

Natália Marcelli Stefanos

**AVALIAÇÃO DO EFEITO APOPTÓTICO DAS PIRAZOLINAS
SINTÉTICAS H3TM4 E H3TM6 EM CÉLULAS DE LINHAGENS
DE LEUCEMIAS AGUDAS HUMANAS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmácia da Universidade Federal
de Santa Catarina para obtenção do
Título de Mestre em Farmácia.
Orientadora: Prof^a Dr^a. Maria
Cláudia Santos da Silva

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Stefanes, Natália Marcell

AVALIAÇÃO DO EFEITO APOPTÓTICO DAS PIRAZOLINAS
SINTÉTICAS H3TM4 E H3TM6 EM CÉLULAS DE LINHAGENS DE
LEUCEMIAS AGUDAS HUMANAS / Natália Marcell Stefanes
; orientador, Maria Cláudia Santos da Silva, 2018.
126 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Farmácia. Citotoxicidade.
Pirazolinas. Leucemias Agudas. I. Santos da Silva,
Maria Cláudia. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III.
Titulo.

Natália Marcelli Stefanos

**AVALIAÇÃO DO EFEITO APOPTÓTICO DAS PIRAZOLINAS
SINTÉTICAS H3TM4 E H3TM6 EM CÉLULAS DE LINHAGENS
DE LEUCEMIAS AGUDAS HUMANAS**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Mestre” e aprovado em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Florianópolis, 30 de maio de 2018.

Prof. ^a Dr. ^a Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. ^a Dr. ^a Maria Cláudia Santos da Silva
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. ^a Dr. ^a Lílian Sibelle Campos Bernardes
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

A palavra “agradecer”, como verbo transitivo, significa retribuir de modo equivalente; compensar. Não tenho certeza se um dia eu conseguirei retribuir de modo equivalente à todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para eu chegar até esta etapa tão importante da minha vida. Eu acredito que nessa jornada da vida, nada acontece por acaso. A vida nos oferece as possibilidades e as oportunidades, porém cabe a nós desfrutá-las com sabedoria e humildade. Acredito também que as pessoas que passam pela nossa vida deixam um pouquinho de si e levam um pouquinho de nós, e é assim, dando o melhor de mim nas coisas que eu faço e ajudando sempre que possível, com muito amor e carinho, que eu tento retribuir de alguma forma.

Como verbo intransitivo, a palavra “agradecer” tem o sentido de gratidão. Eu não encontraria uma palavra melhor para descrever o que eu sinto neste momento, GRATIDÃO.

Sou imensamente grata aos meus pais, **Luiz** e **Andreia**, por acreditarem no meu potencial, pelo apoio incondicional e por me ensinarem que na vida nós devemos correr atrás dos nossos objetivos, porque ninguém fará isso por nós. Sou grata também aos meus irmãos, **Stéfano** e **Amanda**, pelo companheirismo de sempre, por me apoiarem e acreditarem no meu potencial. Tudo que eu sou hoje, desde o meu caráter e princípios de vida até a minha garra e dedicação, foi construído espelhado nessa família maravilhosa. Amo muito vocês.

Agradeço ao meu namorado, **Lauro**, pela participação ativa na construção deste trabalho, pelo companheirismo, pela paciência e compreensão nos momentos de nervosismo e/ou estresse, por abdicar de uma vida social agitada para ficar ao meu lado neste momento de preparação da dissertação e por me confortar assistindo um Harry Potter ou uma série nos meus intervalos de descanso. Te amo.

Meus colegas e amigos do **Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias**, à vocês eu deixo também meus sinceros agradecimentos. Com certeza eu apendi um pouquinho com cada um de vocês. Ah se aquelas bancadas falassem... Quantas conversas descontraídas, críticas construtivas, conhecimentos compartilhados, dicas de experimentos ... né?! Cada um de vocês, com suas particularidades, tornaram mais agradável o nosso ambiente de experimentos e estudos. Muito obrigada, espero poder compartilhar bons momentos com vocês ainda!

Mari, sei que já te agradei incontáveis vezes e continuarei agradecendo sempre. Quando eu era uma “bebê IC”, que não sabia nem

fazer um MTT, você sentou do meu lado e com toda a paciência do mundo me repassou os seus conhecimentos. Desde então, eu senti que você segurou na minha mão e até hoje não soltou. Obrigada do fundo do meu coração por toda a ajuda, apoio, dedicação, e-mails infinitos (e engraçados para descontrair um pouco) ... A sua contribuição foi fundamental na construção deste trabalho!

Amigos queridos que eu não citei acima, como o meu objetivo sempre foi terminar o Mestrado antecipadamente, eu acabei trocando as nossas baladas e barzinhos nos finais de semana, pela bancada e pelas “minhas células”. Eu agradeço a compreensão e o apoio de vocês, apesar da distância a nossa amizade continua muito viva, sempre em contato pelo *Whats App* e algumas jantinhas para colocar a fofoca em dia. Podemos não nos ver com muita frequência mas eu sei que vocês estão sempre “ai”, e eu também estarei sempre “aqui” para vocês! O que seríamos de nós sem os amigos?! Todos vocês moram no meu coração.

Agradeço também ao **Prof. Dr. Ricardo José Nunes** e à **Jéssica Osmari Toigo** pela colaboração com a síntese dos compostos e pela disponibilidade de sempre.

Não poderia deixar de agradecer também ao **Programa de Pós-Graduação em Farmácia** e a **CAPES**, pelo financiamento e por permitir a realização deste trabalho.

Por fim, mas com certeza não menos importante, eu agradeço à minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Maria Cláudia Santos da Silva**. Prof, em 2015 quando a Fabi me indicou para ser IC no seu laboratório (obrigada **Fabi**), e a senhora me deu aquela oportunidade, eu me “encontrei”. Naquele momento eu descobri qual era o caminho profissional que eu gostaria de seguir. Desde o início a senhora me acolheu de braços abertos, sempre acreditou no meu potencial, e quando a senhora me aceitou como sua aluna de Mestrado foi a minha oportunidade de ouro, eu me agarrei à ela com toda a minha força e dedicação. Obrigada por tudo! Se não fosse pela senhora, este trabalho não teria acontecido e talvez eu nem fosse Farmacêutica hoje. Além da minha gratidão a senhora tem também a minha admiração.

À todos vocês que contribuíram direta ou indiretamente para a contribuição deste trabalho, fica o meu muito obrigada!

RESUMO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, as neoplasias malignas são uma das principais causas de morte no mundo. No Brasil, as leucemias encontram-se entre os dez tipos de câncer mais frequentes e são consideradas um importante problema de saúde pública. A quimioterapia é a estratégia terapêutica mais utilizada no combate às leucemias, entretanto ela apresenta limitações na sua efetividade em função dos graves efeitos adversos relacionados à toxicidade não seletiva dos quimioterápicos disponíveis e das elevadas taxas de recidiva. Assim, a descoberta de novas moléculas com atividade antitumoral que sejam efetivas e seletivas para as células neoplásicas, bem como a investigação dos seus principais mecanismos de morte celular, tornaram-se grandes desafios para pesquisadores da área de oncologia experimental. Nessa perspectiva, as pirazolininas são compostos heterocíclicos sintéticos que se destacam como uma possível alternativa terapêutica, uma vez que são descritas na literatura por sua grande variedade de atividades biológicas. Considerando o exposto, no presente estudo foi investigada a atividade antileucêmica de seis pirazolininas sintéticas sobre duas linhagens celulares de leucemias agudas humanas K562 e Jurkat. Todas as pirazolininas apresentaram propriedades físico-químicas adequadas para uma boa biodisponibilidade oral, de acordo com as regras de Lipinski e Veber. Os dois novos derivados pirazolinínicos mais eficazes, **H3TM4** e **H3TM6**, foram selecionados para experimentos posteriores. Os ensaios de citotoxicidade, determinados pelo método do MTT, demonstraram que ambos os compostos reduziram a viabilidade das células K562 e Jurkat de forma dependente do tempo e da concentração e foram altamente seletivos para células leucêmicas quando comparados a células não neoplásicas. Além disso, **H3TM4** e **H3TM6** não causaram hemólise significativa em eritrócitos humanos saudáveis. Ainda, os derivados pirazolinínicos selecionados bloquearam o ciclo celular das linhagens K562 e Jurkat na fase G0/G1 e diminuíram a expressão do marcador de proliferação celular KI-67. Adicionalmente, a morte celular apoptótica induzida por **H3TM4** e **H3TM6** foi confirmada por três metodologias distintas (a análise morfológica por microscopia de fluorescência, a marcação com Anexina-V por citometria de fluxo e a fragmentação do DNA). Os resultados sugerem que tanto a apoptose intrínseca quanto a extrínseca estão envolvidas no mecanismo de morte celular induzido pelas pirazolininas selecionadas. As células K562 e Jurkat incubadas com **H3TM4** e **H3TM6** apresentaram aumento da expressão do receptor Fas, diminuição da proteína antiapoptótica survivina e predominância da

proteína pró-apoptótica Bax em relação à proteína antiapoptótica Bcl-2. Esse desequilíbrio resultou na perda do $\Delta\Psi_m$, na liberação de AIF e na ativação de caspase-3. Para finalizar, foi demonstrado que as pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** são citotóxicas não apenas para linhagens celulares leucêmicas, mas também para células neoplásicas de sangue periférico e medula óssea coletadas de pacientes com diferentes subtipos de leucemias agudas.

Palavras-chave: Pirazolinas, leucemia aguda, citotoxicidade, apoptose.

ABSTRACT

According to the World Health Organization, malignant neoplasms are one of the leading causes of death worldwide. In Brazil, leukemias are among the ten most frequent types of cancer and are considered as an important public health problem. Chemotherapy is the most used therapeutic strategy against leukemias, but it has its effectiveness limited due to the serious adverse effects related to the non-selectiveness of the available drugs and to the high relapse rates. Thus, the discovery of new molecules with antitumor activity, effective and selective for neoplastic cells, as well as the investigation of their main mechanisms of cell death, has become a great challenge for researchers in the experimental oncology field. In this perspective, pyrazolines are synthetic heterocyclic compounds that stand out as a possible therapeutic alternative, as they are described in the literature for their several biological activities. Considering the above, the present study investigated the antileukemic effect of six synthetic pyrazolines on two human acute leukemia cell lines, K562 and Jurkat. All pyrazolines presented adequate physicochemical properties for a good oral bioavailability, according to the rules of Lipinski and Veber. The two most effective pyrazoline derivatives, **H3TM4** and **H3TM6**, were selected for further experiments. Cytotoxicity assays, determined by the MTT method, demonstrated that both compounds reduced the viability of K562 and Jurkat cells in a time and concentration-dependent manner and were highly selective for leukemic cells when compared to non-neoplastic cells. Furthermore, **H3TM4** and **H3TM6** did not cause significant hemolysis in healthy human erythrocytes. Still, the selected pyrazoline derivatives blocked the K562 and Jurkat cell cycle in the G₀/G₁ phase and decreased the expression of cell proliferation marker KI-67. Additionally, the apoptotic cell death induced by **H3TM4** and **H3TM6** was confirmed by three different methodologies (morphological analysis by fluorescence microscopy, Annexin-V labeling by flow cytometry and DNA fragmentation). The results suggest that both the intrinsic and the extrinsic apoptosis are involved in the mechanism of cell death induced by the selected pyrazolines. K562 and Jurkat cells incubated with **H3TM4** and **H3TM6** presented an increased FasR expression, a decrease in the anti-apoptotic protein survivin and the predominance of the pro-apoptotic protein Bax in relation to the anti-apoptotic protein Bcl-2. This imbalance resulted in loss of $\Delta\Psi_m$, AIF release and caspase-3 activation. Finally, the results demonstrated that pyrazolines **H3TM4** and **H3TM6** are cytotoxic not only against leukemic cell lines but also to neoplastic cells

from peripheral blood and bone marrow samples collected from patients with different acute leukemia subtypes.

Key words: Pyrazolines, acute leukemia, cytotoxicity, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Classificação das LAs de acordo com a linhagem celular acometida.
- Figura 2** - Estrutura geral das pirazolininas.
- Figura 3** - Sinalização da presença de dano ao DNA e suas principais consequências celulares.
- Figura 4** - Fases do ciclo celular.
- Figura 5** - Alterações morfológicas em células apoptóticas.
- Figura 6** - Principais vias de sinalização da apoptose intrínseca e extrínseca.
- Figura 7** - Estrutura química das pirazolininas sintéticas avaliadas no presente trabalho.
- Figura 8** - Triagem das pirazolininas da série **H3TM** sobre linhagens de LA.
- Figura 9** - Citotoxicidade da pirazolinina **H3TM4** sobre células neoplásicas.
- Figura 10** - Citotoxicidade da pirazolinina **H3TM6** sobre células neoplásicas.
- Figura 11** - Citotoxicidade das pirazolininas **H3TM4** e **H3TM6** sobre células não-neoplásicas.
- Figura 12** - Efeito das pirazolininas **H3TM4** e **H3TM6** sobre o ciclo celular de linhagens de LAs.
- Figura 13** - Expressão da proteína de proliferação celular KI-67 em linhagens de LAs após incubação com **H3TM4** e **H3TM6**.
- Figura 14** - Morfologia das linhagens de LAs após incubação com **H3TM4** e **H3TM6**.
- Figura 15** - Expressão de Anexina-V em linhagens de LAs incubadas com **H3TM4** e **H3TM6**.
- Figura 16** - Fragmentação do DNA das linhagens de LAs incubadas com **H3TM4** e **H3TM6**.
- Figura 17** - Expressão da proteína pró-apoptótica Bax em linhagens de LAs incubadas com **H3TM4** e **H3TM6**.
- Figura 18** - Expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 em linhagens de LAs incubadas com **H3TM4** e **H3TM6**.
- Figura 19** - Avaliação do $\Delta\Psi_m$ das linhagens de LAs incubadas com **H3TM4** e **H3TM6**.
- Figura 20** - Expressão de AIF em linhagens de LAs incubadas com **H3TM4** e **H3TM6**.
- Figura 21** - Expressão da proteína antiapoptótica survivina em linhagens de LAs incubadas com **H3TM4** e **H3TM6**.

Figura 22 - Expressão de FasR em linhagens de LAs incubadas com **H3TM4** e **H3TM6**

Figura 23 - Expressão de caspase-3 ativada em linhagens de LAs incubadas com **H3TM4** e **H3TM6**.

Figura 24 - Curvas concentração-resposta das pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** sobre células de pacientes portadores de LMA.

Figura 25 - Curvas concentração-resposta das pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** sobre células de pacientes portadores de LLA.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Previsão teórica das propriedades físico-químicas das pirazolinás sintéticas.

Tabela 2 - Valores de CI_{50} calculados para **H3TM4** e **H3TM6** após 24, 48 e 72 horas de incubação sobre as linhagens K562, Jurkat, Daudi e células mononucleadas.

Tabela 3 - IS calculado para células neoplásicas em relação às células não neoplásicas, após incubação com **H3TM4** e **H3TM6**.

Tabela 4 - Hemólise induzida por **H3TM4** e **H3TM6** em eritrócitos humanos.

Tabela 5 - Razão entre a expressão da proteína Bcl-2 e a proteína Bax em linhagens de LAs incubadas com **H3TM4** e **H3TM6** por 12 horas.

Tabela 6 - Dados clínicos dos pacientes incluídos no estudo e valores de CI_{50} calculados para **H3TM4** e **H3TM6** sobre suas células mononucleadas.

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
AIF	Fator indutor de apoptose (do inglês, <i>Apoptosis-inducing factor</i>)
ANOVA	Análise de variância
AO	Laranja de acridina (do inglês, <i>acridine orange</i>)
Apaf-1	Fator ativador de protease apoptótica 1 (do inglês, <i>apoptotic peptidase activating factor 1</i>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	<i>Ataxia-Telangiectasia Muted</i>
ATR	<i>Ataxia-Telangiectasia Muted and Rad3-related</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma protein-2</i>
BCSH	<i>British Committee for Standards in Haematology</i>
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BE	Brometo de etídio
BFM	<i>Berlin-Frankfurt-Münster</i>
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês, <i>Bovine serum albumin</i>)
CDKs	Cinases dependentes de ciclinas (do inglês, <i>Cyclin-dependent kinases</i>)
CEPSH	Comitê de Ética de Pesquisa em Seres humanos
CI₅₀	Concentração inibitória 50%
CKI	Inibidores de CDK (do inglês, <i>Cyclin-dependent kinase inhibitors</i>)
cLog P	Log P calculado
CNMC	Comitê de Nomenclatura em Morte Celular
DD	<i>Death domain</i>
DED	<i>Death Effect Domain</i>
DIABLO	Proteína de ligação direta a IAP com baixo ponto isoelétrico (do inglês, <i>Direct IAP Binding protein with low PI</i>)
DISC	Complexo sinalizador indutor de apoptose (do inglês, <i>Death-inducing signaling complex</i>)
DL50	<i>Dose letal 50%</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's médium</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>)

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EPM	Erro padrão da média
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FasR	Receptor Fas (do inglês, <i>Fas receptor</i>)
FSC	<i>Forward Scatter</i>
G0	<i>Gap 0</i>
G1	<i>Gap 1</i>
G2	<i>Gap 2</i>
GI50	Concentração inibitória 50% para proliferação celular
HEPES	Ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]
HU	Hospital Universitário
IAP	Proteínas inibidoras de apoptose (do inglês, <i>Inhibitors of apoptosis proteins</i>)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IS	Índice de seletividade
LA	Leucemia aguda
LALA	Leucemia aguda de linhagem ambígua
LEAT	Laboratório Estrutura e Atividade
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
LOEH	Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias
Log P	Coefficiente de partição
LPA	Leucemia promielocítica aguda
M	Mitose
MDR	Proteínas de resistência a múltiplos fármacos (do inglês, <i>Multiple drug resistance proteins</i>)
MO	Medula óssea
MRN	Complexo enzimático formado por Mre11, Rad50 e Nbs1
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NHEJ	Ligação de extremidades não homólogas (do inglês, <i>non homologous end joining</i>)
NK	<i>Natural killers</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
O6-MeG	O ⁶ -metilguanina
PARP	<i>Poly-ADP-Ribose Polymerase</i>
PBS	Tampão fosfato (do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i>)
PI	Iodeto de propídio (do inglês, <i>Propidium iodide</i>)

PM	Peso Molecular
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>Ribonucleic acid</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S	Síntese
SBF	Soro bovino fetal
SMAC	Segundo ativador de caspases derivado das mitocôndrias (do inglês, <i>Second mitochondria derived activator of caspases</i>)
SMD	Síndrome mielodisplásica
SNC	Sistema nervoso central
SP	Sangue periférico
SSC	<i>Side Scatter</i>
tBid	Bid truncado (do inglês, <i>truncated Bid</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês, <i>Tumor necrosis factor</i>)
TRADD	<i>TNF Receptor-Associated Death Domain</i>
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionada ao fator de necrose tumoral (do inglês, <i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>)
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UV	Ultravioleta
XRCC	<i>X-ray repair cross-complementing protein</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1	ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER.....	27
3.2	LEUCEMIAS AGUDAS (LAs).....	28
3.3	PIRAZOLINAS COMO NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS	33
3.4	MORTE CELULAR E POSSÍVEIS ALVOS TERAPÊUTICOS	34
3.4.1	Danos ao DNA	35
3.4.2	Ciclo celular	38
3.4.3	Apoptose	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	SÍNTESE DAS PIRAZOLINAS.....	47
4.2	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS PIRAZOLINAS 47	
4.3	LINHAGENS CELULARES E CULTIVO CELULAR.....	47
4.4	ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR E DETERMINAÇÃO DAS CURVAS CONCENTRAÇÃO E TEMPO RESPOSTA.....	48
4.5	OBTENÇÃO DE CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO (SP) DE ORIGEM HUMANA	49
4.5.1	Separação das células mononucleadas	49
4.5.2	Teste de hemólise	50
4.6	CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS).....	51
4.7	ANÁLISE DO CICLO CELULAR.....	51
4.8	AValiação DO TIPO DE MORTE CELULAR	52

