AlCl₃. This compound has been characterized by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy, and the data match those reported in the literature [1].

Phthalide **1** was first dissolved in DMSO (1%) and subsequently diluted in Mili-Q water (final concentration of 1% DMSO) and administered at doses of 5, 10, and 20 mg/kg (b.w.; i.p.) [41].

In this experiment, 120 sexually mature male (approximately 8–10 weeks) Swiss mice (*Mus musculus*) from the Central Animal Facility of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS) were divided into 12 experimental groups each (*n* = 10 animals).

The animals were kept in polypropylene boxes covered with litter and fed commercial feed (Nuvital[®], Campo Grande, Brazil) and filtered water ad libitum. Temperature and luminosity were controlled using a twelve-hour photoperiod (12 h of light: 12 h of darkness), with a temperature of 22 ± 2 °C and humidity of 55% ± 10 in a ventilated shelf (ALESCO[®], Campo Grande, Brazil).

The experiment was carried out following the Universal Declaration of Animal Rights guidelines with approval from the Ethics committee on Animal Experimentation (CEUA/UFMS) under protocol #399/2012.

The 12 experimental groups were divided as listed below:

Control group: The animals received **1** vehicle (DMSO 1%) and cyclophosphamide (physiological solution—NaCl 0.9%) at a dose of 0.1 mL/10 g b.w.; i.p.) simultaneously.

CYP group: The animals received **1** vehicle (0.1 mL/10 g b.w.) and cyclophosphamide (100 mg/kg b.w., i.p.) simultaneously.

CIS group: The animals received **1** vehicle (0.1 mL/10 g p.c.) and cisplatin (6 mg/kg p.c., i.p.) simultaneously.

Phthalide **1** group: The animals received **1**, in three different doses (5 mg/kg; 10 mg/kg, and 20 mg/kg b.w., i.p.) and the cyclophosphamide vehicle (0.1 mL/10 g b.w., i.p.) simultaneously.

CYP + Phthalide group (Phthalide 1 + cyclophosphamide): The animals received 1 (in three different doses—5 mg/kg; 10 mg/kg, and 20 mg/kg b.w., i.p.) and cyclophosphamide (100 mg/kg b.w., i.p.) simultaneously.

CIS + Phthalide group (Phthalide 1 + cisplatin): The animals received 1 (in three different doses—5 mg/kg; 10 mg/kg, and 20 mg/kg b.w., i.p.) and cisplatin (6 mg/kg b.w., i.p.) simultaneously.

4.2. Biological Assays

4.2.1. Micronucleus Assay in Peripheral Blood

The micronucleus assay in peripheral blood was performed according to Hayashi et al. [42] with modifications by Oliveira et al. [43]. A 20 µL aliquot of peripheral blood was added to the slide previously coated with 20 µL of Acridine Orange (1.0 mg/mL). Then a cover slip was deposited on the biological material. The slide remained in a freezer (20 °C) for two weeks. The analysis was performed in an epifluorescence microscope (Bioval[®], Model L 2000 A), using a 400× objective, with a 420–490 nm excitation filter and a 520 nm barrier filter. Two thousand cells/animal were analyzed.

4.2.2. Splenic Phagocytosis Assay

Twenty microliters of Acridine Orange (1.0 mg/mL) were used to cover the surface of a previously heated slide. After 1/3 of the spleen was macerated in saline solution, 100 µL of cell suspension was placed on the stained slide. Then, a coverslip was placed. The slides were stored in a freezer for further analysis. The analysis was performed using a fluorescence microscope (Bioval[®], Model L 2000 A) at a magnification of 400× with a 420–490 nm filter and a 520 nm barrier filter. One hundred cells per animal were analyzed. The analysis of cells with evidence or absence of phagocytosis was based on the description by Hayashi et al. [42] with modifications by Carvalho et al. [6].

4.2.3. Cell Death Assay

One hundred microliters of liver and/or kidney macerated solution were used to make an extension on a glass slide. After this process, the slide was fixed in Carnoy for 10 min, and soon after, it was subjected to different decreasing concentrations of ethanol (95–25%). Then, it was submitted to baths of the McIlvane buffer for 10 min, stained in Acridine Orange (0.01%, 5 min), and washed in McIlvane buffer for 10 min. The identification of cells undergoing apoptosis was performed by analyzing DNA fragmentation patterns [6].

4.2.4. Calculation of Damage Reduction Percentage (DR%)

The damage reduction percentage is used to assess the chemopreventive capacity of a substance when it is associated with a substance that is inducing wide damage. For this evaluation, the formula proposed by [44,45] was used:

$$RD \text{ or } ID(\%) = \left(\frac{\text{Mean of positive control} - \text{Mean of associate group}}{\text{Mean of positive control} - \text{Mean of negative control}} \right) \times 100 \quad (1)$$

The damage reduction percentage was also adapted for phagocytosis and cell death assays.

4.3. Statistical Analysis

ANOVA analyzed data with Tukey's posteriori test using GraphPad Prism Software (version 3.02; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Values were expressed as mean ± SEM and the significance level was $p < 0.05$.

4.4. Molecular Docking

4.4.1. Computational Details

The virtual protocol, including molecular docking, was performed on the DELL[®] Workstation computer, with Intel[®] Xeon E5-1660 processor, 3.3 GHz, 4 CPUs, NVIDIA[®] GeForce RTX 2060 graphics card, RAM 8 GB, under the Windows[®] operating system.

4.4.2. Protein Preparation

The X-Ray diffraction-based crystal structure of a B-DNA Dodecamer (PDB ID: 1BNA) <https://doi.org/10.1073/pnas.78.4.2179> (accessed on 10 May 2022) was retrieved from the Protein Data Bank <https://www.rcsb.org/> (accessed on 10 May 2022) with a 1.9 Å resolution for the crystal structure of the synthetic DNA dodecamer d (CpGpCpGpApApTpTpCpGpCpG). The water molecules were removed by operating Discovery Studio BIOVIA [46].

4.4.3. Molecular Modeling

The set of 3 compounds was built in the ChemDraw program <https://www.perkinelmer.com/product/chemdraw-professional-chemdrawpro> (accessed on 10 May 2022) from 2D structures of the series. All geometries were virtually constructed and optimized using molecular mechanics (MM+) and semiempirical Austin Model 1 (AM1) methods using HyperChem 7 program <http://www.hyper.com> (accessed on 10 August 2022). The output files were converted to input files .mol2 in the Discovery Studio BIOVIA program using Open Babel (http://openbabel.org/wiki/Main_Page) and then converted to .pdb files as input files to HDock <http://hdock.phys.hust.edu.cn/> (accessed on 10 August 2022).

To predict the best orientation and conformation of the compounds to the BDNA in silico, the HDock web server program was used.

4.4.4. Target Selection and Molecular Docking Simulations

The synthetic B-DNA Dodecamer crystallized structure was obtained through the RSCB PDB under code 1BNA. <https://www.rcsb.org/structure/1BNA> (accessed on 10 May 2022). Then, docking simulations were performed for each inhibitor candidate on the corresponding target. This procedure was performed using the HDock webserver [47]. Thus, the Docking score was evaluated.

Before docking using HDock, the B-DNA and the compounds were uploaded as .pdb files into the web server. The complexes generated by HDock were selected using the best model between the results, which presented the best docking score. The complex structures of the protein site (.pdb) and the ligands (.pdb) were inserted into the BIOVIA Discovery Studio visualizer program to detail the interactions between the ligands and the participating DNA bases.

5. Conclusions

In conclusion, **1** has clinical applicability and could be a candidate for developing a new generation of the chemotherapeutic agent. In addition, **1** has characteristics that can be used as a chemotherapy adjuvant in association with cyclophosphamide and cisplatin since **1** increases the frequency of cell death induced by chemotherapy. Regarding the association of these compounds, it was also reported that the chemopreventive effect of **1**, when associated with cyclophosphamide and cisplatin, can prevent adverse effects (the induction of DNA damage in non-tumor cells) without interfering with the mechanism of action of chemotherapy drugs and, therefore, without reducing the induction of cell death.

Author Contributions: S.C.d.N.: Biometric and analysis of biological materials; F.H.d.A.: Methodology, validation, formal analysis, investigation; W.A.C.: Formal analysis, investigation, writing—review and editing; D.P.d.L.: Data curation, formal analysis, investigation; A.C.F.M.: Formal analysis, investigation, writing; H.R.S.C.: Data curation, Formal analysis, investigation, writing; M.L.B.V. and V.A.d.N.: Scientific review and statistical analysis; C.A.L.K.: Data curation, formal analysis, investigation, A.B.: Methodology, formal analysis, investigation, R.J.O.: Conceptualization, project administration, resources, writing—original draft, supervision, funding acquisition; R.d.S.G.: Conceptualization, project administration, resources, writing—original draft, supervision, funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: ACFM and RSG acknowledge NIH-COBRE (1P20GM109024) and the NDSU Start-up. C.A.L.K thanks FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul) for the support (process 59/300.112/2015).