4.8.1	Avaliação da morfologia celular por microscopia de fluorescência com BE e AO.....	52
4.8.2	Avaliação da apoptose pela metodologia da Anexina V-FITC	52
4.8.3	Ensaio de fragmentação do DNA.....	53
4.9	ANÁLISE DO POTENCIAL MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$)	53
4.10	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS KI-67, BAX, BCL-2, SURVIVINA, AIF, FASR E CASPASE-3 POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	54
4.11	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS MONONUCLEADAS DE PACIENTES PORTADORES DE LAs	54
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
5	RESULTADOS	56
5.1	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS PIRAZOLINAS SINTÉTICAS.....	56
5.2	ATIVIDADE DAS PIRAZOLINAS SINTÉTICAS SOBRE CÉLULAS NEOPLÁSICAS.....	57
5.3	EFEITO DAS PIRAZOLINAS H3TM4 E H3TM6 EM CÉLULAS NÃO-NEOPLÁSICAS.....	61
5.4	EFEITO DAS PIRAZOLINAS H3TM4 E H3TM6 SOBRE O CICLO CELULAR DE CÉLULAS DE LAs	63
5.5	APOPTOSE INDUZIDA PELAS PIRAZOLINAS H3TM4 E H3TM6	65
5.6	EFEITO DAS PIRAZOLINAS H3TM4 E H3TM6 SOBRE A PROTEÍNA PRÓ-APOPTÓTICA BAX E SOBRE A PROTEÍNA ANTIPOPTÓTICA BCL-2	68
5.7	EFEITO DAS PIRAZOLINAS H3TM4 E H3TM6 SOBRE O $\Delta\Psi_m$	70
5.8	EFEITO DAS PIRAZOLINAS H3TM4 E H3TM6 SOBRE O AIF E A PROTEÍNA ANTIPOPTÓTICA SURVIVINA	71
5.9	EFEITO DAS PIRAZOLINAS H3TM4 E H3TM6 SOBRE O RECEPTOR FAS.....	73
5.10	EFEITO DAS PIRAZOLINAS H3TM4 E H3TM6 SOBRE A CASPASE-3 ATIVADA.....	73

5.11	CITOTOXICIDADE DAS PIRAZOLINAS H3TM4 E H3TM6 SOBRE CÉLULAS DE PACIENTES PORTADORES DE LAs.....	74
6	DISCUSSÃO.....	77
7	CONCLUSÃO	94

1 INTRODUÇÃO

Neoplasias ou tumores são processos patológicos resultantes de alterações em genes que controlam, principalmente, o crescimento e a proliferação celular, o que resulta no comprometimento da capacidade de diferenciação das células e na sua proliferação anormal, descontrolada e autônoma. Os processos neoplásicos podem ser benignos ou malignos de acordo com o seu potencial para causar danos ao indivíduo. Neoplasias benignas apresentam células bem diferenciadas, semelhantes ao tecido de origem, costumam ser de crescimento lento, e, geralmente o tumor é delimitado por uma cápsula de tecido fibroso, o que o torna passível de excisão cirúrgica. Ainda, as neoplasias benignas permanecem no local de origem sem invadir tecidos vizinhos ou provocar metástase e não costumam ser letais. As neoplasias malignas, também denominadas câncer, apresentam células com grau variável de diferenciação e proliferação acelerada. Além disso, as neoplasias malignas são invasivas e possuem a capacidade de se infiltrar em tecidos adjacentes e desenvolver metástase, o que pode resultar em perturbações homeostáticas graves e levar o indivíduo a óbito (FILHO; GUIMARÃES; BOGLIOLO, 1998; DE FARIA, 2008; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015). De acordo com o tecido de origem e a caracterização da doença, as neoplasias malignas podem ser subdivididas em dois grandes grupos, os tumores sólidos e as neoplasias hematológicas (FILHO; GUIMARÃES; BOGLIOLO, 1998; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2010; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015; SWERDLOW et al., 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é um importante problema de saúde pública, e, é uma das principais causas de morte no mundo. De acordo com os dados mais recentes publicados por FERLAY et al, (2015), as neoplasias malignas foram responsáveis por 8,2 milhões de mortes em 2012, e a OMS estima um aumento de 70% nos casos incidentes dessa doença até 2038. No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), as estimativas para 2018 e 2019 apontam a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer anuais com 70% deles nas regiões sul e sudeste (INCA, 2018).

Dentre os dez tipos de câncer mais frequentes no Brasil encontram-se as leucemias. Para o biênio 2018-2019 estão previstos no país cerca de 10.800 novos casos desta doença, sendo 5.940 em homens e 4.8600 em mulheres (INCA, 2018). Segundo a literatura, as neoplasias hematológicas, nas quais se destacam as leucemias, são as mais frequentes causas de câncer em crianças, adolescentes e jovens adultos, e

também apresentam alta incidência em pacientes acima de 60 anos de idade (WINTER, 2011; SIEGEL et al., 2018).

O diagnóstico das leucemias é realizado por meio da análise morfológica das células neoplásicas, seguida da análise das características imunofenotípicas, citoquímicas e genéticas (SWERDLOW et al., 2017). Atualmente, o tratamento mais comum para as leucemias é a quimioterapia com fármacos citotóxicos, tais como a vincristina, citarabina, daunorrubicina, etoposídeos, entre outros; os quais são utilizados em combinações específicas para cada subtipo leucêmico (BRASIL, 2014; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; RANG; DALE, 2016). Entretanto, apesar de existirem estratégias terapêuticas bem definidas, o tratamento das leucemias exige elevados recursos financeiros, e está associado a altas taxas de recidiva e a efeitos adversos severos, o que resulta no comprometimento da qualidade de vida dos pacientes (ELMAN; SILVA, 2007; KRUG et al., 2011; PETERS; BROWN, 2015). Assim, apesar dos progressos contínuos envolvendo o entendimento dessas doenças, as leucemias continuam a representar um enorme desafio para pesquisadores, médicos e pacientes (AACR, 2014).

Nesse contexto, o aumento do número de novos casos de neoplasias malignas, incluindo as leucemias, sobretudo em países em desenvolvimento como o Brasil, o alto custo dos tratamentos disponíveis e a baixa seletividade dos quimioterápicos utilizados atualmente mostram a necessidade investigação de novas alternativas de tratamento para os pacientes acometidos por essa doença (STEWART; WILD, 2014; FERLAY et al., 2015). Assim, a investigação de novas moléculas que possam ser protótipos eficientes e seguros para o desenvolvimento de novos fármacos com menos efeitos adversos do que os atualmente disponíveis motivam os pesquisadores na área da oncologia experimental em todo o mundo (OLIVEIRA, 2015; FENG et al., 2016). Nessa perspectiva, as pirazolininas, uma classe de substâncias sintéticas formadas por uma estrutura extremamente estável (KUMAR et al., 2011), destacam-se como uma possível alternativa para o desenvolvimento de novas moléculas com ação antileucêmica, pois possuem uma grande variedade de bioatividades descritas na literatura, incluindo ação antitumoral (KUMAR, 2009; Qi X, 2007; HAVRYLYUK et al., 2011; SHAMSUZZAMAN et al., 2013; MUNEERA; JOSEPH, 2016).

Considerando o exposto acima, o objetivo deste estudo foi investigar um novo derivado pirazolínico com efeito citotóxico sobre células leucêmicas que induza morte celular por apoptose sem apresentar citotoxicidade significativa sobre células não tumorais. Além disso, espera-se que as informações obtidas a partir dos resultados deste trabalho

aprofundem o conhecimento científico sobre as pirazolinas, e que a análise de parâmetros estruturais permita discernir relações estruturatividade a fim de contribuir para o desenvolvimento dessa classe como possíveis compostos antileucêmicos mais seguros e específicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a seletividade das pirazolinias sintéticas previamente selecionadas **H3TM4** e **H3TM6** sobre o modelo leucêmico *in vitro* e investigar os principais mecanismos apoptóticos envolvidos na citotoxicidade de ambos os compostos sobre células de linhagem de leucemia mieloide aguda (K562) e de leucemia linfoblástica aguda (Jurkat) humanas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a capacidade das pirazolinias **H3TM4** e **H3TM6** de causar morte celular em outros modelos de tumores hematológicos e não hematológicos, além das linhagens K562 e Jurkat, utilizando linhagens de linfoma de Burkitt (Daudi) e de melanoma (B16-F10);
- Investigar o efeito das pirazolinias **H3TM4** e **H3TM6** sobre modelos de células não neoplásicas humanas, utilizando, para isso, células mononucleadas e eritrócitos obtidos de voluntários considerados saudáveis.
- Avaliar a seletividade das pirazolinias **H3TM4** e **H3TM6** para células neoplásicas (K562, Jurkat, Daudi e B16-F10) em relação a células não neoplásicas (células mononucleadas);
- Avaliar o efeito das pirazolinias **H3TM4** e **H3TM6** sobre o ciclo celular das células K562 e Jurkat;
- Investigar o efeito das pirazolinias **H3TM4** e **H3TM6** na proliferação celular das linhagens K562 e Jurkat, por meio da avaliação da expressão da proteína KI-67;
- Verificar o tipo de morte celular induzida pelas pirazolinias **H3TM4** e **H3TM6** em células K562 e Jurkat;
- Investigar se a citotoxicidade das pirazolinias **H3TM4** e **H3TM6** em células K562 e Jurkat envolve os seguintes fatores reguladores de apoptose: proteína antiapoptótica Bcl-2, proteína pró-apoptótica Bax, potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), proteína anti apoptótica survivina, fator indutor de apoptose (AIF), receptor Fas (FasR) e caspase-3 ativada;
- Avaliar a citotoxicidade das pirazolinias **H3TM4** e **H3TM6** em ensaios *ex vivo*, utilizando como modelo células mononucleadas de sangue periférico ou medula óssea de pacientes portadores de leucemias agudas

atendidos no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER

Câncer ou neoplasia maligna são termos utilizados para representar um grupo heterogêneo de doenças que apresentam em comum células com grau variável de diferenciação e com alta capacidade proliferativa, as quais possuem a capacidade de invadir tecidos adjacentes e causar metástase (FILHO; GUIMARÃES; BOGLIOLO, 1998; DE FARIA, 2008; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015).

O documento mais antigo encontrado com a descrição de uma doença que se assemelha ao câncer é o Papiro Edwin Smith, escrito em, aproximadamente, 3000 a.C., que relata uma “massa saliente no peito” para descrever o que possivelmente tratava-se de um tumor de mama (HAJDU, 2010). Acredita-se que o termo “câncer” tenha surgido somente por volta de 400 a.C, a partir da palavra grega *karkinos* (caranguejo), baseado nas descrições de Hipócrates de que as veias sanguíneas ao redor de um tumor de mama seriam similares às pontas da carapaça e às patas de um caranguejo. Entre 138-201 d.C. o médico Galeno passou a descrever o câncer como “um estado maligno sistêmico” e sugeriu que a doença fosse tratada não apenas com processos cirúrgicos, como era realizado até então, mas com a administração de “remédios sistêmicos” (MAJNO; JORIS, 2004; HAJDU, 2010; YAN, 2013).

Atualmente sabe-se que o início do processo neoplásico requer mutações em genes que controlam a proliferação, a diferenciação e a morte celular, as quais podem ser resultantes da exposição a agentes carcinogênicos (aproximadamente 80% dos casos) ou herdadas da linhagem germinativa (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2010; SIVEEN et al., 2014). Alguns dos processos exógenos relacionados ao desenvolvimento da malignidade incluem a exposição à radiação ionizante, radiação ultravioleta (UV) e carcinógenos químicos, além de práticas relacionadas ao estilo de vida, como tabagismo, estresse e maus hábitos alimentares. Entre os processos endógenos que resultam em mutações gênicas destacam-se os erros na replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA), a instabilidade química intrínseca das bases de DNA e a ação de radicais livres gerados durante o metabolismo celular (BERTRAM, 2000; LEE et al., 2011; AACR, 2014). Assim, enquanto as células não tumorais preservam o controle de suas taxas de proliferação a fim de permitir a replicação dentro dos limites que mantêm a população em níveis homeostáticos (FILHO; GUIMARÃES; BOGLIOLO, 1998), na carcinogênese ocorre a inativação de genes que inibem a proliferação

celular e a ativação de genes que estimulam a proliferação, além da ativação de genes envolvidos na proteção contra a morte celular programada (HANAHAN; WEINBERG, 2000; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2010).

As neoplasias malignas podem ser subdivididas em dois grupos de acordo com o tecido de origem e a caracterização de cada doença, os tumores sólidos e as neoplasias hematológicas. Os tumores malignos sólidos caracterizam-se pela formação de massas celulares neoplásicas em tecidos previamente íntegros. Quando há o acometimento de tecidos conectivos como músculos, ossos e gordura, os tumores sólidos são denominados de sarcomas. Entretanto, aproximadamente 80% de todas as neoplasias sólidas são originadas em tecidos de revestimento e glandular, e, dessa forma são denominadas de carcinomas. As neoplasias hematológicas são aquelas originadas na medula óssea (MO) e/ou nos tecidos linfoides e compreendem o resultado da desregulação da hematopoiese normal. As neoplasias hematológicas podem ser subdivididas em linfomas, mielomas ou leucemias (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015; SWERDLOW et al., 2017).

3.2 LEUCEMIAS AGUDAS (LAs)

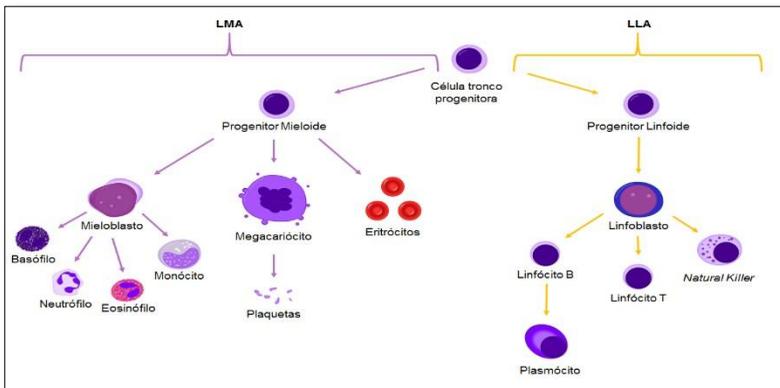
As leucemias constituem um grupo heterogêneo de neoplasias malignas caracterizado pela proliferação clonal de células hematopoiéticas na MO e/ou nos tecidos linfoides, as quais podem atingir a circulação periférica e infiltrar-se em outros tecidos e órgãos (PUI, 2009; SWERDLOW et al., 2017). A proliferação acelerada das células leucêmicas e a consequente infiltração dessas células no ambiente medular resultam na perturbação da hematopoiese normal e inibem a produção de células não neoplásicas como leucócitos, eritrócitos e plaquetas. Como consequência, as manifestações clínicas das leucemias são bastante variáveis e incluem maior suscetibilidade a hemorragias, infecções e anemias (HELMAN et al., 2011; POKHAREL, 2012; SWERDLOW et al., 2017).

A transformação leucêmica pode ocorrer em diferentes fases de diferenciação de células comprometidas com a linhagem linfóide, das quais se originam os linfócitos B e T e as células *natural killers* (NK); ou mieloide, das quais se originam os neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, eritrócitos e plaquetas. Dessa forma, as leucemias podem ser divididas em leucemias linfoides ou mieloides de acordo com a linhagem celular comprometida, e ainda, em agudas ou crônicas de acordo com o estágio de diferenciação celular dos precursores afetados. As leucemias

crônicas são oriundas da proliferação clonal de uma célula neoplásica que possui a capacidade de diferenciação, o que resulta em uma população de células maduras e não funcionais. Já as LAs são caracterizadas pela expansão clonal de uma célula progenitora neoplásica mieloide ou linfoide (blasto leucêmico), a qual não possui a capacidade de maturação (Figura 1) (JAMIESON; WEISSMAN; PASSEQUÉ, 2004; BAIN, 2007; ALBAKR; KHOJAH, 2014; SWERDLOW et al., 2017).

Assim, as LAs são classificadas em leucemia mieloide aguda (LMA), quando há a presença de blastos leucêmicos comprometidos com a linhagem mieloide; em leucemia linfoblástica aguda (LLA), quando há a presença de blastos leucêmicos comprometidos com a linhagem linfoide; e em leucemia aguda de linhagem ambígua (LALA), quando a célula progenitora acometida expressa antígenos associados a mais de uma linhagem celular (cerca de menos de 5% das LAs) (SWERDLOW et al., 2017).

Figura 1 - Classificação das LAs de acordo com a linhagem celular acometida.



As LAs são divididas em LMA, quando originadas de um progenitor mieloide, e LLA quando originadas de um progenitor linfoide. Fonte: Própria.

A LMA é a LA mais frequente em pacientes adultos e a sua incidência aumenta com a idade, sendo mais expressiva em indivíduos acima de 65 anos de idade. Estudos apontam que a taxa de sobrevivência de cinco anos de pacientes portadores de LMA ocorre em apenas 25 % dos casos (SYKES et al., 2015). Pacientes idosos apresentam um prognóstico ainda pior em função da alta incidência de anormalidades genéticas

desfavoráveis. Em crianças, o prognóstico também é desfavorável e aproximadamente um terço das crianças portadoras dessa doença sofrem recidiva após o tratamento inicial (RUBNITZ, 2008; SHAH; AGARWAL, 2008; CORNELL; PALMER, 2012; BRISSOT; MOTY, 2015; SYKES et al., 2015).

A LLA, por outro lado, é mais frequente em crianças entre três e seis anos de idade e, em geral, nesses pacientes, apresenta um bom prognóstico. Aproximadamente 90% das crianças portadoras de LLA entram em remissão na fase inicial do tratamento, porém, em alguns casos, a doença recidiva no Sistema Nervoso Central (SNC), o que diminui as taxas de sobrevida para 10-20%. (HUNGER; MULLIGHAN, 2015; MOORMAN, 2016). Em adultos, a LLA não apresenta um bom prognóstico e a taxa de sobrevida global é baixa, entre 30% e 40%. Além disso, em indivíduos adultos, a refratariedade da LLA, ou seja, a resistência primária ao tratamento, ainda é um grande desafio. Ademais, apenas 50% dos pacientes adultos com LLA em recidiva alcançam uma segunda remissão, e, muitas vezes, a mesma não é sustentada (PULTE et al., 2009; MULLIGHAN, 2012; INABA et al., 2013).

Segundo a OMS, o diagnóstico das leucemias deve ser baseado na análise morfológica das células alteradas, seguida de análise das suas características imunofenotípicas, citoquímicas e genéticas (SWERDLOW et al., 2017).

Assim, as LMAs são subdivididas em sete subcategorias, como segue:

- I. *LMA associada a anormalidades genéticas recorrentes;*
- II. *LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia;*
- III. *Neoplasias mieloides associadas ao tratamento;*
- IV. *LMA não categorizada nos itens anteriores;*
- V. *Sarcoma mieloide;*
- VI. *Proliferação mieloide relacionada com síndrome de Down;*
- VII. *Neoplasias de células blásticas dendríticas plasmocitóides.*

E as LLAs são subdivididas em três subcategorias:

- I. *Leucemia/linfoma linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes;*
- II. *Leucemia/linfoma linfoblástico B não categorizado nos itens anteriores;*

III. *Leucemia/linfoma linfoblástico T (SWERDLOW et al., 2017).*

Após a definição do diagnóstico, o paciente é encaminhado para o tratamento, o qual é variável de acordo com o subtipo de LA. Inicialmente, podem ser utilizadas diferentes combinações de quimioterapia, radioterapia, imunoterapia ou transplante de MO. A quimioterapia é a opção de tratamento mais frequentemente utilizada no combate às LAs, e tem por finalidade inibir a proliferação celular, promover a diferenciação celular e/ou induzir a morte celular programada a fim de eliminar as células leucêmicas e permitir a regeneração da MO. Nos casos de LAs que comprometam o SNC ou os testículos, modificações específicas são realizadas no protocolo terapêutico (ALMEIDA et al., 2005; ROBAK; WIERZBOWSKA, 2009; ROSE-INMAN; KUEHL, 2014; HUNGER; MULLIGHAN, 2015; SAULTZ; GARZON, 2016).