Institutional Review Board Statement: The experiments were carried out in accordance with the guidelines of the Universal Declaration of Animal Rights with approval from the Ethics committee on Animal Experimentation (CEUA/UFMS) under protocol #399/2012.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors acknowledge to CNPq, CAPES, and UFMS for providing various research grants. ACFM and RSG acknowledge NIH-COBRE, NDEPSCoR, and the NDSU Start-up. Authors are also grateful to FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul) for the support (process 59/300.112/2015).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

CIS	cisplatin
CP	cyclophosphamide
DNA	deoxyribonucleic acid
DMSO	dimethyl sulfoxide
RNA	ribonucleic acid
PDB	protein data bank

References

1. Vitor, N.; Meza, A.; Gomes, R.S.; Rafique, J.; DE Lima, D.P.; Beatriz, A. Straightforward synthesis of cytosporone analogs AMS35AA and AMS35BB. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2021**, *93*, e20201347. [\[CrossRef\]](#)
2. Navarro, S.D.; Pessatto, L.R.; Meza, A.; de Oliveira, E.J.T.; Auharek, S.A.; Vilela, L.C.; de Lima, D.P.; de Azevedo, R.B.; Kassuya, C.A.L.; Cáceres, O.I.A.; et al. Resorcinolic lipid 3-heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one is a strategy for melanoma treatment. *Life Sci.* **2018**, *209*, 300–312. [\[CrossRef\]](#)
3. Stepanenko, I.Y.; Strakhovskaia, M.G.; Belenikina, N.S.; Nikolaev, I.A.; Miliukin, A.L.; Kozlova, A.N.; Revina, A.A.; El'-Registan, G.I. Protection of *Saccharomyces cerevisiae* against oxidative and radiation-caused damage by alkyl hydroxybenzenes. *Mikrobiologiya* **2004**, *73*, 204–210.
4. Rabacow, A.P.M.; Meza, A.; De Oliveira, E.J.T.; De David, N.; Vitor, N.; Antonioli-Silva, A.C.M.B.; De Fátima Cepa Matos, M.; Perdomo, R.T.; Da Silva Gomes, R.; De Lima, D.P.; et al. Evaluation of the antitumor potential of the resorcinolic lipid 3-heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one in breast cancer cells. *Anticancer Res.* **2018**, *38*, 4565–4576. [\[CrossRef\]](#)
5. Navarro, S.D.; Beatriz, A.; Meza, A.; Pesarini, J.R.; Gomes, R.d.S.; Karaziack, C.B.; Cunha-Laura, A.L.; Monreal, A.C.; Romão, W.; Lacerda Júnior, V.; et al. A new synthetic resorcinolic lipid 3-heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: Evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *75*, 132–142. [\[CrossRef\]](#)
6. Oliveira, R.J.; Mantovani, M.S.; Pesarini, J.R.; Mauro, M.O.; da Silva, A.F.; Souza, T.R.; Ribeiro, L.R. 6-Dimethylaminopurine and cyclohexamide are mutagenic and alter reproductive performance and intrauterine development in vivo. *Genet. Mol. Res.* **2015**, *14*, 834–849. [\[CrossRef\]](#)
7. OECD. *Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure*; OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4; OECD Publishing: Paris, France, 2022. [\[CrossRef\]](#)
8. Cordelli, E.; Bignami, M.; Pacchierotti, F. Comet assay: A versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicol. Res.* **2021**, *10*, 68–78. [\[CrossRef\]](#)
9. Sommer, S.; Buraczewska, I.; Kruszewski, M. Micronucleus assay: The state of art, and future directions. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1534. [\[CrossRef\]](#)
10. Mehra, S.; Chadha, P. Naphthalene-2-sulfonate induced toxicity in blood cells of freshwater fish *Channa punctatus* using comet assay, micronucleus assay and ATIR-FTIR approach. *Chemosphere* **2021**, *265*, 129147. [\[CrossRef\]](#)
11. Alhmoud, J.F.; Woolley, J.F.; Al Moustafa, A.E.; Malki, M.I. DNA Damage/Repair Management in Cancers. *Cancers* **2020**, *12*, 1050. [\[CrossRef\]](#)
12. Carvalho, P.C.; Santos, E.A.; Schneider, B.U.; Matuo, R.; Pesarini, J.R.; Cunha-Laura, A.L.; Monreal, A.C.; Lima, D.P.; Antonioli, A.C.; Oliveira, R.J. Diaryl sulfide analogs of combretastatin A-4: Toxicogenetic, immunomodulatory and apoptotic evaluations and prospects for use as a new chemotherapeutic drug. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, *40*, 715–721. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