O tratamento padrão das LMA com fármacos citotóxicos foi estabelecido pelo *British Committee for Standards in Haematology* (BCSH) e permanece inalterado há cerca de 40 anos. A quimioterapia inclui uma terapia de indução inicial, que geralmente consiste em combinações de citarabina com uma antraciclina; seguida de uma terapia de consolidação adaptada de acordo com o prognóstico de cada paciente (HAO; KOTA, 2015). O fármaco inibe a enzima DNA polimerase, o que resulta em uma diminuição na replicação e reparação do DNA. Já as antraciclinas, além de inibirem a síntese e o reparo do DNA, também inibem a transcrição de ácido ribonucleico (RNA) em proteínas (DÖHNER; WEISDORF; BLOOMFIELD, 2015; SYKES et al., 2015; SAULTZ; GARZON, 2016; SAYGIN; CARRAWAY, 2017). Já o tratamento das LLAs segue o *International collaborative treatment protocol for children and adolescents with acute lymphoblastic leukaemia* (AIEOP-BFM-LLA-2009), baseado no *Berlin-Frankfurt-Münster* (BFM). As combinações de fármacos quimioterápicos variam de acordo com o subtipo de LLA e com a resposta à terapia inicial, porém é sempre constituído de três fases: indução de remissão, intensificação/consolidação e manutenção (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). De forma geral, o esquema terapêutico inicial consiste em combinações de vincristina, prednisona e uma antraciclina. A vincristina atua nos microtúbulos, interfere na formação do fuso mitótico e, conseqüentemente, provoca um bloqueio na divisão celular. A prednisona se liga a receptores nucleares específicos, o que resulta em uma expressão gênica alterada e na inibição da produção de citocinas pró-

inflamatórias. Ainda, a prednisona diminui o número de linfócitos em circulação, induz a diferenciação celular e estimula a apoptose em células neoplásicas previamente sensibilizadas (PUI; EVANS 2006; PUI, 2009; BASSAN; HOELZER, 2011).

Apesar de ser a estratégia terapêutica mais utilizada no tratamento das LAS, a quimioterapia ainda apresenta graves limitações na sua efetividade. Primeiramente, a fase inicial da quimioterapia tende a ser bastante agressiva, pois tem como objetivo induzir a remissão completa da doença. Além disso, os quimioterápicos utilizados para alcançar esse objetivo não são específicos para células neoplásicas, portanto, apesar de os pacientes frequentemente atingirem uma primeira remissão, essa se dá à custa de uma toxicidade expressiva (ELMAN; SILVA, 2007; KRUG et al., 2011; PETERS; BROWN, 2015). Nesse sentido, há o comprometimento da qualidade de vida do paciente durante o tratamento, pois o mesmo fica susceptível a infecções devido à imunossupressão induzida pela quimioterapia, além de sofrer outros efeitos adversos que variam de acordo com o tipo de quimioterápico, a dose administrada e a duração da quimioterapia. Dentre os principais efeitos adversos associados à baixa seletividade dos fármacos antileucêmicos disponíveis na atualidade, destacam-se náuseas, vômito, anorexia, fadiga, insônia, alopecia, dormência nos membros inferiores e superiores, dentre outros. Ainda assim, apesar da agressividade dessa fase inicial do tratamento, muitos pacientes que atingem uma primeira remissão da doença não conseguem sustentá-la e acabam sofrendo recidivas. Esses pacientes que recidivam, principalmente aqueles acima de 60 anos de idade, dificilmente conseguem atingir a cura ou até mesmo uma remissão prolongada (ELMAN; SILVA, 2007; KRUG et al., 2011; PETERS; BROWN, 2015; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; FENG et al., 2016).

Uma variedade de fatores podem estar envolvidos nos mecanismos de sobrevida das células leucêmicas após a remissão completa. Atualmente, sabe-se que as células-tronco leucêmicas constituem um dos fatores responsáveis pela recidiva das leucemias, uma vez que as mesmas permanecem quiescentes e, portanto, são resistentes à maioria dos quimioterápicos disponíveis (DORRANCE et al., 2015, WANG et al., 2017). Ainda, falhas nos tratamentos quimioterápicos podem ocorrer em resposta a um fenômeno denominado de resistência a múltiplos fármacos (MDR). Esse fenômeno é desencadeado por mecanismos de extrusão, ou seja, pelo efluxo do fármaco para o meio extracelular após o mesmo ter penetrado a membrana plasmática, por meio de bombas de efluxo. Outros fatores também estão relacionados com a resistência a quimioterápicos,

como falhas nos mecanismos regulatórios da apoptose e distúrbios no ciclo celular (RANG; DALE, 2011; GOODMAN; GILMAN, 2012).

Adicionalmente, o aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas, como a survivina, são mecanismos citoprotetores envolvidos na sobrevivência de células tumorais após a quimioterapia (ZAFFARONI; PENNATI; DAIDONE, 2005; EBRAHIMIYAN et al., 2018; LYU et al., 2018).

Considerando que o esquema padrão de quimioterapia permanece inalterado há vários anos, os inúmeros efeitos adversos associados aos fármacos disponíveis e as altas taxas de recidiva das LAs, pesquisadores apontam a necessidade de novas alternativas terapêuticas contra essa doença (DÖHNER; WEISDORF; BLOOMFIELD, 2015; SYKES et al., 2015; SAULTZ; GARZON, 2016; SAYGIN; CARRAWAY, 2017).

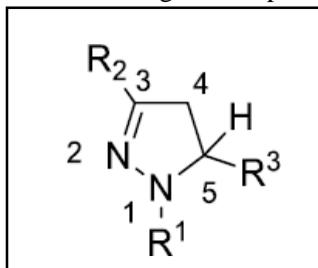
Assim, o objetivo de pesquisadores na área da oncologia experimental tem sido a descoberta de novos compostos efetivos e de baixo custo, com maior seletividade na indução de células neoplásicas à morte e que apresentem poucos efeitos adversos sistêmicos (OLIVEIRA, 2015; FENG et al. 2016).

3.3 PIRAZOLINAS COMO NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS

Compostos heterocíclicos sintéticos são de grande importância para a química moderna devido à sua ampla aplicabilidade em diversos campos, incluindo a química medicinal. De fato, cerca de 85 % dos fármacos disponíveis hoje são de origem sintética. Desses, 62 % são compostos com estruturas heterocíclicas e, além disso, 91 % dos fármacos heterocíclicos disponíveis na atualidade contêm nitrogênio no seu núcleo base (BARREIROS; FRAGA, 2015).

As pirazolininas são exemplos importantes de compostos sintéticos heterocíclicos que contêm um anel de cinco membros extremamente estável, composto por um átomo de nitrogênio na posição 1, um átomo de nitrogênio na posição 2 e uma ligação dupla entre o nitrogênio 2 e o carbono 3 (Figura 2). A síntese desses compostos ocorre a partir da ciclização de chalconas (cetonas aromáticas α,β -insaturadas) por diferentes métodos, dentre eles, a reação de chalconas com hidrazinas em refluxo com ácido acético (KUMAR et al., 2011). Os derivados pirazolinínicos resultantes dessa rota de síntese tem sido extensivamente explorados na área da química medicinal como moléculas candidatas a estudos de relação estrutura-atividade com potencial utilidade terapêutica (TÓTH et al., 1989; SZÖLLÖSY et al. 1991; LÉVAI 1998; LÉVAI et al. 2002; LÉVAI et al., 2004; LÉVAI, 2005; LÉVAI; JEKO, 2005).

Figura 2 - Estrutura geral das pirazolininas.



Fonte: Própria.

Entre as diversas atividades biológicas dos derivados pirazolínicos descritas na literatura estão incluídas as atividades antimicrobiana (MUMTAZ et al., 2015; JOSHI et al., 2016), antituberculínica (TAJ et al., 2011; JOSHI et al., 2016), antioxidante (TAJ et al., 2011; KAHRIMAN et al., 2016), anti-inflamatória (BANDGAR et al., 2012; CHEN et al., 2017) e antitumoral (TAJ et al., 2011; WANG et al., 2017; CAO et al., 2018). Apesar de existirem diversos estudos relatando a citotoxicidade de pirazolininas em modelos de câncer de fígado (HUSSAINI et al., 2016), pulmão (GEORGE; FOUAD; GOMAA, 2016), mama (MÓTYÁN et al., 2015), cervical (YU et al., 2014), colorretal (SHIN et al., 2016), entre outros (RAMÍREZ-PRADA et al., 2017; TESSMANN et al., 2017), existem poucos estudos que avaliaram o efeito desses compostos no modelo de LA (ZSOLDOS-MÁDY et al., 2006; INSUATSY et al., 2011; SHAMUSUZZAMAN et al., 2013; KARABACAK et al., 2015; BUBNIAK et al., 2017; BAO et al., 2018).

Dessa forma, considerando a necessidade de investigação de novos compostos antileucêmicos, a facilidade e a alta disponibilidade de compostos sintéticos em relação aos naturais, a importância de compostos heterocíclicos e principalmente, os efeitos promissores de derivados pirazolínicos em uma grande variedade de modelos de neoplasias malignas, a classe química das pirazolininas representa uma alternativa terapêutica para a quimioterapia convencional e estudos que investiguem os seus principais alvos de morte celular são de grande importância para o campo da oncologia experimental.

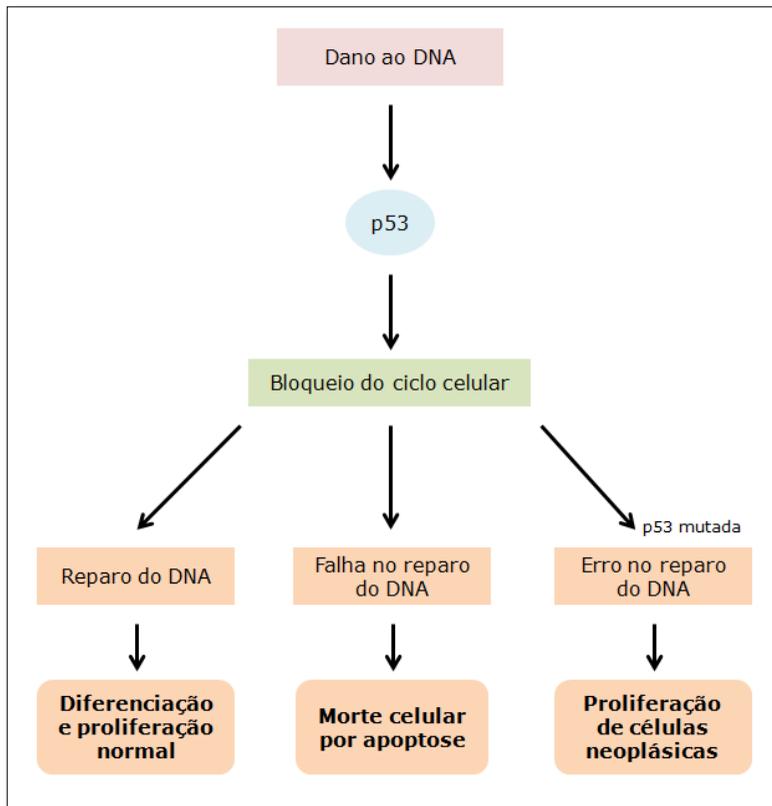
3.4 MORTE CELULAR E POSSÍVEIS ALVOS TERAPÊUTICOS

A homeostase celular é resultante de um equilíbrio entre a proliferação, a diferenciação e a morte celular programada. Em processos neoplásicos ocorre a proliferação excessiva de células malignas como consequência de falhas nos mecanismos intracelulares que mantêm a homeostase, tais como mutações em genes que codificam proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, inativação de proteínas pró-apoptóticas e expressão aumentada de proteínas antiapoptóticas, o que pode resultar, também, na imortalidade dessas células (FESIK, 2005; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Assim, a indução das células neoplásicas à apoptose por meio de alterações celulares como dano ao DNA e bloqueio do ciclo celular compreendem alguns dos principais mecanismos de citotoxicidade desejados para novos agentes quimioterápicos (HAAKE; POLAKOWSKA, 1993; PEPPONI et al., 2003; FESIK, 2005; WICKMAN, et al., 2012).

3.4.1 Danos ao DNA

Durante muito tempo acreditava-se que a estrutura primária do DNA era extremamente estável e não estaria sujeita a alterações químicas (FRIEDBERG, 1997). Atualmente, sabe-se que diariamente ocorrem milhares de lesões à estrutura do DNA, as quais são causadas por uma variedade de agentes químicos e físicos, sejam eles endógenos ou exógenos, assim como erros no próprio processo de síntese do DNA (FRIEDBERG et al., 2006; PUGAZHENDHI et al., 2018). Como exposto anteriormente, em resposta a esses danos, podem ser iniciadas vias de sinalização que têm como objetivo o reparo do DNA ou vias de sinalização que culminem em morte celular (Figura 3). Ainda, mutações e a inativação de genes envolvidos na resposta ao dano no DNA têm sido associadas à instabilidade genômica e predisposição ao câncer (MOLINARI, 2000; KASTAN; BARTEK, 2004; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013)

Figura 3 - Sinalização da presença de dano ao DNA e suas principais consequências em alvos celulares.



Em resposta à identificação de danos ao DNA, a proteína p53 induz o bloqueio do ciclo celular para que ocorra o reparo do DNA e prossiga com a proliferação celular normal. Se houver falha no reparo e o dano ao DNA não for corrigido, ocorre a sinalização para a morte celular por apoptose. No caso de mutação na proteína p53, a integridade do genoma fica comprometida e poderá ocorrer a proliferação de células potencialmente catastróficas (FESIK, 2005; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Fonte: Própria

De forma geral, os danos ao DNA podem ser divididos em danos à fita simples e danos à fita dupla. Os danos à fita simples são mais comuns e ocorrem diariamente sem causar grandes danos ao indivíduo. Basicamente, o dano à fita simples pode ser induzido pela ação errônea

da enzima DNA topoisomerase 1, a qual é responsável por catalisar a proteína helicase, encarregada por separar as fitas de DNA durante o processo de replicação. Já os danos à fita dupla são mais raros e estão associados a uma maior citotoxicidade e, conseqüentemente, possuem grande potencial de comprometer o material genético. Ambos os tipos de dano ao DNA podem ocorrer em resposta à ação de agentes endógenos, como a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e também podem ocorrer em resposta à agentes exógenos, como a exposição à agentes químicos e a radiações ionizantes. (DRISCOLL; JEGGO, 2006; CALDECOTT, 2008; KOZAK et al, 2009).

Existem diversas estratégias fisiológicas a fim de reparar danos causados ao genoma celular. Em geral, o mecanismo de reparo de dano à fita simples inicia-se com a ligação e ativação da proteína poli-(ADP-ribose) polimerase 1 (PARP1), seguida da ligação do complexo XRCC1 (do inglês, *X-ray repair cross-complementing protein*), o qual é responsável por estabilizar o complexo enzimático responsável pelas etapas subsequentes do reparo do DNA. Cada tipo de dano será reparado pela ligação da DNA-ligase a uma enzima específica. Por outro lado, quem faz a detecção inicial do dano à fita dupla é o complexo enzimático MRN (complexo enzimático formado por Mre11, Rad50 e Nbs1), o qual recruta as proteínas quinases ATM (do inglês, *Ataxia-Telangiectasia Muted*) e ATR (do inglês, *Ataxia-Telangiectasia Muted and Rad3-related*), responsáveis pela ativação de pontos de checagem e interrupção do ciclo celular. Os mecanismos de reparo ao dano ocasionado à fita dupla são divididos em recombinação homóloga (HR), processo iniciado com a formação de extremidades 3' livres nas fitas danificadas, seguido da busca de regiões homólogas na fita de DNA do cromossomo homólogo (que será utilizada como molde para o reparo); e recombinação não-homóloga (NHEJ), que inicia-se com a ligação do heterodímero KU às extremidades danificadas, seguido da ligação das proteínas responsáveis pelo processamento das extremidades danificadas (DNAPK e Ártemis,). A ligação dessas proteínas é mediada pelo complexo XRCC4– DNA-ligase 4 (DRISCOLL; JEGGO, 2006; CALDECOT, 2008; LI, YU, 2014).

Diversos agentes quimioterápicos apresentam a propriedade de induzir dano ao DNA celular. Dentre os agentes alquilantes utilizados na clínica, destacam-se a procarbazina, estreptozotocna, temozolomida, mitoxantrona, etoposido, bendamustina e carmustina. As duas principais lesões ao DNA geradas pela quimioterapia com agentes alquilantes são a lesão O⁶-metilguanina (O⁶-MeG) e “crosslinks” entre fitas de DNA (PEPPONI et al., 2003; LEONI et al., 2008; SMART et al., 2008; HE et al., 2017). A lesão O⁶-MeG é reconhecida por ser extremamente tóxica,

pois leva ao emparelhamento errôneo das bases do DNA no momento da replicação e, por esse motivo, é uma potente indutora de morte celular (PEPPONI et al., 2003). Outro exemplo de quimioterápicos que induzem dano ao DNA são os agentes cloroetilantes, os quais podem levar à formação da lesão O⁶-cloroetilguanina na estrutura do DNA. Quando não reparada, essa lesão é convertida em 1-O⁶-etanoguanina que, após um rearranjo molecular, forma uma ligação cruzada no DNA (“*Interstrand-Crosslinks*”), o que impede a abertura da dupla fita e bloqueia a replicação e transcrição (MCHUGH et al., 2001).

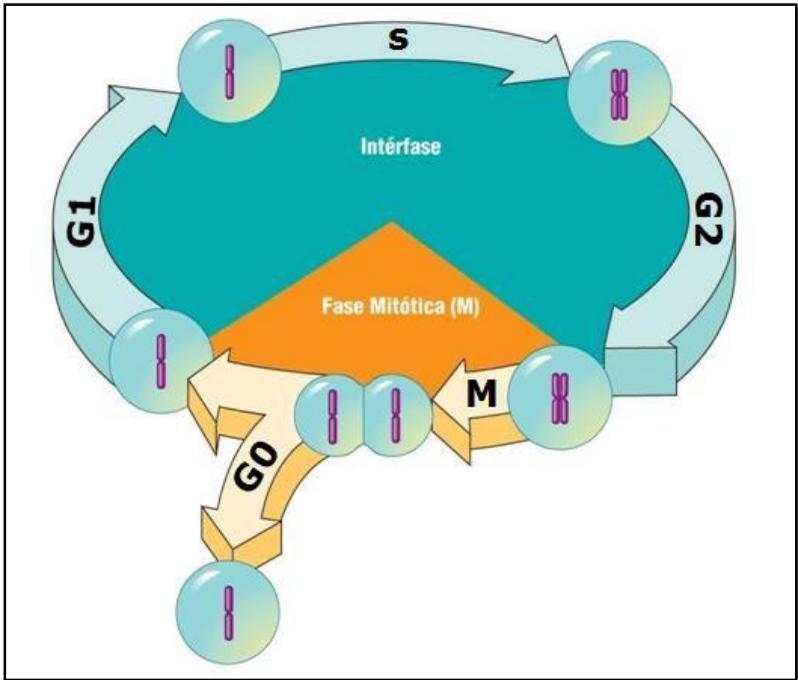
Atualmente existem estudos clínicos em fase III com fármacos antitumorais inibidores de PARP, pois a inibição dessa proteína prejudica os eventos iniciais de reparo a danos no DNA (DRISCOLL; JEGGO, 2006; LI, YU, 2014). Recentemente, os agentes alquilantes têm ganhado destaque na literatura e hoje são utilizados para o tratamento de diversos tipos de neoplasias, tais como melanoma, neuroblastoma, glioblastoma, câncer de mama e câncer no pulmão, além de neoplasias hematológicas como LAs, leucemia linfocítica crônica e linfomas (KAINA et al., 1997; LEONI et al., 2008; SMART et al., 2008; ANNOVAZZI; MELLAI; SCHIFFER, 2017; HE et al., 2017).

3.4.2 Ciclo celular

A progressão pelas fases do ciclo celular é um processo regulado por sinalizações bioquímicas complexas. Esse controle é extremamente importante para a manutenção do ritmo de proliferação, para garantir a correta replicação do DNA, a segregação dos cromossomos homólogos para as células filhas originadas durante a divisão e para a coordenação dos processos de diferenciação, senescência e morte celular (SCHWARTZ; SHAH, 2005; BRADFORD, et al 2010; TARN; LAI,2011).