13. Ishii, P.L.; Prado, C.K.; Mauro, M.d.O.; Carreira, C.M.; Mantovani, M.S.; Ribeiro, L.R.; Dichi, J.B.; Oliveira, R.J. Evaluation of *Agaricus blazei* in vivo for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2011**, *59*, 412–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Oliveira, R.J.; da Cruz Leite Santos, N.; Pesarini, J.R.; de Oliveira, B.C.; Berno, C.R.; de Araújo, F.H.S.; da Silveira, I.O.M.F.; Nascimento, R.O.; Brochado Antonioli-Silva, A.C.M.; Duenhas Monreal, A.C.; et al. Assessment of genetic integrity, splenic phagocytosis and cell death potential of (Z)-4-((1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl) amino)-4-oxobut-2-enoic acid and its effect when combined with commercial chemotherapeutics. *Genet. Mol. Biol.* **2018**, *41*, 154–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bazo, A.P.; Rodrigues, M.A.; Sforcin, J.M.; de Camargo, J.L.; Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M. Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **2002**, *22*, 183–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Swan, D.; Gurney, M.; Krawczyk, J.; Ryan, A.E.; O'Dwyer, M. Beyond DNA damage: Exploring the immunomodulatory effects of cyclophosphamide in multiple myeloma. *Hemasphere* **2020**, *4*, e350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Du, J.; Zhang, A.; Li, J.; Liu, X.; Wu, S.; Wang, B.; Wang, Y.; Jia, H. Doxorubicin-induced cognitive impairment: The mechanistic insights. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 673340. [[CrossRef](#)]
18. Brown, A.; Kumar, S.; Tchounwou, P.B. Cisplatin-Based Chemotherapy of Human Cancers. *J. Cancer Sci. Ther.* **2019**, *11*, 97.
19. Zhan, Y.; Du, X.; Chen, H.; Liu, J.; Zhao, B.; Huang, D.; Li, G.; Xu, Q.; Zhang, M.; Weimer, B.C.; et al. Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 548–556. [[CrossRef](#)]
20. Hao, L.; Wang, X.; Zhang, D.; Xu, Q.; Song, S.; Wang, F.; Li, C.; Guo, H.; Liu, Y.; Zheng, D.; et al. Studies on the preparation, characterization and pharmacokinetics of Amoitone B nanocrystals. *Int. J. Pharm.* **2012**, *433*, 157–164. [[CrossRef](#)]
21. Maruyama, K.; Tsukada, T.; Ohkura, N.; Bandoh, S.; Hosono, T.; Yamaguchi, K. The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily (review). *Int. J. Oncol.* **1998**, *12*, 1237–1243. [[CrossRef](#)]
22. Li, Q.X.; Ke, N.; Sundaram, R.; Wong-Staal, F. NR4A1, 2, 3—An orphan nuclear hormone receptor family involved in cell apoptosis and carcinogenesis. *Histol. Histopathol.* **2006**, *21*, 533–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Winoto, A.; Littman, D.R. Nuclear hormone receptors in T lymphocytes. *Cell* **2002**, *109*, S57–S66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Lin, B.; Kolluri, S.K.; Lin, F.; Liu, W.; Han, Y.H.; Cao, X.; Dawson, M.I.; Reed, J.C.; Zhang, X.K. Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* **2004**, *116*, 527–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Moll, U.M.; Marchenko, N.; Zhang, X.K. p53 and Nur77/TR3—Transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene* **2006**, *25*, 4725–4743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Thompson, J.; Winoto, A. During negative selection, Nur77 family proteins translocate to mitochondria where they associate with Bcl-2 and expose its proapoptotic BH3 domain. *J. Exp. Med.* **2008**, *205*, 1029–1036. [[CrossRef](#)]
27. Rohs, R.; Bloch, I.; Sklenar, H.; Shakked, Z. Molecular flexibility in ab initio drug docking to DNA: Binding-site and binding-mode transitions in all-atom Monte Carlo simulations. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 7048–7057. [[CrossRef](#)]
28. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.C. A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1995**, *9*, 532–549. [[CrossRef](#)]
29. Han, X.; Gao, X. Sequence specific recognition of ligand-DNA complexes studied by NMR. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 551–581. [[CrossRef](#)]
30. Neidle, S.; Nunn, C.M. Crystal structures of nucleic acids and their drug complexes. *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15*, 1–15. [[CrossRef](#)]
31. Ren, J.; Chaires, J.B. Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands. *Biochemistry* **1999**, *38*, 16067–16075. [[CrossRef](#)]
32. Wemmer, D.E. Designed sequence-specific minor groove ligands. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 439–461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Bischoff, G.; Hoffmann, S. DNA-binding of drugs used in medicinal therapies. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 312–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Chaires, J.B. Energetics of drug-DNA interactions. *Biopolymers* **1997**, *44*, 201–215. [[CrossRef](#)]
35. Haq, I.; Ladbury, J. Drug–DNA recognition: Energetics and implications for design. *J. Mol. Recognit.* **2000**, *13*, 188–197. [[CrossRef](#)]
36. Korkmaz, A.; Topal, T.; Oter, S. Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. *Cell Biol. Toxicol.* **2007**, *23*, 303–312. [[CrossRef](#)]
37. Mills, K.A.; Chess-Williams, R.; McDermott, C. Novel insights into the mechanism of cyclophosphamide-induced bladder toxicity: Chloroacetaldehyde's contribution to urothelial dysfunction in vitro. *Arch. Toxicol.* **2019**, *93*, 3291–3303. [[CrossRef](#)]
38. Fuertes, M.A.; Castilla, J.; Alonso, C.; Pérez, J.M. Cisplatin biochemical mechanism of action: From cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 257–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Oliveira, R.J.; Navarro, S.D.; de Lima, D.P.; Meza, A.; Pesarini, J.R.; da Silva Gomes, R.; Karaziack, C.B.; de Oliveira Mauro, M.; Cunha-Laura, A.L.; Monreal, A.C.; et al. A novel cytosporone 3-heptyl-4,6-dihydroxy-3H-isobenzofuran-1-one: Synthesis; toxicological, apoptotic and immunomodulatory properties; and potentiation of mutagenic damage. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 561. [[CrossRef](#)]
40. Berno, C.R.; Rós, B.d.T.; da Silveira, I.O.; Coelho, H.R.; Antonioli, A.C.; Beatriz, A.; de Lima, D.P.; Monreal, A.C.; Sousa, F.G.; da Silva Gomes, R.; et al. 4-Aminoantipyrine reduces toxic and genotoxic effects of doxorubicin, Cisplatin, and cyclophosphamide in male mice. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2016**, *805*, 19–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