O ciclo celular é composto por dois eventos principais: a síntese de DNA (fase S) e a divisão da célula-mãe em duas células-filhas durante a mitose (fase M). A fase entre a divisão celular e a síntese de DNA é denominada fase G₀/G₁, enquanto que a fase entre a síntese de DNA e a mitose é denominada fase G₂/M. As células que se encontram metabolicamente ativas, porém que não entraram no ciclo de replicação celular, são denominadas quiescentes e encontram-se na fase G₀ até que ocorra um estímulo mitótico extracelular para sinalizar a saída da fase G₁ (Figura 4) (ALBERTS et al., 2004; MALUF et al., 2011; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Figura 4. Fases do ciclo celular



O ciclo celular é composto pelas fases: G1, onde ocorre o crescimento celular e o primeiro ponto de checagem; S, onde ocorre a síntese de DNA e a duplicação cromossômica; G2, onde a célula começa a se preparar para a divisão e onde ocorre o segundo ponto de checagem; e M, onde ocorre a citocinese (divisão da célula em duas). Na fase G0, as células estão metabolicamente ativas, mas não entraram no ciclo de proliferação (quiescentes). Fonte: Adaptado de www.ciclocelular.com.br

Durante a fase G1 do ciclo celular ocorre a descondensação dos cromossomos e a célula sintetiza proteínas necessárias para a fase S, como, por exemplo, as enzimas responsáveis pela duplicação do DNA. Após o momento definido como ponto de restrição (final da fase G1), a progressão do ciclo celular começa a ser controlada por mecanismos intracelulares que envolvem a ativação das proteínas específicas (ALBERTS et al., 2004; MALUF et al., 2011; HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013). Localizado entre as fases G1 e S, encontra-se o primeiro checkpoint (ponto de checagem). Quando são identificados erros na fase G1, a proteína p53 ativa genes inibidores de

crescimento, os quais induzem a parada do ciclo celular para que seja realizado o reparo ao dano genômico (GHOBRIAL; WITZIG; ADJEI, 2005; HUNTER et al., 2007; ABBAS; DUTTA, 2009). Na sequência, a célula passa para a fase S, onde a mesma realiza a replicação do seu material genético. Quando a duplicação do DNA já está completa, inicia-se a fase G2. Nessa fase ocorre a diferenciação celular e a síntese de proteínas necessárias para a mitose. Entre as fases G2 e M, encontra-se o segundo checkpoint. Diante de danos irreparáveis nesse ponto de checagem do ciclo celular, a proteína p53 inibe o complexo responsável pela regulação da mitose, assim a prófase não é iniciada e a mitose é interrompida. Se o dano ao DNA for devidamente reparado, a progressão do ciclo celular segue para a fase M. A fase M é a fase de divisão propriamente dita, onde ocorre a separação nuclear. Esse processo compreende os processos de prófase, metáfase, anáfase e telófase; e antecede a citocinese, que é divisão de uma célula em duas células-filhas (ALBERTS et al., 2004; FERREIRA; ROCHA, 2004; ZILFOU; LOWE, 2009; MALUF et al., 2011; HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013).

A proliferação celular constante e descontrolada é uma das principais características de células neoplásicas e é um dos principais mecanismos biológicos envolvidos na oncogênese. As células malignas comumente superexpressam a proteína KI-67 durante todas as fases do ciclo celular, entretanto, a mesma não é expressa em células quiescentes. Por esse motivo, na clínica, a proteína Ki-67 é considerada um marcador de proliferação celular, e, ainda, a avaliação da sua expressão é utilizada como um marcador prognóstico para diversos tipos de neoplasias (YANG et al., 2004; YANG et al., 2006; PATHMANATHAN; BALLEINE, 2013).

Nessa perspectiva, os pontos de checagem que bloqueiam a proliferação celular são fundamentais para a interrupção da progressão de mutações que poderão vir a resultar em uma neoplasia maligna, pois integram não somente respostas a danos ao DNA, mas também caminhos essenciais para a sobrevivência celular (MALUF et al., 2011; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013). Os *checkpoints* do ciclo celular são controlados por diversas enzimas denominadas cinases dependentes de ciclinas (CDKs). As CDKs interagem com proteínas específicas denominadas ciclinas, formando o complexo catalítico-CDK ativo. As concentrações de CDKs permanecem estáveis durante todo o ciclo celular, enquanto que a disponibilidade de ciclinas é variável ao longo da progressão do mesmo. Dessa forma, a expressão de determinadas ciclinas determinam a ativação de CDKs

específicas em cada fase do ciclo celular. A identificação de erros no processo de replicação celular leva à formação de um complexo estável entre as CDKs e proteínas inibidoras de CDKs (CKIs). As CKIs impedem a ligação das CDKs às suas respectivas ciclinas e, quando o dano ao DNA não pode ser reparado, são ativadas vias que iniciam a morte celular programada (MALUMBRES et al., 2009; MALUF et al., 2011; HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013; BONELLI et al., 2014). Nesse caso, a proteína p53, dentre outras, induz a expressão de genes efetores pró-apoptóticos que induzem a célula à apoptose com o objetivo de eliminar as células modificadas que possuem potencial catastrófico (MOLINARI, 2000; KASTAN; BARTEK, 2004; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

3.4.3 Apoptose

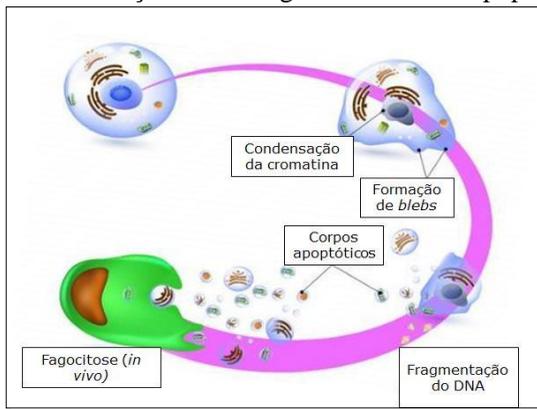
Antigamente acreditava-se que a morte celular era um processo de caráter apenas degenerativo, a qual era iniciada em resposta a lesões celulares, infecções e ausência de fatores de crescimento. Atualmente sabe-se que a morte celular pode ser minimamente controlada e resultante de uma série de estímulos intracelulares e extracelulares, além de também ser um dos eventos cruciais na evolução de diversas doenças (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; GALLUZZI et al., 2012).

De acordo com o Comitê de Nomenclatura em Morte Celular (CNMC), os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas, bioquímicas e funcionais. Mais de dez tipos de morte celular já foram descritos pelo CNMC, tais como necroptose, necrose, ferroptose, poroptose, partanatos, entose, morte celular imunogênica, mitose catastrófica e apoptose (GALLUZZI et al., 2018). A apoptose é o tipo de morte celular mais bem descrito na literatura e pode ser definida como um processo altamente regulado, com vias de sinalização definidas que podem ser ativadas por substâncias e genes envolvidos na homeostase ou por alterações patológicas específicas. Inicialmente, a apoptose foi considerada como sinônimo de morte celular programada em comparação à necrose (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). Atualmente, na revisão de 2018, o CNMC propôs que o termo morte celular programada seja utilizado somente para processos de morte celular regulada que ocorram de forma fisiológica. De acordo com o CNMC, a apoptose induzida por compostos citotóxicos passou a ser denominada morte celular regulada (GALLUZZI et al., 2018).

O processo de apoptose pode ser reconhecido por características morfológicas marcantes e coordenadas. Dentre elas, destacam-se a

diminuição do volume celular e a condensação da cromatina, a qual se concentra junto à membrana nuclear que se mantém intacta. Nessa etapa, a morfologia da maioria das organelas permanece preservada, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A proteína fosfatidilserina, normalmente localizada na parte interna da membrana plasmática, é translocada para o meio externo. A seguir, ocorre a formação de prolongamentos da membrana celular (*blebs*) e a formação de corpos apoptóticos, onde o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. O processo de fragmentação internucleossômica do DNA ocorre segundo um padrão característico no qual uma endonuclease produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, porém sempre múltiplos de 180 - 200 pares de base (“padrão em escada”). Finalmente, as células em processo de morte ou os corpos apoptóticos são fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório expressivo (*in vivo*) (Figura 5) (HAAKE; POLAKOWSKA, 1993; KROEMER et al., 2008; SIVAGNANAM; PALANIRAJAN; GUMMADI, 2017).

Figura 5. Alterações morfológicas em células apoptóticas



Células em apoptose sofrem alterações morfológicas tais como diminuição do volume celular, condensação da cromatina, formação de “*blebs*” de membrana plasmática, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos, os quais, *in vivo*, serão fagocitados por macrófagos. Fonte: Adaptado de Brasil ESCOLA.

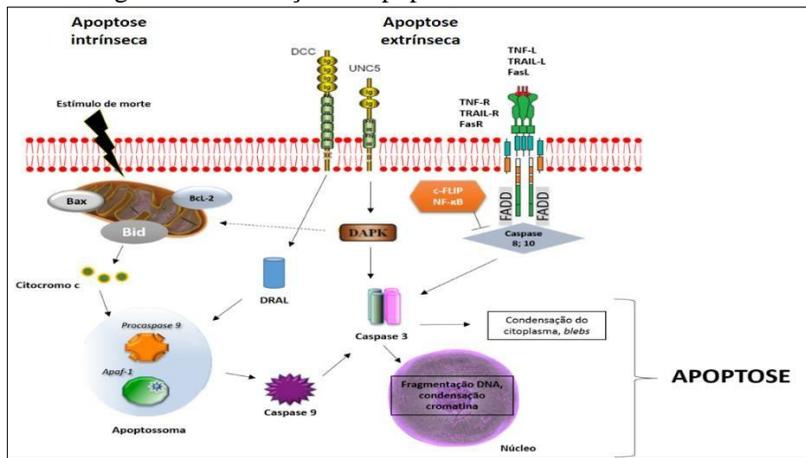
Segundo a literatura, ocorrem dois processos distintos responsáveis pela regulação da apoptose: a apoptose intrínseca e a apoptose extrínseca (Figura 6) (GALLUZZI et al., 2018).

A apoptose intrínseca é ativada por estresses intracelulares ou extracelulares, como a privação de fatores de crescimento, danos ao DNA, hipóxia, ativação de oncogenes e concentrações elevadas de EROS e radiação UV. Os sinais transduzidos em resposta a esses estímulos convergem principalmente para a mitocôndria. Esses estímulos induzem uma transição da permeabilidade da membrana mitocondrial pela formação de poros de transição (MITA, MITA; TOLCHER, 2006; ELMORE, 2007; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; MELET et al., 2008; FRENZEL et al., 2009; GOLDAR et al., 2015; GALLUZZI et al., 2018). Esses poros de transição de permeabilidade mitocondrial são regulados pelos membros da família Bcl-2, tais como Bax, Bak, Bok, Bim, Bad, Bid, Bik, Bmf, Puma, Noxa, Hrk, Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, A1 e Bcl-B, os quais possuem funções opostas, ou seja, enquanto algumas proteínas possuem efeito antiapoptótico, outras ativam a apoptose (KROEMER, GALLUZZI; BRENNER, 2007; YOULE; STRASSER, 2008; FRENZEL et al., 2009; CZABOTAR et al., 2014; GOLDAR et al., 2015; GALLUZZI et al., 2018).

Dessa forma, o estresse celular resulta no desequilíbrio entre a expressão de proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2, como a proteína 2 do linfoma de células B (Bcl-2, do inglês B-cell lymphoma) e de proteínas pró-apoptóticas, como a proteína X associada a Bcl-2 (Bax), ambas localizadas no espaço intramembranar da mitocôndria. Esse desequilíbrio resulta na emissão de um sinal capaz de induzir a formação dos poros de transição, o que leva à despolarização e à perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Em consequência da perda do $\Delta\Psi_m$, ocorre a liberação de proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembranar para o citosol, como, por exemplo, o citocromo *c*, o fator indutor de apoptose (AIF), a endonuclease G e as proteínas Smac/DIABLO (KROEMER, GALLUZZI; BRENNER, 2007; OW et al., 2008; SHERIDAN et al., 2008; AUTRET; MARTIN, 2009; TAIT; GREEN, 2010; GOLDAR et al., 2015; GALLUZZI et al., 2018). O citocromo *c* liberado no citosol interage com o fator ativador de protease apoptótica 1 (Apaf1), que se liga-se à pró-caspase 9 e formam um complexo denominado apoptossoma. O apoptossoma leva à ativação da caspase iniciadora (caspase-9), a qual cliva a caspase-3 (caspase efetora) e prossegue com a cascata das caspases que medeiam a apoptose (ZOU et al., 1997; JIN; EL-DEIRY, 2005; YUAN; AKEY, 2013; GOLDAR et al., 2015; GALLUZZI et al., 2018). Adicionalmente, o AIF e a endonuclease G podem induzir a morte celular de maneira independente de caspases por meio da indução de condensação da cromatina e da clivagem do DNA (LI et al., 2001; SEVRIUKOVA, 2011). Ainda, a proteína pró-

apoptótica Smac/DIABLO ativa a cascata de caspases por interagir e antagonizar as proteínas inibidoras da apoptose (IAPs), dentre as quais destaca-se a proteína survivina (GUSTAFSSON; GOTTLIEB, 2008; VANDE WALLE et al., 2008; GOLDAR et al., 2015).

Figura 6. Sinalização da apoptose intrínseca e extrínseca.



A apoptose intrínseca é ativada por estímulos intra ou extracelulares que provocam um desequilíbrio entre membros da família Bcl-2, o que resulta na perda do $\Delta\Psi_m$ e na consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas, como o citocromo c. Este por sua vez forma o apoptossoma que ativa a caspase iniciadora -9 e permite a fosforilação da caspase-3. A caspase-3 ativada cliva substratos específicos que resultam em alterações morfológicas seguidas da execução da apoptose. A apoptose extrínseca é iniciada pela ativação de receptores localizados na membrana plasmática. Os receptores trimerizados interagem com as proteínas adaptadoras FAAD e TRAAD e com a pró-caspase-8, que, quando ativada, ativa diretamente a caspase-3, apoptose (GOLDAR et al., 2015; GALLUZZI et al., 2018). Fonte: Adaptado de GALLUZZI et al. (2012), SILVA, I. T. D. (2013) e BIGOLIN (2016).

A sinalização da apoptose pela via extrínseca é iniciada pela ativação de receptores localizados na membrana plasmática, por meio de estímulos extracelulares. Esses receptores, tais como o fator de necrose tumoral (TNF-R), FasR (também chamado de Apo-1 ou CD95), DR-3 (também chamado de Apo-2), DR-6 e TRAIL-R, são denominados receptores de morte (AMARANTE-MENDES; GRIFFITH, 2015;

GOLDAR et al., 2015; GALLUZZI et al., 2018). Os receptores de morte possuem um domínio extracelular rico em cisteína, o qual é responsável pela ligação do receptor ao seu ligante específico, e um domínio citoplasmático, denominado domínio de morte (DD; do inglês, *Death Domain*), que permite a propagação dos sinais apoptóticos (ASHKENAZI; DIXIT, 1998; PETER; KRAMMER, 1998; GOLDAR et al., 2015). Quando os receptores de morte reconhecem seus ligantes específicos, eles sofrem trimerização e consequente ativação. Os DD interagem com as proteínas adaptadoras FADD (do inglês, *Fas-associated protein with death domain*) ou TRADD (do inglês, *TNFR1-associated death domain protein*). Essas proteínas adaptadoras possuem outro domínio de interação de proteínas chamado de domínio efetor de morte (DED; do inglês, *Death Effect Domain*). Quando o DED das proteínas adaptadoras interage com o DED da pró-caspase 8, forma-se o complexo sinalizador indutor de apoptose (DISC), o qual leva à ativação da pró-caspase 8. A caspase 8 ativada ativa diretamente as caspases efetoras -3 e -7, o que resulta em apoptose independente da via mitocondrial (NICHOLSON, 2000; RÖDER; TRAUZOLD; KALTHOFF, 2011; KOFF; RAMACHANDIRAN; BERNAL-MIZRACHI, 2015; GOLDAR et al., 2015; GALLUZZI et al., 2018). Além disso, a caspase-8 ativada pode ativar a proteína pró-apoptótica Bid, membro da família Bcl-2, que leva à formação de um fragmento chamado Bid truncado (tBid), que possibilita o aumento da permeabilidade mitocondrial e liberação de proteínas pró-apoptóticas, fazendo uma conexão entre a apoptose extrínseca e intrínseca (RÖDER; TRAUZOLD; KALTHOFF, 2011; AMARANTE-MENDES; GRIFFITH, 2015).

Em ambos os processos de apoptose ocorre a ativação de caspases (GOLDAR et al., 2015). As caspases efetoras (caspase-3 -6 e -7), ativadas pela caspase-9 da apoptose intrínseca e pela caspase-8 da apoptose extrínseca, atuam na clivagem de substratos específicos tais como proteínas cinases, proteínas do citoesqueleto e proteínas envolvidas no reparo do DNA, o que culmina em uma série de alterações morfológicas as quais caracterizam a apoptose e levam à morte celular (FESIK, 2005; FULDA, 2009; WYLLIE, 2010; BAIG et al., 2016).

Finalmente, conforme exposto anteriormente, o processo neoplásico é o resultado da desregulação da proliferação celular e da inibição da apoptose (FESIK, 2005; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Considerando que na pesquisa de novos agentes quimioterápicos é desejado que o mecanismo de citotoxicidade seja altamente regulado e pouco imunogênico, o entendimento dos mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos nos processos de dano ao DNA, no ciclo celular

e na apoptose intrínseca e extrínseca é fundamental investigação de novos compostos para uma terapia antineoplásica mais efetiva (HUNTER; LACASSE; KORNELUK, 2007; BOSE; GRANT, 2015).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DAS PIRAZOLINAS

As seis pirazolinias sintéticas derivadas de chalconas cíclicas utilizadas no presente trabalho foram desenvolvidas pela aluna de graduação Jéssica Osmani Toigo, orientada pelo Prof. Dr. Ricardo José Nunes do Laboratório de Estrutura e Atividade (LEAT) da UFSC e gentilmente cedidas ao Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH). Para a síntese das chalconas precursoras foi utilizada a metodologia de condensação aldólica de Claisen-Schmidt (VOGEL, 1989). Na sequência, foi realizada a reação das chalconas sintetizadas com hidrazina em ácido acético e posterior refluxo, obtendo assim as pirazolinias **H3TM2**, **H3TM4**, **H3TM5**, **H3TM6**, **H3TM7** e **H3TM10**.

4.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS PIRAZOLINAS

A solubilidade e a permeabilidade das seis pirazolinias sintéticas foram avaliadas de acordo com parâmetros físico-químicos propostos por Lipinski et al. (2001) e Veber et al. (2002). Os valores de PM (peso molecular), cLog P (coeficiente de partição calculado a partir de uma metodologia própria), aceptores de ligação hidrogênio, doadores de ligação hidrogênio, número de ligações flexíveis e área de superfície polar das seis pirazolinias sintéticas foram obtidos a partir do programa Osiris® da Acetilion Pharmaceuticals Ltd., disponibilizado no site: <http://www.organic-chemistry.org>.

4.3 LINHAGENS CELULARES E CULTIVO CELULAR

No presente trabalho foram utilizados dois modelos celulares de LA, uma linhagem de LMA (K562) e uma linhagem de LLA-T (Jurkat), ambas de origem humana e cedidas pelo Prof. Dr. Alberto Orfao do *Centro de Investigación del Cancer* da Universidade de Salamanca, Espanha. Além dessas, uma linhagem celular de melanoma (B16-F10) e uma linhagem celular de linfoma de Burkitt (Daudi), adquiridas do *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA) e do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil), respectivamente, foram utilizadas para os ensaios de seletividade.