41. Araújo, F.H.S.; Figueiredo, D.R.; Auharek, S.A.; Pesarini, J.R.; Meza, A.; Gomes, R.S.; Monreal, A.C.D.; Antonioli-Silva, A.C.M.B.; Lima, D.P.; Kassuya, C.A.L.; et al. In vivo chemotherapeutic insight of a novel isocoumarin (3-hexyl-5,7-dimethoxy-isochromen-1-one): Genotoxicity, cell death induction, leukometry and phagocytic evaluation. *Genet. Mol. Biol.* **2017**, *40*, 665–675. [[CrossRef](#)]
42. Hayashi, M.; Morita, T.; Kodama, Y.; Sofuni, T.; Ishidate, M., Jr. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res. Lett.* **1990**, *245*, 245–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Oliveira, R.J.; Baise, E.; Mauro, M.d.O.; Pesarini, J.R.; Matuo, R.; Silva, A.F.; Ribeiro, L.R.; Mantovani, M.S. Evaluation of chemopreventive activity of glutamine by the comet and the micronucleus assay in mice's peripheral blood. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2009**, *28*, 120–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Manoharan, K.; Banerjee, M.R. β -Carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biol. Int. Rep.* **1985**, *9*, 783–789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Waters, M.D.; Brady, A.L.; Stack, H.F.; Brockman, H.E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutat. Res./Rev. Genet. Toxicol.* **1990**, *238*, 57–85. [[CrossRef](#)]
46. BIOVIA Discovery Studio Visualizer; version 20; Dassault Systèmes: San Diego, CA, USA, 2021.
47. Yan, Y.; Zhang, D.; Zhou, P.; Li, B.; Huang, S.Y. HDock: A web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, W365–W373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.