As células de neoplasias hematológicas e as células de melanoma foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI)

e em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), respectivamente, ambos suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado, penicilina 10.000 U/ml, estreptomicina 10.000 µg/ml e 10 mM de tampão de ácido N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES), pH 7,4. Todos os reagentes utilizados para a preparação dos meios de cultura foram adquiridos da Gibco®, Thermo Fischer, Massachusetts, EUA. As células foram mantidas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37 ° C em frascos de cultura de 25 cm² e 75 cm², semeadas a uma densidade de 10⁶ células/ garrafa e repicadas a cada 48 horas. Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar e todo material utilizado foi previamente esterilizado. Antes de cada protocolo experimental, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de exclusão do Azul de Trypan (0,5%) (Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA) (EVANS; SCHULEMANN, 1914), em meio RPMI 1640 na proporção 1:1, e apenas as amostras com mais de 95% de células viáveis foram utilizadas nos experimentos.

4.4 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR E DETERMINAÇÃO DAS CURVAS CONCENTRAÇÃO E TEMPO RESPOSTA

As seis pirazolininas sintéticas (**H3TM2**, **H3TM4**, **H3TM5**, **H3TM6**, **H3TM7** e **H3TM10**) foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck Millipore®, Darmstadt, Alemanha) na concentração de 10 mM e armazenadas a 4° C até o preparo das soluções intermediárias utilizadas nos protocolos experimentais.

A triagem das seis pirazolininas sintéticas foi realizada a fim de selecionar os compostos com maior potencial citotóxico. Para a triagem, as células K562 (LMA) e Jurkat (LLA) (5 x 10⁴ células/ poço) foram incubadas durante 24 horas com 100 µM das pirazolininas **H3TM2**, **H3TM4**, **H3TM5**, **H3TM6**, **H3TM7** e **H3TM10** diluídas em DMSO e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico do brometo de 3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). As pirazolininas sintéticas que apresentaram maior redução da viabilidade celular na triagem foram selecionadas para a realização de curvas concentração-e-tempo-resposta. As linhagens K562, Jurkat, Daudi e B16-F10 foram plaqueadas nas concentrações de 5 x 10⁴ células/poço; 2,5 x 10⁴ células/poço e 12,5 x 10³ células/poço e incubadas por períodos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente, com os compostos selecionados em concentrações crescentes (1, 10, 25, 50 e 100 µM).

Para os ensaios de viabilidade celular, após o tempo de incubação de cada experimento, o sobrenadante foi removido e uma solução de MTT (Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA) diluído em meio de cultura foi adicionada às placas, as quais foram novamente incubadas por um período de 3 h a 37 °C. Na sequência, o sobrenadante foi removido, os precipitados formados em cada poço foram dissolvidos em uma solução de álcool isopropílico + ácido clorídrico (0,04 N) e, posteriormente, transferidos para uma nova placa. A leitura das absorbâncias foi realizada no espectrofotômetro Microwell Systems (Organon Teknika®, Bélgica) no comprimento de onda 540 nm (MOSMANN, 1983).

Em todos os experimentos foram utilizados dois controles, um com células sem tratamento e outro acrescido de 2% do veículo de dissolução (DMSO) ao meio de cultura. Como não houve diferença significativa entre os mesmos (dados não mostrados), optou-se por apresentar nos resultados somente a absorbância do grupo de células sem tratamento, a qual foi considerada como sendo 100% de viabilidade celular. Os valores de CI_{50} (concentração necessária para o composto induzir 50% das células à morte) foram obtidos a partir da análise de regressão linear dos gráficos plotados com os valores de porcentagem de viabilidade celular *versus* concentração, utilizando o *software* GraphPad Prism 5. A CI_{50} de 24 horas calculada para cada um dos compostos selecionados foi utilizada nos ensaios posteriores.

4.5 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO (SP) DE ORIGEM HUMANA

Amostras de SP de seis voluntários saudáveis e não fumantes foram coletadas no Laboratório da Divisão de Análises Clínicas do Hospital Universitário (HU) Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (Florianópolis, Brasil) por punção venosa em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH-UFSC) sob parecer nº 746.486 /2014. As amostras foram processadas no LOEH imediatamente após a coleta. As células mononucleadas foram separadas pelo método do Ficoll-Hypaque (BÖYUM, 1968) para o ensaio de seletividade e, paralelamente, os eritrócitos foram isolados para o teste de hemólise (LIN et al., 2010; SLOWING et al. 2009).

4.5.1 Separação das células mononucleadas

As amostras de SP foram diluídas em tampão fosfato (PBS) (Thermo Fischer®, Massachusetts, EUA) na proporção de 1:1 e, em seguida, cuidadosamente transferidas para um tubo contendo Ficoll-Hypaque, densidade = 1,070 g/mL (Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA). Após centrifugação por 30 minutos a 300 x g, a interface contendo as células mononucleadas foi separada segundo o gradiente de densidade e as células foram lavadas duas vezes em tampão PBS. Em sequência, o sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo as células mononucleadas foi resuspenso em meio RPMI 1640 para avaliação do número de células viáveis pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan (0,5 %), conforme descrito anteriormente.

Com o objetivo de verificar a citotoxicidade das pirazolinias selecionadas em um modelo não tumoral, as células mononucleadas (5×10^5 células/poço) foram posteriormente incubadas por 24 horas com concentrações crescentes (1-100 μM) dos dois compostos mais citotóxicos e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT, conforme descrito anteriormente.

4.5.2 Teste de hemólise

Os eritrócitos foram isolados do plasma e dos leucócitos por centrifugação (10 minutos a 300 x g) e lavados com uma solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% (solução salina). O sobrenadante foi descartado e os eritrócitos foram ressuspensos em cloreto de sódio 0,9% de forma que o valor da absorbância ficasse entre 1,8 e 2,2 quando lida em espectrofotômetro a 540 nm. Ao concentrado de eritrócitos foram adicionados 950 μL de solução salina (controle negativo, 0% de lise), 950 μL de água destilada (controle positivo, 100% de lise) e 950 μL de solução salina contendo concentrações crescentes dos compostos selecionados (1x CI_{50} até 15x CI_{50} para cada composto). As amostras foram homogeneizadas antes de serem incubadas por 1 hora a 37 ° C, sob agitação suave (100 x g). Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 500 x g por 5 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para uma placa de 96 poços para serem lidos em um espectrofotômetro Microwell Systems (Organon Teknika®, Bélgica) no comprimento de onda de 540 nm.

A porcentagem de hemólise foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Taxadehemólise(\%)} = \frac{DO_t - DO_{cn}}{DO_{cp} - DO_{cn}} \times 100$$

Onde: D_t : densidade óptica da amostra teste; D_{cn} : densidade óptica do controle negativo; D_{cp} : densidade óptica do controle positivo.

4.6 CALCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

O IS é calculado pela razão entre a CI_{50} da linhagem de células que são utilizadas como padrão de comparação e a CI_{50} de outra linhagem de células para a qual se deseja verificar se o composto é seletivo. Dessa forma, no presente trabalho, o IS foi calculado pela razão entre a CI_{50} obtida em células não tumorais (células mononucleadas) e a CI_{50} obtida em linhagens celulares de melanoma (B16-F10) e em linhagens celulares de neoplasias hematológicas (K562, Jurkat e Daudi). Uma alta seletividade foi considerada como $IS \geq 5$, uma seletividade moderada como $2 \leq IS < 5$ e uma baixa seletividade, como $IS < 2$ (DAHAM et al., 2015)

4.7 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

A análise do efeito das pirazolinias selecionadas sobre o ciclo celular foi realizada utilizando o *PI/RNase Solution Kit (Immunostep®*, Salamanca, Espanha). As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço) foram incubadas por 12 horas com as pirazolinias selecionadas nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO_2 . Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e o procedimento de marcação foi realizado conforme instruções do fabricante do kit. Resumidamente, as células foram fixadas com etanol 70% e incubadas a -4°C por 30 minutos. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS suplementado com albumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA) a 2% e centrifugadas a $300 \times g$ durante 10 minutos. Na sequência, as células foram incubadas com iodeto de propídio (PI) ao abrigo da luz por 15 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems®) por meio de uma estratégia de *gating* e foram adquiridas 1×10^4 células em ciclo. Os dados foram analisados utilizando-se o *software Infinicyt* versão 1.7 (Cytognos®). Para caracterização dos parâmetros a serem analisados no citômetro de fluxo foram utilizadas células sem tratamento.

4.8 AVALIAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR

Para a identificação do tipo de morte celular envolvida na citotoxicidade causada pelas pirazolinias selecionadas foram realizadas três metodologias distintas. Inicialmente foi realizada a avaliação da morfologia das células K562 e Jurkat incubadas com os compostos, por microscopia de fluorescência, com o auxílio dos corantes brometo de etídio (BE) e laranja de acridina (AO). Na sequência foi realizada a avaliação da expressão dos resíduos de fosfatidilserina marcados com Anexina V conjugada à FITC e a terceira metodologia foi a análise da fragmentação do DNA em gel de agarose.

4.8.1 Avaliação da morfologia celular por microscopia de fluorescência com BE e AO

As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço) foram incubadas durante 12 horas com as pirazolinias selecionadas nas concentrações de suas respectivas CI_{50} de 24 horas. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em uma solução de BE (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e AO (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), na proporção 1:1 (GENG et al., 1998). Na sequência, uma alíquota de 25 μL da suspensão celular foi transferida para uma lâmina de vidro e recoberta com uma lamínula. As alterações morfológicas foram observadas em um microscópio de fluorescência (Olympus® BX-FLA) e os campos representativos foram fotografados em aumento de 400 vezes.

4.8.2 Avaliação da apoptose pela metodologia da Anexina V-FITC

As células K562 e Jurkat (1×10^6 /poço) foram incubadas por 12 horas com as pirazolinias selecionadas nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS, fixadas com *BD Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences®, New Jersey, EUA) e, na sequência, as células foram incubadas com 5 μL de Annexin V conjugada a FITC (BD Biosciences®, New Jersey, EUA) por 15 minutos. Após essa etapa, as células foram lavadas com PBS e as amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems®). Foram adquiridos 1×10^4 eventos (células) e os *doublets* foram retirados utilizando-se as características de FSC *High* e FSC área das células. As células sem tratamento e sem marcação foram utilizadas a fim de definir os parâmetros a serem avaliados no citômetro

de fluxo. Os dados gerados foram analisados pelo *software Infinicyt* versão 1.7 (Cytognos®).

4.8.3 Ensaio de fragmentação do DNA

As células K562 e Jurkat (6×10^6 células/poço) foram incubadas durante 24 horas com as pirazolinias selecionadas nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas. Após a incubação, a extração do DNA foi realizada com o kit comercial *QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN®, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram separadas por eletroforese em gel de agarose 2,5% contendo BE (2 $\mu\text{g/mL}$) e observadas sob iluminação UV de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT®, Biosystems®). Como controle positivo para apoptose, as células foram incubadas com paclitaxel 30 μM nas mesmas condições descritas anteriormente para as pirazolinias; e como controle negativo, foram utilizadas células sem tratamento.

4.9 ANÁLISE DO POTENCIAL MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi\text{m}$)

Para avaliar o efeito das pirazolinias selecionadas sobre o $\Delta\Psi\text{m}$ das células K562 e Jurkat foi utilizado o *kit MitoView 633* (Biotium®, Califórnia, EUA) conforme instruções do fabricante. As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço) foram incubadas com as pirazolinias selecionadas nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas por 12 horas. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas a $300 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100 μL de uma solução de MitoView 633 diluído 1:10.000 sobre o sedimento celular, seguido de incubação em temperatura ambiente no escuro por 30 minutos. Após esse período, as células foram centrifugadas a $300 \times g$ por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuscitado em 1 mL de PBS. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems®) e analisadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7 (Cytognos®). Foram adquiridos 1×10^4 eventos (células) e os *doublets* foram retirados utilizando-se as características de FSC *High* e FSC área das células. As células sem tratamento e sem marcação foram utilizadas a fim de definir os parâmetros a serem avaliados no citômetro de fluxo.

4.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS KI-67, BAX, BCL-2, SURVIVINA, AIF, FASR E CASPASE-3 POR CITOMETRIA DE FLUXO

As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço) foram incubadas com as pirazolinias selecionadas nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas, por 12 horas. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas por 10 minutos a $300 \times g$. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi lavado duas vezes com PBS. Inicialmente foi realizada a fixação e a permeabilização da membrana citoplasmática com o kit *BD Cytotfix/Cytoperm* (BD Biosciences®, New Jersey, EUA), pois os epítomos de ligação dos anticorpos nas proteínas de interesse são intracelulares, exceto as amostras utilizadas para análise do receptor de membrana FasR. Depois, as amostras foram marcadas com $5 \mu\text{L}$ (volume definido a partir de titulação prévia de cada anticorpo) de anti-KI-67 conjugado à FITC (BD Biosciences®, New Jersey, EUA), anti-Bax conjugado à PerCP (Santa Cruz *Biotechnology*®, Santa Cruz, EUA), anti-Bcl-2 conjugado à FITC (*Invitrogen*®, Califórnia, EUA), anti-survivina conjugado à PE (Santa Cruz *Biotechnology*®, Santa Cruz, EUA), anti-AIF conjugado à FITC (Santa Cruz *Biotechnology*®, Santa Cruz, EUA), anti-FasR conjugado à PE (Santa Cruz *Biotechnology*®, Santa Cruz, EUA) e anti-caspase-3 conjugado à PE (BD Biosciences®, New Jersey, EUA). As amostras foram incubadas ao abrigo de luz a 8°C por 20 minutos e, na sequência, as células foram lavadas com tampão de lavagem *Perm/Wash* (BD Biosciences®, New Jersey, EUA). Por fim, as células foram lavadas com tampão PBS, adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems®) e analisadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7 (Cytognos®). Foram adquiridos 1×10^4 eventos (células) e os *doublets* foram retirados utilizando-se as características de FSC *High* e FSC área das células. As células sem tratamento e sem marcação foram utilizadas a fim de definir os parâmetros a serem avaliados no citômetro de fluxo.

4.11 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS MONONUCLEADAS DE PACIENTES PORTADORES DE LAs

Com o objetivo de verificar a citotoxicidade das pirazolinias selecionadas em ensaios *ex vivo*, quatro amostras de SP e três amostras de MO obtidas de pacientes com diagnóstico de LAs atendidos no Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (Florianópolis, Brasil) no período de agosto de 2017 a fevereiro de 2018

foram incluídas no presente estudo. As amostras foram coletadas antes do primeiro tratamento, no momento do diagnóstico, ou em uma recidiva da doença. As células mononucleadas foram isoladas pelo Ficoll-Hypaque, conforme descrito anteriormente. Um total de 5×10^5 células/ poço foram incubadas com concentrações crescentes (1-100 μM) das pirazolinas selecionadas por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT e os valores CI_{50} foram calculados usando o *software* GraphPad Prism 5.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados no presente trabalho foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), exceto aqueles no qual foram utilizadas figuras representativas, e cada experimento foi repetido pelo menos três vezes, de forma independente.

A análise estatística foi realizada utilizando o teste *t* pareado e análise de variância (ANOVA) *one way* seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. A citotoxicidade das pirazolinas selecionadas em células neoplásicas e em células mononucleadas de SP de voluntários saudáveis e de pacientes portadores de LAs, o teste de hemólise e a avaliação do efeito das pirazolinas selecionadas sobre o ciclo celular foram avaliados por ANOVA *one way* seguida de Bonferroni. Para a avaliação da expressão da fosfatidilserina, da alteração do $\Delta\Psi\text{m}$, da proliferação celular e também para a avaliação da expressão das proteínas pró e antiapoptóticas, a análise estatística foi realizada utilizando o teste *t* pareado, comparando cada ponto tratado com o grupo controle.

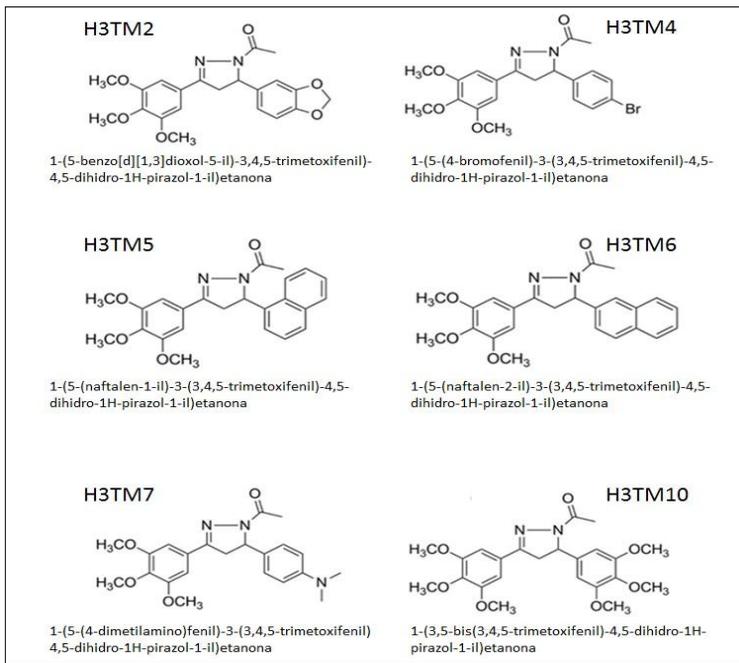
Em todas as análises foi adotado um nível de confiança de 95 % e os testes estatísticos foram realizados utilizando o *software* GraphPad Prism 5.

5 RESULTADOS

5.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS PIRAZOLINAS SINTÉTICAS

Os parâmetros físico-químicos das moléculas foram investigados por metodologia *in silico*, com o propósito prever a biodisponibilidade oral das mesmas. As seis pirazolininas sintéticas avaliadas no presente estudo (Figura 7) apresentaram PM inferior a 500 (397,48 – 444,48), cLog P inferior a cinco (2,19 – 3,74), menos de 10 aceptores de hidrogênio (6 – 9), menos de 5 doadores de hidrogênio (0), menos de 10 ligações flexíveis (5 – 8) e área de superfície polar inferior a 140 (30,38 – 88,08) (Tabela 1). Assim, todas as seis pirazolininas estão em acordo com os parâmetros físico-químicos propostos por Lipinski et al. (2001) e Veber et al. (2002), considerados ideais para que uma molécula apresente uma boa solubilidade e permeabilidade por via oral.

Figura 7 - Estrutura química das pirazolininas sintéticas avaliadas no presente trabalho.



Fonte: Própria

Tabela 1 - Previsão teórica das propriedades físico-químicas das pirazolinas sintéticas.

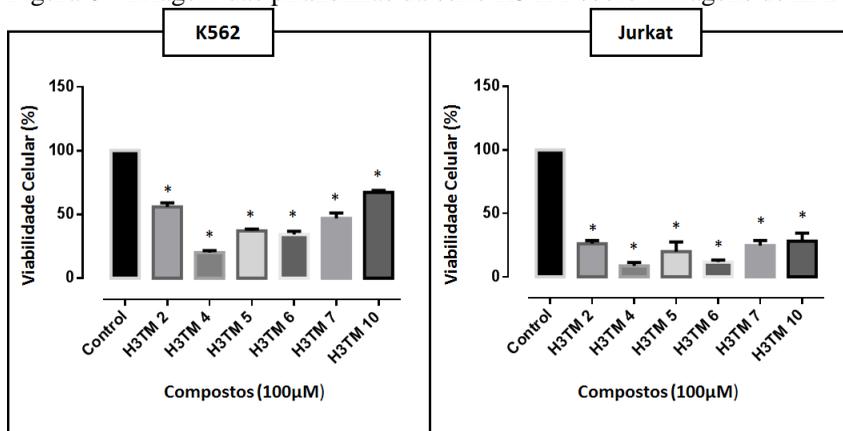
Propriedades/ Composos	n. atom	PM	cLogP	Aceptores - H	Doadores - H	Ligações flexíveis	Área de superfície polar	Violações
H3TM2	29	398.42	2.44	8	0	5	78.84	0
H3TM4	37	433.30	3.36	6	0	5	60.38	0
H3TM5	30	404.47	3.71	6	0	5	30.38	0
H3TM6	30	404.47	3.74	6	0	5	60.38	0
H3TM7	29	397.48	2.66	7	0	6	63.61	0
H3TM10	32	444.48	2.19	9	0	8	88.08	0
*Lipinski et al. (2001)	-----	≤ 500	≤ 5	≤ 10	≤ 5	-----	-----	-----
*Veber et al. (2002)	-----	-----	-----	≤ 12	≤ 12	≤ 10	≤ 140	-----

*Valores de referência

5.2 ATIVIDADE DAS PIRAZOLINAS SINTÉTICAS SOBRE CÉLULAS NEOPLÁSICAS

A fim de conduzir o estudo somente com os compostos que demonstrassem potencial atividade citotóxica, inicialmente foi realizada uma triagem com os sei derivados pirazolínicos. Os resultados obtidos (Figura 8) demonstraram que todos os seis compostos derivados pirazolínicos (**H3TM2**, **H3TM4**, **H3TM5**, **H3TM6**, **H3TM7** e **H3TM10**) reduziram significativamente a viabilidade das células de LMA K562 e de LLA Jurkat, quando comparadas aos respectivos grupos controle.

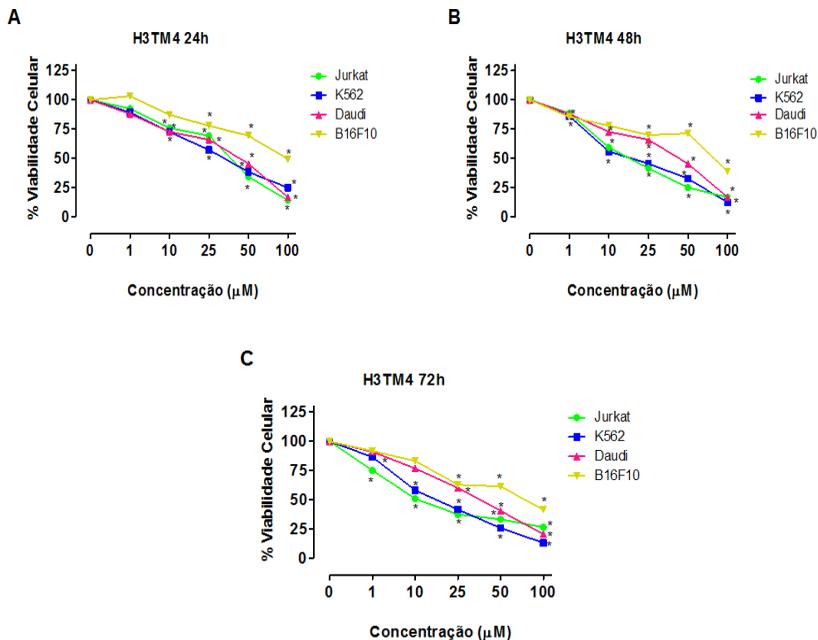
Figura 8 - Triagem das pirazolininas da série H3TM sobre linhagens de LA.



A viabilidade das células K562 e Jurkat (5×10^4 células/poço) incubadas com as pirazolininas **H3TM2**, **H3TM4**, **H3TM5**, **H3TM6**, **H3TM7** e **H3TM10** na concentração de $100 \mu\text{M}$ por 24 horas foi avaliada pelo método do MTT. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$. Teste ANOVA *one way* seguido do pós-teste de Bonferroni.

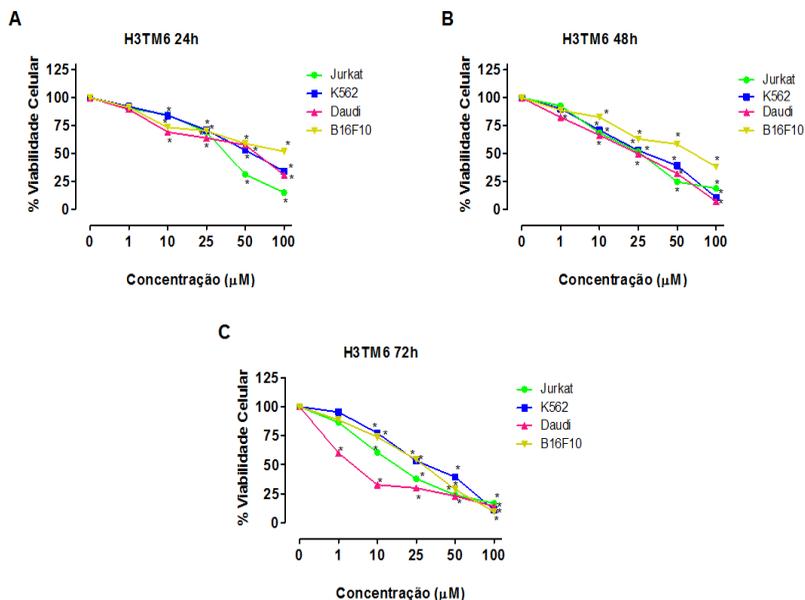
A partir dessa análise, as pirazolininas mais citotóxicas e inéditas, **H3TM4** e **H3TM6**, foram selecionadas para experimentos adicionais. Assim, as curvas de concentração e tempo-resposta foram posteriormente realizadas em células de LA K562 e Jurkat e também em células de linfoma de Burkitt (Daudi) e em células de melanoma (B16- F10) (Figuras 9 e 10).

Figura 9 - Citotoxicidade da pirazolina **H3TM4** sobre células neoplásicas.



(A-C) Citotoxicidade do composto **H3TM4** em concentrações crescentes (1-100 µM), sobre células K562, Jurkat, Daudi e B16-F10 após 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C). A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa a média ± EPM de três experimentos independentes. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle, ANOVA *one-way*, seguido por Bonferroni.

Figura 10 - Citotoxicidade da pirazolinas **H3TM6** sobre células neoplásicas.



(A-C) Citotoxicidade do composto **H3TM6** em concentrações crescentes (1-100 µM), sobre células K562, Jurkat, Daudi e B16-F10 após 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C). A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa a média \pm EPM de três experimentos independentes. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle, ANOVA *one-way*, seguido por Bonferroni.

Como mostra a Tabela 2, os valores de CI_{50} encontrados para **H3TM4** (24 horas – 72 horas) estão entre $15,1 \pm 1,0$ e $32,0 \pm 1,1$ µM para células K562, $15,6 \pm 0,5$ e $30,8 \pm 0,6$ µM para células Jurkat, $33,0 \pm 0,8$ e $49,8 \pm 1,4$ µM para células Daudi e $62,5 \pm 1,3$ e $98,7 \pm 1,6$ µM para células B16-F10. Da mesma forma, os valores CI_{50} para **H3TM6** (24 horas – 72 horas) (Tabela 2) estão entre $15,5 \pm 0,5$ e $55,7 \pm 0,8$ µM para células K562, $25,3 \pm 0,6$ e $30,8 \pm 0,6$ µM para células Jurkat, $5,1 \pm 0,9$ e $46,2 \pm 1,5$ µM para células Daudi e $23,3 \pm 0,7$ e $72,3 \pm 2,1$ µM para células B16-F10.

Tabela 2 - Valores de CI_{50} calculados para **H3TM4** e **H3TM6** após 24, 48 e 72 horas de incubação sobre as linhagens K562, Jurkat, Daudi e células mononucleadas.

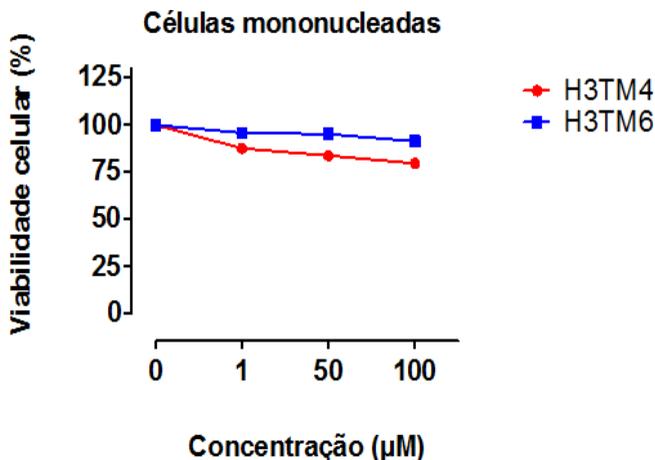
Composto		H3TM4 (CI_{50} μ M)			
Cél/Tempo	K562	Jurkat	Daudi	B16-F10	CM
24h	32,0 \pm 1,1	30,8 \pm 0,6	49,8 \pm 1,4	98,7 \pm 1,6	\approx 339,8 \pm 16,6
48h	16,2 \pm 0,3	17,2 \pm 0,6	34,8 \pm 1,2	72,7 \pm 2,4	-----
72h	15,1 \pm 1,0	15,6 \pm 0,5	33,0 \pm 0,8	62,5 \pm 1,3	-----
Composto		H3TM6 (CI_{50} μ M)			
Cél/Tempo	K562	Jurkat	Daudi	B16-F10	CM
24h	55,7 \pm 0,8	33,7 \pm 1,2	46,2 \pm 1,5	72,3 \pm 2,1	\approx 496,7 \pm 23,2
48h	21,9 \pm 0,4	27,7 \pm 0,7	20,2 \pm 0,8	56,6 \pm 1,2	-----
72h	15,5 \pm 0,5	25,3 \pm 0,6	5,1 \pm 0,9	23,3 \pm 0,7	-----

CM: Células Mononucleadas

5.3 EFEITO DAS PIRAZOLINAS H3TM4 E H3TM6 EM CÉLULAS NÃO-NEOPLÁSICAS

O efeito citotóxico de **H3TM4** e **H3TM6** foi avaliado em células mononucleadas humanas (Figura 11), como modelo de células não tumorais. As curvas concentração-resposta mostram que as pirazolininas selecionadas não reduziram a viabilidade celular das células mononucleadas quando comparadas ao grupo controle. Conforme demonstrado na Tabela 2, os valores de CI_{50} calculados para as pirazolininas **H3TM4** e **H3TM6** nessas células (\approx 339,8 \pm 16,6 μ M e \approx 496,7 \pm 23,2 μ M respectivamente) foram muito superiores aos encontrados nas células tumorais hematológicas (Jurkat, K562 e Daudi), e mesmo nas células de melanoma (B16-F10) (Tabela 2). De fato, quando comparadas às células não-neoplásicas (células mononucleadas) (Tabela 3), as pirazolininas **H3TM4** e **H3TM6** apresentaram maior seletividade para as linhagens celulares tumorais: o IS foi \geq 5 para ambas as pirazolininas nas linhagens Jurkat, K562 e Daudi, enquanto que em células de melanoma o IS foi \geq 5 para **H3TM6** e $2 \leq$ IS $<$ 5 para **H3TM4**.

Figura 11 - Citotoxicidade das pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** sobre células não-neoplásicas.



A citotoxicidade das células mononucleadas (5×10^5 células/poço) incubadas com as pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** em concentrações crescentes (1-100 μM) por 24 horas, foi avaliada pelo método do MTT. Os resultados expressam a média \pm EPM de pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, Teste ANOVA *one way*, seguido do pós-teste Bonferroni.

Tabela 3 - IS calculado para células neoplásicas em relação às células não neoplásicas após incubação com **H3TM4** e **H3TM6**.

Linhagem Celular	H3TM4	H3TM6
Jurkat	$\approx 10,6$	$\approx 14,7$
K562	$\approx 11,0$	$\approx 8,9$
Daudi	$\approx 6,8$	$\approx 10,7$
B16F10	$\approx 3,4$	$\approx 6,9$

Em seguida, o efeito de **H3TM4** e **H3TM6** em eritrócitos humanos foi avaliado pelo teste de hemólise. Conforme demonstrado na Tabela 4, uma hemólise significativa foi observada apenas em concentrações 12 e

15 vezes maiores do que as CI_{50} encontradas em células de LAs: $12,9 \pm 3,5\%$ de hemólise para o composto **H3TM4** ($12x CI_{50}$: $384,6 \mu M$) e $6,4 \pm 1,5\%$ de hemólise para **H3TM6** ($15x CI_{50}$: $836,2 \mu M$).

Tabela 4 - Hemólise induzida por **H3TM4** e **H3TM6** em eritrócitos humanos.

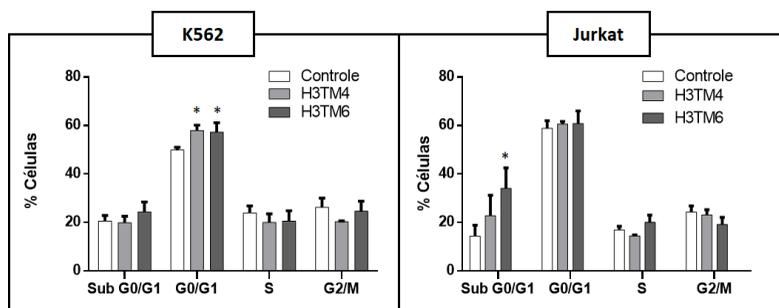
% HEMÓLISE		
Concentração/ Composto	H3TM4 Média \pm EPM	H3TM6 Média \pm EPM
1X CI_{50}	$0,9 \pm 0,6$	$1,9 \pm 1,2$
2X CI_{50}	$1,3 \pm 1,0$	$1,5 \pm 1,2$
3X CI_{50}	$1,6 \pm 0,5$	$1,6 \pm 1,3$
9X CI_{50}	$6,0 \pm 5,7$	$2,4 \pm 1,8$
12X CI_{50}	$12,9 \pm 3,5^*$	$3,2 \pm 0,4$
15X CI_{50}	$15,8 \pm 5,1^*$	$6,4 \pm 1,5^*$

*Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, Teste ANOVA *one way*, seguido do pós-teste Bonferroni.

5.4 EFEITO DAS PIRAZOLINAS **H3TM4** E **H3TM6** SOBRE O CICLO CELULAR DE CÉLULAS DE LAs

Com o propósito de investigar os mecanismos de citotoxicidade envolvidos na ação dos derivados pirazolínicos selecionados, foi avaliado o efeito de **H3TM4** e **H3TM6** sobre o ciclo celular de linhagens de LAs. Como pode ser observado na Figura 12, as pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** aumentaram a proporção de células K562 e Jurkat na fase sub-G0/G1 (células mortas), quando comparadas aos respectivos grupos controle. Um aumento significativo na porcentagem de células K562 na fase G0/G1 também foi observado após a incubação com **H3TM4** e **H3TM6** (aumento de 8,0% e 7,4%, respectivamente, quando comparado aos grupos controle), o que sugere um bloqueio nessa fase do ciclo celular. No entanto, na linhagem Jurkat, observou-se uma tendência ao bloqueio na fase S após a incubação com o composto **H3TM6**, porém este não foi significativo.

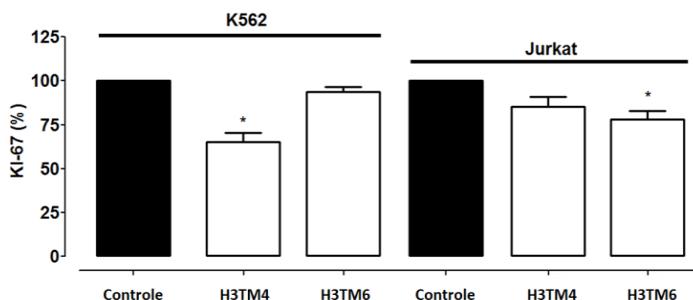
Figura 12 - Efeito das pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** sobre o ciclo celular de linhagens de LAs.



Fases do ciclo celular das linhagens K562 e Jurkat (1×10^6 cél/poço) após incubação com as pirzolininas **H3TM4** e **H3TM6** por 12 horas ($IC_{50}/24$ h), avaliadas por citometria de fluxo e comparadas aos respectivos grupo controle (células não incubadas com os compostos). Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, Teste ANOVA *one way*, seguido do pós-teste Bonferroni

Além disso, a incubação com **H3TM4** e **H3TM6** também reduziu a expressão do marcador de proliferação celular KI-67 (Figura 13) nas linhagens K562 e Jurkat, mas apenas as células K562 incubadas com **H3TM4** e as células Jurkat incubadas com **H3TM6** mostram uma redução significativa (34,8 % e 22,1%, respectivamente).

Figura 13 - Expressão da proteína KI-67 em células K562 e Jurkat incubadas com **H3TM4** e **H3TM6**.



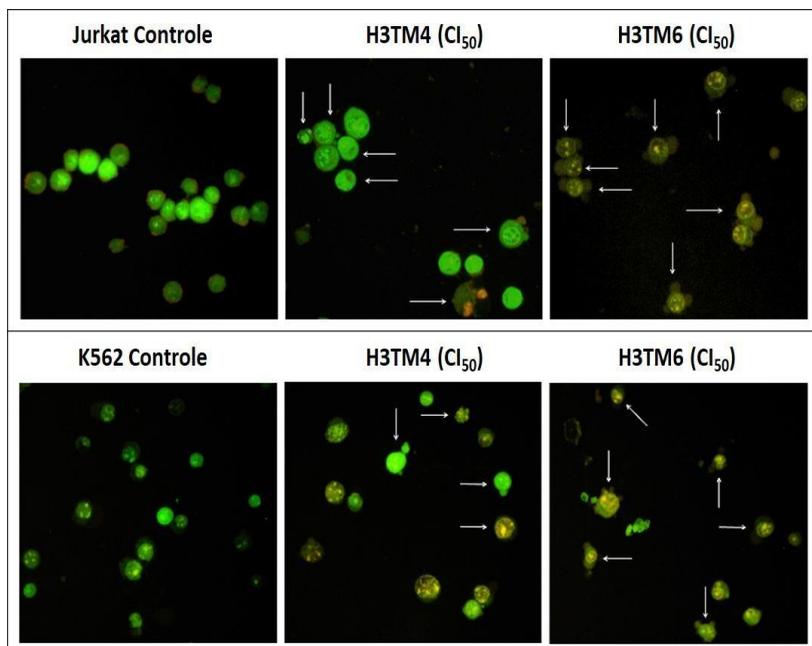
A expressão da proteína KI-67 em células K562 e Jurkat (1×10^6 cél/poço) incubadas com **H3TM4** e **H3TM6** por 12 horas ($IC_{50}/24$ h),

comparadas com os controles, foi avaliada por citometria de fluxo. A IFM do grupo controle foi considerada como 100%. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, Teste *t* pareado.

5.5 APOPTOSE INDUZIDA PELAS PIRAZOLINAS **H3TM4** E **H3TM6**

Para avaliar se as pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** induziram as células K562 e Jurkat à morte por apoptose, inicialmente foi realizada a observação da morfologia celular por microscopia de fluorescência, após coloração com brometo de etídio e laranja de acridina. As alterações morfológicas encontradas nas células K562 e Jurkat resultantes da incubação com as pirazolinhas selecionadas **H3TM4** e **H3TM6** foram observadas por microscopia de fluorescência após coloração com BE/LA. Na Figura 14 podem-se observar características de morte celular por apoptose em ambas as linhagens incubadas com ambos os compostos, tais como diminuição do volume celular, condensação da cromatina, formação de “*blebs*” e perda da integridade da membrana plasmática.

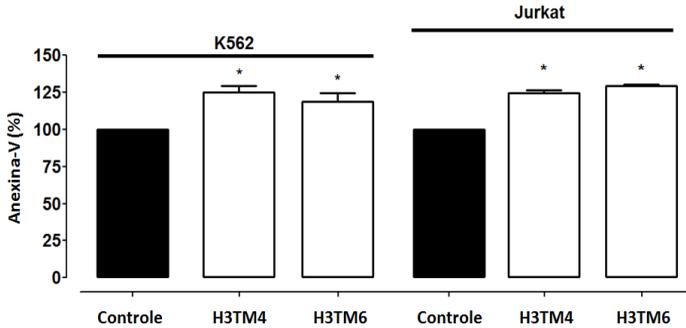
Figura 14 - Morfologia das linhagens de LAs após incubação com **H3TM4** e **H3TM6**.



Morfologia das células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço), incubadas com **H3TM4** e **H3TM6** por 12 horas, visualizadas por microscopia de fluorescência (aumento de 400x) após coloração com BE/LA. Os grupos controle correspondem às células não incubadas com os compostos. Campos representativos foram digitalizados com câmera digital. As setas brancas indicam as células com morfologias típicas de apoptose.

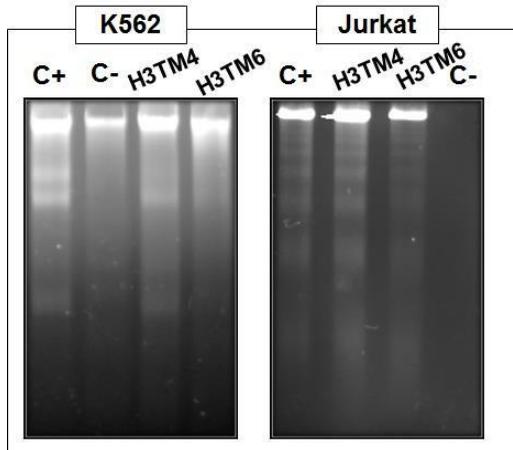
A apoptose também foi avaliada pela análise da marcação com Anexina-V por citometria de fluxo. Como demonstrado na Figura 15, após a incubação das células K562 com **H3TM4** e **H3TM6** houve um aumento de 25,0% e 18,8% da expressão da Anexina-V, respectivamente. O mesmo foi observado nas células Jurkat, onde o aumento foi de 24,6% e 29,2% para a **H4TM4** e **H3TM6**, respectivamente. Finalmente, a apoptose foi confirmada pelo método de fragmentação do DNA, e foi observado o característico "padrão de escada" nas células K562 e Jurkat incubadas com **H3TM4** e **H3TM6** (Figura 16).

Figura 15 - Expressão de Anexina-V em células K562 e Jurkat incubadas com **H3TM4** e **H3TM6**.



A expressão de Anexina-V em células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço) incubadas com **H3TM4** e **H3TM6** por 12 horas foi avaliada por citometria de fluxo e comparadas com os respectivos grupos controle. A IFM do grupo controle foi considerada como 100%. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, Teste *t* pareado.

Figura 16 - Fragmentação do DNA das células K562 e Jurkat incubadas com **H3TM4** e **H3TM6**.



Fragmentação do DNA das células K562 e Jurkat (6×10^6 células/poço), em gel de agarose 2,5%, após 24 horas de incubação com as pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6**. Os grupos C- (controle negativo) representam as células não incubadas com os compostos e os grupos C+ (controle

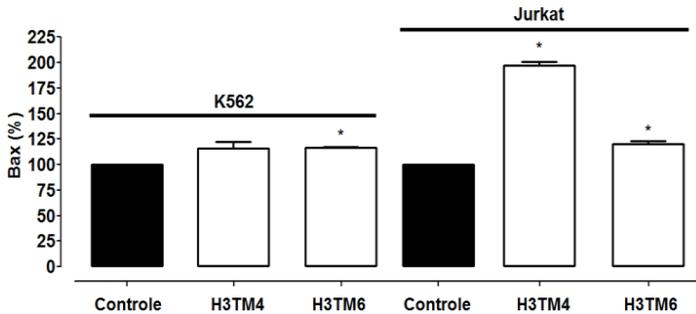
positivo) representam as células incubadas com paclitaxel na concentração de 30 μ M. Os géis foram observados e fotografados sob iluminação UV de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT® Biosystems).

5.6 EFEITO DAS PIRAZOLINAS **H3TM4** E **H3TM6** SOBRE A PROTEÍNA PRÓ-APOPTÓTICA BAX E SOBRE A PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA BCL-2

Para investigar a apoptose intrínseca, inicialmente foi avaliado a expressão das proteínas Bax e Bcl-2 em linhagens de LAs, incubadas com as pirazolinas selecionadas. As células K562 incubadas com as pirazolinas **H3TM4** apresentaram uma tendência ao aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax (15,8%), enquanto que estas células incubadas com a pirazolina e **H3TM6** apresentaram um aumento significativo na expressão desta proteína (16,8%) (Figura 17). Ainda, houve uma redução na expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 em células K562 incubadas com ambas as pirazolinas (Figura 18), entretanto, somente as células K562 incubadas com a pirazolina **H3TM4** apresentaram uma redução significativa dessa proteína (13,4%).

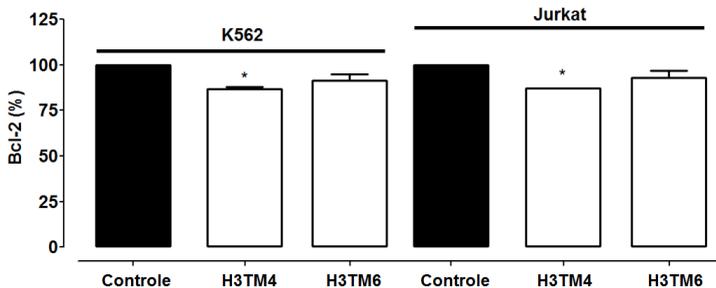
Da mesma forma, as células Jurkat incubadas com as pirazolinas selecionadas apresentaram uma expressão significativamente aumentada da proteína pró-apoptótica Bax (**H3TM4**: 101,4% e **H3TM6**: 20,5%) (Figura 17) e uma expressão reduzida da proteína antiapoptótica Bcl-2, entretanto, somente após a incubação das células Jurkat com a pirazolina **H3TM4** foi observada uma redução significativa (12,9 %) (Figura 18).

Figura 17 - Expressão da proteína pró-apoptótica Bax em células K562 e Jurkat incubadas com **H3TM4** e **H3TM6**.



A expressão da proteína Bax nas células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço) incubadas com **H3TM4** e **H3TM6** por 12 horas foi avaliada por citometria de fluxo e comparadas com os respectivos grupos controle. A IFM do grupo controle foi considerada como 100%. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, Teste t pareado.

Figura 18 - Expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 em células K562 e Jurkat incubadas com **H3TM4** e **H3TM6**.



A expressão da proteína Bcl-2 nas células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço) incubadas com **H3TM4** e **H3TM6** por 12 horas foi avaliada por citometria de fluxo e comparadas com os respectivos grupos controle. A IFM do grupo controle foi considerada como 100%. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, teste t pareado.

Em conjunto, os resultados mostram que a incubação com ambas as pirazolininas **H3TM4** e **H3TM6** causam a predominância da expressão de Bax em relação a Bcl-2, nas duas linhagens de LA K562 e Jurkat (Tabela 5).

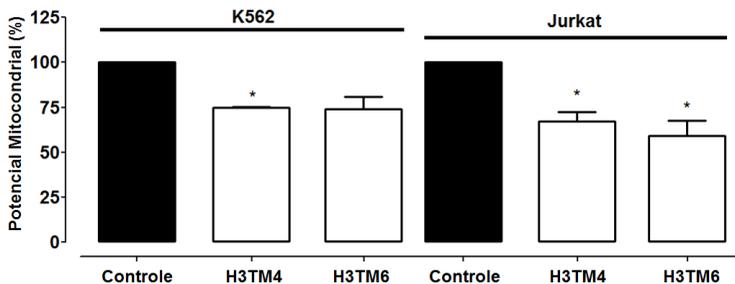
Tabela 5 - Razão entre a expressão da proteína Bcl-2 e a proteína Bax em células K562 e Jurkat incubadas com **H3TM4** e **H3TM6** por 12 horas.

Bcl-2/ Bax	H3TM4	H3TM6
K562	0.43	0.77
Jurkat	0.74	0.78

5.7 EFEITO DAS PIRAZOLINAS **H3TM4** E **H3TM6** SOBRE O $\Delta\Psi_m$

Seguindo a investigação da apoptose intrínseca, foi avaliado o $\Delta\Psi_m$ em células K562 e Jurkat incubadas com as pirazolininas selecionadas. Como pode ser observado na Figura 19, as pirazolininas **H3TM4** e **H3TM6** induziram a perda do $\Delta\Psi_m$ nas linhagens K562 e Jurkat. Nas células K562 houve uma redução de 25,3% e 26,0% no número de células com $\Delta\Psi_m$ intacto após a incubação com **H3TM4** e **H3TM6**, respectivamente. Entretanto, apenas o composto **H3TM4** apresentou resultados significativos nessa linhagem celular. Nas células Jurkat houve diminuição significativa do $\Delta\Psi_m$ após a incubação com ambas as pirazolininas (**H3TM4**: 32.9% e **H3TM6**: 41.0%).

Figura 19 – Avaliação do $\Delta\Psi_m$ de células K562 e Jurkat incubadas com **H3TM4** e **H3TM6**.



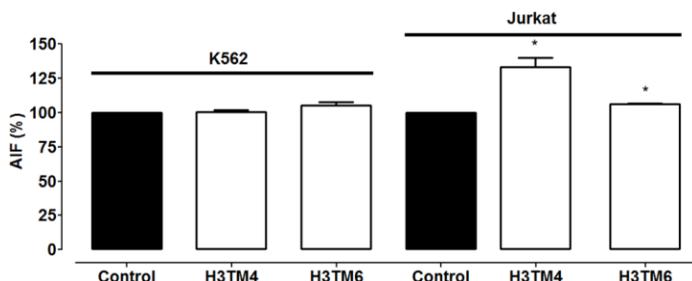
O $\Delta\Psi_m$ das células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço) incubadas com **H3TM4** e **H3TM6** por 12 horas foi avaliada por citometria de fluxo após utilização do *kit MitoView 633* e comparadas com os respectivos grupos controle. A IFM do grupo controle foi considerada como 100%. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, teste *t* pareado.

5.8 EFEITO DAS PIRAZOLINAS **H3TM4** E **H3TM6** SOBRE O AIF E A PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA SURVIVINA

Em seguida foi avaliada a expressão de AIF, o qual é liberado como consequência da perda do $\Delta\Psi_m$, e a expressão da Survivina, uma proteína de resistência a qual pode inibir a apoptose intrínseca e a apoptose extrínseca. Como mostra a Figura 20, não foram observadas alterações significativas na expressão de AIF nas células K562 após a incubação as pirazolininas **H3TM4** e **H3TM6**. Entretanto, as pirazolininas **H3TM4** e **H3TM6** reduziram significativamente a expressão da proteína antiapoptótica survivina nessa linhagem celular (**H3TM4**: 21,2% e **H3TM6**: 22,2%) (Figura 21).

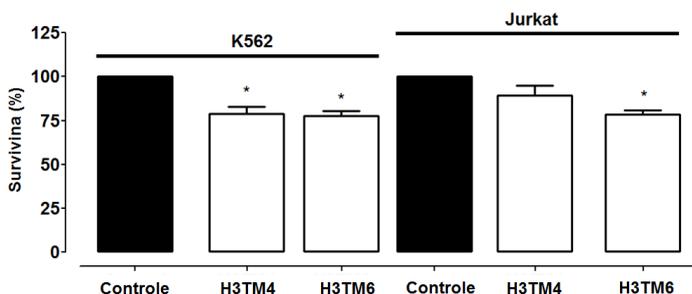
Já nas células Jurkat, a incubação com as pirazolininas **H3TM4** e **H3TM6** resultou em um aumento significativo de 33,2% e 6,0%, respectivamente, na expressão de AIF (Figura 20), enquanto que a expressão da proteína survivina (Figura 21) diminuiu significativamente somente após a incubação dessas células com a pirazolinina **H3TM6** (21,4%). A incubação das células Jurkat com a pirazolinina **H3TM4** demonstrou apenas uma tendência à diminuição da expressão dessa proteína (10,7%).

Figura 20 - Expressão de AIF survivina em células K562 e Jurkat incubadas com **H3TM4** e **H3TM6**.



A expressão de AIF nas células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço) incubadas com **H3TM4** e **H3TM6** por 12 horas foi avaliada por citometria de fluxo e comparadas com os respectivos grupos controle. A IFM do grupo controle foi considerada como 100%. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, teste t pareado.

Figura 21 - Expressão da proteína antiapoptótica survivina nas células K562 e Jurkat incubadas com **H3TM4** e **H3TM6**.

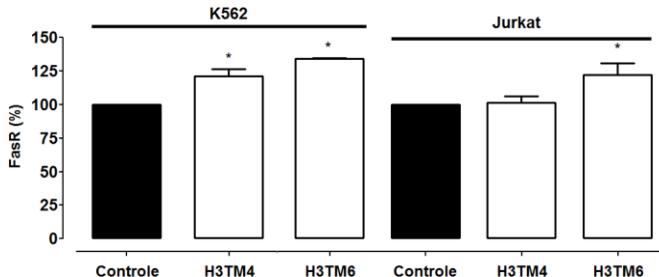


A expressão da proteína survivina nas células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço) incubadas com **H3TM4** e **H3TM6** por 12 horas foi avaliada por citometria de fluxo e comparadas com os respectivos grupos controle. A IFM do grupo controle foi considerada como 100%. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, teste t pareado.

5.9 EFEITO DAS PIRAZOLINAS H3TM4 E H3TM6 SOBRE O RECEPTOR FAS

A apoptose extrínseca foi avaliada pela expressão do receptor de membrana Fas (FasR) nas linhagens de LAs, incubadas com **H3TM4** e **H3TM6**. As células K562 incubadas com **H3TM4** e **H3TM6** exibiram uma expressão significativamente aumentada do FasR (Figura 22), de 21,3% e 34,3%, respectivamente. Por outro lado, nas células Jurkat, somente a incubação com a pirazolina **H3TM6** resultou em um aumento da expressão de FasR (30,34%).

Figura 22 - Expressão de FasR em células K562 e Jurkat incubadas com **H3TM4** e **H3TM6**.



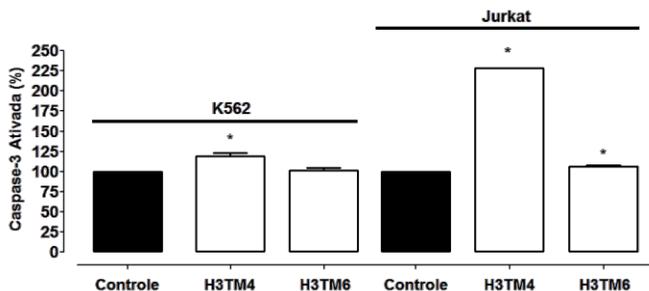
A expressão de FasR nas células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço) incubadas com **H3TM4** e **H3TM6** por 12 horas foi avaliada por citometria de fluxo e comparadas com os respectivos grupos controle. A IFM do grupo controle foi considerada como 100%. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, teste t pareado.

5.10 EFEITO DAS PIRAZOLINAS H3TM4 E H3TM6 SOBRE A CASPASE-3 ATIVADA

Por fim, foi avaliada a expressão da caspase efetora (caspase-3), a qual pode ser ativada pela apoptose intrínseca e/ou pela apoptose extrínseca. A incubação das células K562 com a pirazolina **H3TM4** aumentou significativamente a expressão de caspase-3 ativada em 20,0% (Figura 23), mas nenhuma diferença significativa foi observada nessa linhagem após a incubação com **H3TM6**. Nas células Jurkat, a incubação

das células com ambas as pirazolininas resultou em um aumento significativo na expressão de caspase-3 ativada (**H3TM4**: 128,3% e **H3TM6**: 6,6%).

Figura 23 - Expressão de caspase-3 ativada em células de LA incubadas com **H3TM4** e **H3TM6**.



A expressão de caspase-3 ativada nas células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço) incubadas com **H3TM4** e **H3TM6** por 12 horas foi avaliada por citometria de fluxo e comparadas com os respectivos grupos controle. A IFM do grupo controle foi considerada como 100%. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, Teste *t* pareado.

5.11 CITOTOXICIDADE DAS PIRAZOLININAS H3TM4 E H3TM6 SOBRE CÉLULAS DE PACIENTES PORTADORES DE LAs

Com o propósito de investigar o efeito citotóxico das pirazolininas **H3TM4** e **H3TM6** em modelo *ex vivo*, foi avaliada a viabilidade celular de amostras obtidas a partir de pacientes portadores de diferentes subtipos de LAs. Conforme pode ser observado na Tabela 6, a idade dos pacientes portadores de LAs incluídos no presente estudo variou de 28 a 81 anos. Das sete amostras coletadas, quatro foram obtidas de SP e três de MO, sendo que todas as amostras apresentaram com contagem de células blásticas acima de 20% do total de leucócitos. O diagnóstico foi realizado segundo os critérios da OMS (2016) e foram incluídos no estudo pacientes com diferentes classificações de LMA e LLA.

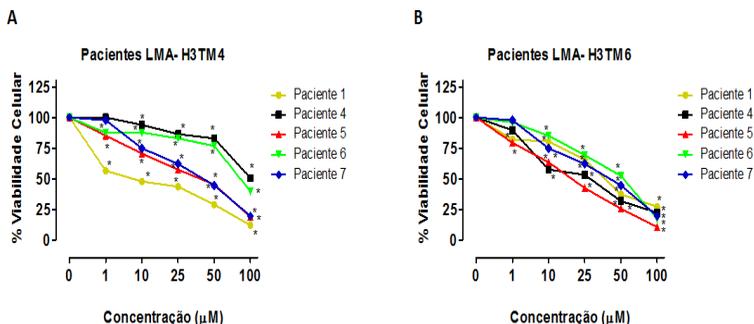
Tabela 6 - Dados clínicos dos pacientes incluídos no estudo e valores de CI_{50} calculados para **H3TM4** e **H3TM6** sobre suas células mononucleadas.

Pacientes	Idade (anos)	Amostra	Diagnóstico	Leucócitos/mm ³	Blastos(%)	H3TM4 CI_{50} (µmol/l)	H3TM6 CI_{50} (µmol/l)
1	52	SP	LMA com inv. (16)	7090/mm ³	45%	11,8 ± 1,3	37,1 ± 1,1
2	28	SP	LLA-B	9590/mm ³	50%	141,6 ± 2,7	139,0 ± 3,6
3	81	SP	LLA de células T precursoras	-----	76%	71,3 ± 1,8	46,0 ± 1,0
4	56	SP	LMA sem maturação	-----	83%	40,2 ± 1,9	27,7 ± 0,7
5	67	MO	LMA secundária à MDS	5710/mm ³	38%	31,0 ± 0,9	16,2 ± 0,6
6	33	MO	LMA t(8;21)	8550/mm ³	27%	98,2 ± 2,8	44,6 ± 1,2
7	31	MO	LPA t(15;17) Bcr3+ FLT3 DIT+	115070/mm ³	96%	39,9 ± 0,6	29,0 ± 0,8

SMD: Síndrome mielodisplásica

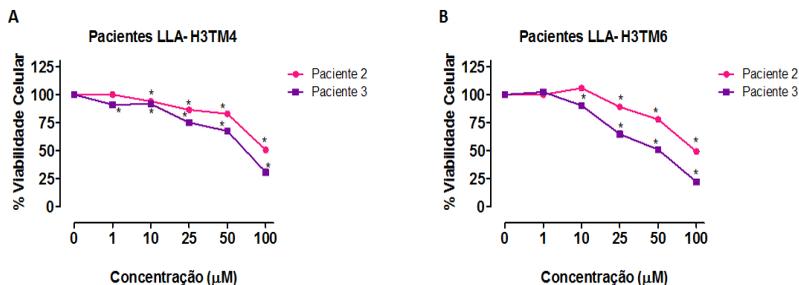
Após 24 horas de incubação com as pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6**, houve uma redução significativa na viabilidade celular de forma dependente da concentração em todas as sete amostras de células mononucleadas, incluindo as células neoplásicas, coletadas de SP ou MO dos pacientes portadores de LAs incluídos no presente estudo (Figuras 24 e 25). Ainda, como esperado considerando a heterogeneidade das LAs, diferentes valores de CI_{50} foram encontrados para cada subtipo leucêmico avaliado (Tabela 6).

Figura 24 - Curvas concentração-resposta das pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** sobre células de pacientes portadores de LMA.



As células mononucleadas de pacientes portadores de LMA (5×10^5 células/poço) foram incubadas com concentrações crescentes das pirazolinas **H3TM4** (A) e **H3TM6** (B) (1-100 µM) por 24 horas e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle, ANOVA *one-way*, seguido por Bonferroni.

Figura 25 - Curvas concentração-resposta das pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** sobre células de pacientes portadores de LLA.



As células mononucleadas de pacientes portadores de LLA (5×10^5 células/poço) foram incubadas com concentrações crescentes das pirazolinas **H3TM4** (A) e **H3TM6** (B) (1-100 µM) por 24 horas e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle, ANOVA *one-way*, seguido por Bonferroni.

6 DISCUSSÃO

A OMS considera o câncer um problema de saúde pública global e, nas próximas duas décadas, estima-se que a sua incidência aumentará em 70 % em todo o mundo (ONUBR, 2018). Segundo as últimas pesquisas, as leucemias representaram o 11º tipo de neoplasia maligna mais frequente e a décima causa mais comum de morte por câncer (FERLAY et al., 2013), dentre elas, as LAs destacam-se por sua agressividade e refratariedade à quimioterapia convencional. Embora existam protocolos terapêuticos bem estabelecidos contra a LAs, a severidade dos efeitos adversos devido à citotoxicidade não específica dos fármacos disponíveis, as elevadas taxas de recidiva e as altas taxas de mortalidade estão relacionadas ao frequente insucesso do tratamento a longo prazo (ELMAN; SILVA, 2007; KRUG et al., 2011; OLIVEIRA, 2015; PETERS; BROWN, 2015; FENG et al., 2016). Assim, novas alternativas terapêuticas são necessárias para que os pacientes portadores de LAs possam ter acesso a tratamentos mais seguros e eficazes. Nessa perspectiva, considerando as várias atividades biológicas descritas na literatura para as pirazolininas (QI; READY, 2007; KUMAR et al., 2009; MUNEERA; JOSEPH, 2016) e a descoberta de novos derivados pirazolínicos com ação antileucêmica, a investigação de seus principais mecanismos de ação pode ser uma estratégia importante na investigação de novas moléculas seletivas para células neoplásicas e sem efeito significativo sobre células não tumorais.

Assim, considerando a importância das LAs no cenário do câncer, o presente estudo objetivou fornecer novas informações sobre uma série de pirazolininas sintéticas (Figura 7) com potencial citotóxico sobre células leucêmicas que possam atuar como protótipos para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para o tratamento das LAs.

Inicialmente, foi realizada a avaliação dos principais parâmetros estruturais relevantes para a predição teórica do perfil de biodisponibilidade oral, propostos por Lipinski et al. (2001) e Veber et al. (2002), para as seis pirazolininas sintéticas avaliadas neste estudo (**H3TM2**, **H3TM4**, **H3TM5**, **H3TM6**, **H3TM7** e **H3TM10**). Estes parâmetros predizem a influência da estrutura química na solubilidade e na permeabilidade da molécula a ser administrada por via oral. De fato, nas últimas décadas, estudos realizados por indústrias farmacêuticas e instituições de pesquisa confirmam a grande importância da lipofilia e da determinação do log P para o planejamento e a investigação racional de fármacos (LIPINSKI et al., 2004; FREEMAN-COOK; HOFFMAN; JOHNSON, 2013; CLAVERIA-GIMENO et al., 2017; PUTIN et al.,

2018). Segundo os critérios de Lipinski et al. (2001), para uma boa biodisponibilidade oral, as moléculas devem apresentar em sua estrutura menos que 10 átomos de oxigênio ou nitrogênio (receptores de ligação hidrogênio); menos do que cinco grupos OH e NH (doadores de ligação hidrogênio); PM menor do que 500 unidades e log P menor do que cinco. De acordo com Veber et al. (2002), a área de superfície polar até 140 e 10 ou menos ligações flexíveis na molécula também são parâmetros a serem avaliados para predizer uma boa solubilidade e permeabilidade oral. Assim, de acordo com estes critérios, pode ser observado na Tabela 1 que todas as pirazolininas avaliadas se enquadram nos parâmetros de biodisponibilidade oral desejado por futuros fármacos. Estudos adicionais relacionados à estrutura química dos compostos são necessários para obter conhecimento suficiente a respeito das propriedades moleculares que possam limitar a sua efetividade em modelos *in vivo*. Entretanto, os resultados obtidos a partir deste trabalho são promissores do ponto de vista químico e podem contribuir para o desenvolvimento de futuros estudos quantitativos da relação estrutura-atividade (QSAR; do inglês, *Quantitative Structure Activity Relationships*), que fornecerão parâmetros físico-químicos para o planejamento de análogos mais específicos, com melhor perfil farmacológico ou com maior atividade intrínseca, o que aumenta as chances de inserção destes compostos como novos fármacos no arsenal terapêutico.

Em seguida, o potencial citotóxico dos seis compostos pirazolinínicos (Figura 7) foi avaliado sobre linhagens celulares humanas de LMA (K562) e de LLA (Jurkat). Os resultados obtidos demonstram que todos os seis compostos avaliados (**H3TM2**, **H3TM4**, **H3TM5**, **H3TM6**, **H3TM7** e **H3TM10**) foram significativamente citotóxicos para ambas as linhas celulares (K562 e Jurkat) (Figura 8). Considerando a estrutura química dessas pirazolininas, a substituição de 3,4,5-trimetoxi no anel A, presente nos seis compostos, parece contribuir para suas atividades citotóxicas. Como já foi estabelecido na literatura, o grupo 3,4,5-trimetoxi é importante para a atividade antitumoral de alguns quimioterápicos, dentre eles, a vincristina, utilizada no tratamento da LLA (HARDFIELD et al., 2003; JORDAN et al., 2004; SALUM et al., 2013). Além disso, a presença ou ausência de grupos metoxil (OCH₃) ligados ao anel A caracteriza a variação de lipofilicidade da molécula e a sua presença está relacionada a diferentes atividades biológicas, tais como, antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana (NIELSEN et al., 2004; KIM et al., 2008; BANDGAR; GAWANDE, 2010). Ainda, a presença de grupos doadores de elétrons, como o OCH₃ no anel A das pirazolininas investigadas, parece ser interessante para a citotoxicidade

desses compostos. No entanto, o mesmo padrão não é observado no anel B. A presença de grupos doadores de elétrons nos compostos **H3TM2** (3,4-OCH₂O), **H3TM7** (4-N (CH₃)₂) e **H3TM10** (grupos OCH₃) não parece ser tão importante para a atividade citotóxica das pirazolininas, pois esses compostos não se mostram tão citotóxicos quanto os demais na linhagem celular K562. O substituinte bromo no anel B da pirazolinina **H3TM4**, por ser um ligeiro grupo retirador de elétrons, possivelmente faz uma interação hidrofóbica, o que pode ser responsável pelo aumento da atividade desse composto. Além disso, a presença de um substituinte hidrofóbico no anel B também demonstrou ser interessante para a citotoxicidade dos compostos, como evidenciado nas pirazolininas **H3TM5** e **H3TM6**, substituídos com 1-naftil e 2-naftil respectivamente (VOGEL, 1989). Os grupos naftil não são sacadores de elétrons, porém podem interagir com outros anéis (grupos fenil) por interações entre os orbitais π , o que pode favorecer sua atividade citotóxica. Apesar dessas considerações iniciais, estudos adicionais em relação à estrutura dessas pirazolininas são necessários para estabelecer uma relação estrutura-atividade.

Entre os seis compostos analisados neste trabalho, as pirazolininas **H3TM4** e **H3TM6** foram selecionadas para dar continuidade nos experimentos de citotoxicidade e de investigação dos mecanismos de ação, pois além de serem compostos inéditos, foram as pirazolininas mais citotóxicas para ambas as linhagens celulares avaliadas (K562 e Jurkat) e apresentaram parâmetros físico-químicos promissores para a biodisponibilidade oral, segundo as regras de Lipinski e de Veber (LIPINSKI et al., 2001; VEBER et al, 2002). Assim, considerando a heterogeneidade das LAs e com a finalidade de avaliar a citotoxicidade das pirazolininas selecionadas em relação à concentração e ao tempo de incubação também em outros modelos de linhagens de células tumorais, foram realizadas curvas de concentração/tempo-resposta sobre três linhagens de neoplasias hematológicas (K562, Jurkat e Daudi) e também sobre uma linhagem celular de melanoma (B16-F10), como modelo de tumor sólido.

Como demonstrado nas Figuras 9 e 10, as pirazolininas **H3TM4** e **H3TM6** foram citotóxicas de forma dependente do tempo e da concentração para todas as quatro linhagens celulares avaliadas. Os maiores valores de CI₅₀ encontrados para cada composto foram em células de melanoma (B16-F10) (Tabela 2). Ao contrário das malignidades hematológicas, o melanoma é um tumor de pele que se origina da transformação neoplásica dos melanócitos, e, é considerado o tipo de tumor de pele mais agressivo. Até o momento, a cirurgia é o

tratamento mais eficaz contra o melanoma, mas a quimioterapia também pode ser utilizada dependendo do estágio da doença. Nas últimas décadas, não houve progresso relevante no tratamento do melanoma metastático, a dacarbazina continua sendo o quimioterápico mais utilizado contra essa doença, embora poucos pacientes apresentem respostas de longa duração (SAMPAIO; RIVITTI, 2008; ZAIDI et al., 2008; FREEDBERG et al., 2012; ESTRADA; JIMÉNEZ, 2013). Apesar do efeito citotóxico das pirazolininas **H3TM4** e **H3TM6** sobre células B16-F10 não ter sido tão expressivo quanto o observado em malignidades hematológicas (Tabela 2), a citotoxicidade desses compostos em outras linhagens de tumores sólidos deve ser avaliada no futuro, a fim de estabelecer seus efeitos em outros modelos de câncer.

Os valores de CI_{50} observados das pirazolininas **H3TM4** e **H3TM6** sobre as células de neoplasias hematológicas foram semelhantes ou melhores do que outros estudos descritos na literatura com a mesma classe de compostos. Shamsuzzaman et al. (2013) avaliaram o efeito de 18 derivados pirazolínicos esteroidais sobre células Jurkat após 48 horas de incubação e encontraram valores de CI_{50} entre 10,6 μM e 46,3 μM . Em um outro estudo, realizado por Zsoldos-Mády et al. (2006), o efeito citotóxico de 17 derivados glicosídicos de ferrocenil-chalconas e ferrocenil-pirazolininas foi avaliado em células de leucemia promielocítica aguda (LPA) (HL-60) e foram encontrados valores de CI_{50} de 24 horas entre 1,7 e $> 200 \mu\text{M}$.

Adicionalmente, pode ser observado na Tabela 2 que a pirazolinina **H3TM4** apresentou maior citotoxicidade para as linhagens de LAs (K562 e Jurkat) quando comparado com a linhagem celular de linfoma de Burkitt (Daudi). Sabe-se que, durante a hematopoiese, ao longo do processo de diferenciação celular, as células hematológicas imaturas adquirem características morfológicas, imunofenotípicas e citogenéticas de células maduras, ao mesmo tempo que perdem características de células progenitoras. O estágio de maturação no qual ocorre a proliferação da célula neoplásica determinará não apenas o tipo de terapia e a duração do tratamento a ser administrado, mas também a agressividade da doença e o prognóstico do paciente. Assim, ao contrário das LAs, malignidades hematológicas que afetam as células progenitoras do sistema hematopoiético (blastos), o linfoma de Burkitt é uma neoplasia hematológica que afeta células linfóides B maduras. A maior citotoxicidade da pirazolinina **H3TM4** para as linhagens celulares K562 e Jurkat, sugere que esse composto pode ser mais eficaz para células imaturas. Segundo a literatura, o linfoma de Burkitt é uma doença extremamente agressiva, caracterizada pela rápida proliferação celular de

linfócitos B neoplásicos e representa de 1 a 2% de todos os tipos de linfomas (LEONCINI et al, 2017). Em função da sua agressividade, o tratamento do linfoma de Burkitt é semelhante ao das LAs, porém exige o uso de doses elevadas de quimioterápicos (WILDES et al., 2014; SWERDLOW, 2017). Dessa forma, é possível que a incubação de células Daudi com concentrações mais elevadas do composto **H3TM4** induza morte celular de forma mais eficiente nessa linhagem sem inviabilizar a sua utilização, semelhante ao que já é observado com os quimioterápicos utilizados na clínica contra o linfoma de Burkitt.

Após 24 horas de incubação com a pirazolina **H3TM6**, as linhagens celulares de neoplasias hematológicas linfoides, Jurkat e Daudi, apresentaram menores valores de CI_{50} do que a linhagem celular de LMA, K562 (Tabela 2). Além disso, nesse período de tempo, a citotoxicidade do composto **H3TM6** foi maior contra a linhagem de LLA, Jurkat, quando comparado com a linhagem de linfoma de Burkitt, Daudi. Os resultados sugerem que a pirazolina **H3TM6** seja mais citotóxica para células comprometidas com a linhagem linfóide e ainda, semelhante à pirazolina **H3TM4**, que ela seja mais eficiente para células progenitoras em relação às células maduras dessa linhagem. Entretanto, apesar da citotoxicidade menos expressiva (elevada CI_{50}) do composto **H3TM6** sobre células K562 após 24 horas de incubação, os valores de CI_{50} encontrados após 48 e 72 horas foram inferiores aos observados em células Jurkat. Segundo a literatura, a linhagem celular K562 foi estabelecida a partir de um paciente diagnosticado com leucemia mieloide crônica (LMC) em crise blástica, positiva para o gene quimérico Bcr-Abl, o qual é amplamente responsável por sua resistência aos protocolos de quimioterapia antineoplásica (MARTINS et al., 1997; COOPER, 2001). Considerando que os protocolos terapêuticos envolvem vários ciclos de quimioterapia, de acordo com os resultados demonstrados na Tabela 2, uma segunda hipótese seria que as pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** podem ser mais eficazes contra essa LMA secundária à LMC, a qual é, geralmente, uma doença mais agressiva do que a LLA. Além disso, estudos *in vitro* demonstram que as células K562 geralmente são resistentes a todos os quimioterápicos convencionais nas primeiras 24 horas (LOZZIO; LOZZIO, 1975). Vale ressaltar o baixo valor de CI_{50} encontrado para a pirazolina **H3TM6** em células Daudi após 72 horas de incubação (5,1 μ M). Segundo a literatura, o uso de altas doses de quimioterápicos exigido no tratamento do linfoma de Burkitt é um desafio especial para pacientes idosos e imunossuprimidos que não toleram bem a sua toxicidade. Por isso, a taxa de mortalidade relacionada ao tratamento desse tipo de neoplasia hematológica ainda é bastante alta. Assim, a

possibilidade de utilização de baixas concentrações de **H3TM6** em células Daudi pode ser um achado promissor para o desenvolvimento de futuros compostos específicos e menos agressivos contra o linfoma de Burkitt.

De fato, a citotoxicidade não seletiva dos agentes quimioterápicos atualmente disponíveis (como é o caso do paclitaxel) é um fator importante que influencia na falha do tratamento das neoplasias malignas, pois os efeitos adversos são frequentemente muito agressivos para os pacientes. Assim, para que novos compostos com atividade antineoplásica sejam considerados promissores, eles também devem ser seletivos para células neoplásicas (ELMAN; SILVA, 2007; KRUG et al., 2011; PETERS; BROWN, 2015). Nessa perspectiva, com a finalidade de investigar se as pirazolinias selecionadas **H3TM4** e **H3TM6** possuem efeito citotóxico sobre células não neoplásicas (células saudáveis), foi avaliada a viabilidade de células mononucleadas do SP de indivíduos considerados saudáveis após a incubação com os compostos **H3TM4** e **H3TM6**. Como pode ser observado na Figura 11, não houve diminuição significativa na viabilidade celular após 24 horas de incubação com **H3TM4** e **H3TM6** em nenhuma das concentrações avaliadas (Tabela 2). Até o momento, poucos estudos foram encontrados na literatura avaliando o efeito de pirazolinias em células mononucleadas não neoplásicas. No estudo realizado por Shamsuzzaman et al. (2013), observou-se que todos os 18 derivados pirazolínicos esteroidais apresentaram CI_{50} de 48 horas entre $50,1\mu\text{M}$ e $60\mu\text{M}$ em células mononucleadas não neoplásicas. Karabacak et al. (2015) publicaram recentemente o estudo de um derivado pirazolínico cuja a CI_{50} de 24 horas extrapolada em células mononucleadas não neoplásicas foi de $\approx 1000\mu\text{M}$, entretanto a atividade citotóxica em células de LLA (Jurkat) não foi promissora (CI_{50} de 24 horas = $90\mu\text{M}$). Um estudo conduzido por Maioral et al. (2013) com o fármaco paclitaxel, um quimioterápico utilizado na clínica, demonstrou que o mesmo reduziu significativamente (85,4%) a viabilidade de células mononucleadas de voluntários saudáveis.

O IS é um cálculo capaz de demonstrar quantas vezes um determinado composto é seletivo para uma linhagem celular em relação à outra ou ainda, sugerir que determinado composto não demonstra ser citotóxico para células normais quando comparadas às células neoplásicas (DAHAM et al., 2015). Seguindo esse raciocínio, o IS foi calculado com a finalidade de demonstrar quantas vezes as pirazolinias **H3TM4** e **H3TM6** são seletivas para as linhagens celulares neoplásicas utilizadas nesse estudo (K562, Daudi, Jurkat e B16-F10), em relação às células mononucleadas não neoplásicas (utilizadas como modelo de células

saudáveis). Como pode ser observado na Tabela 3, os valores de IS para **H3TM4** e **H3TM6** foram superiores a 5 nas linhagens celulares de neoplasias hematológicas (K562, Jurkat e Daudi), o que demonstra uma alta seletividade de ambas as pirazolininas para essas células quando comparadas a células não neoplásicas. Ainda, a pirazolinina **H3TM6** demonstrou uma alta seletividade para células de melanoma enquanto que a pirazolinina **H3TM4** demonstrou uma seletividade moderada, quando comparadas a células não neoplásicas. Esse resultado pode implicar na redução dos efeitos adversos para portadores de neoplasias hematológicas caso esses compostos venham a ser administrado *in vivo*.

Na sequência, ainda com a finalidade de analisar a citotoxicidade de **H3TM4** e **H3TM6** em células não neoplásicas (saudáveis), o efeito das pirazolininas selecionadas em eritrócitos humanos foi avaliado pelo cálculo da porcentagem de hemólise após incubação com concentrações crescentes de cada composto. Para investigação de novos agentes quimioterápicos, esse é um parâmetro extremamente importante a ser avaliado, pois a biocompatibilidade do composto com os eritrócitos humanos sugere uma segurança na administração *in vivo* desse futuro quimioterápico por via sistêmica (MOCAN, 2013; POPESCU et al., 2017). Os resultados demonstraram que mesmo em concentrações muito altas, 9 e 12 vezes maiores que a CI_{50} de 24 horas mais alta encontrada em células de LAs para **H3TM4** e **H3TM6** (288 μ M e 668,4 μ M respectivamente) os compostos não foram citotóxicos para os eritrócitos saudáveis. Somente em concentrações 12 e 15 vezes maiores que a CI_{50} de 24 horas calculadas para **H3TM4** e **H3TM6** (384 μ M e 835,5 μ M, respectivamente), as pirazolininas foram capazes de causar hemólise significativa (Tabela 4). Esses resultados sugerem que as pirazolininas selecionadas no presente trabalho possuem uma elevada biocompatibilidade com eritrócitos saudáveis e indicam que em ensaios *in vivo* para prever a possibilidade de administração dos compostos pela via endovenosa poderão ser utilizadas concentrações elevadas de **H3TM4** e **H3TM6** sem causar hemólise no animal. Em acordo com o presente estudo, SANTOS-BUBNIAK et al. (2017) demonstraram que um derivado de 1,3,5-trifenil-4,5-di-hidro-1H-pirazol não causou hemólise significativa em eritrócitos saudáveis mesmo nas concentrações de 25 μ M e 50 μ M, entretanto concentrações mais elevadas não foram avaliadas. Nenhum outro estudo foi encontrado na literatura avaliando o impacto de derivados da pirazolinina em eritrócitos humanos.

O interesse por um novo composto para o tratamento de neoplasias hematológicas é baseado, principalmente, na sua citotoxicidade e seletividade sobre células malignas, mas também na sua capacidade de

inibir a proliferação celular, interromper o ciclo celular e induzir morte celular programada (FUSO et al., 2016, SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016, TAN; DUNCAN; SLAWSON, 2017, WIMAN; ZHIVOTOVSKY, 2017).

Levando em conta que os mecanismos de regulação do ciclo celular são alvos a serem explorados na terapia antitumoral, foi avaliado o efeito das pirazolinas selecionadas sobre o ciclo celular de linhagens de LAs K562 (LMA) e Jurkat (LLA) (Figura 12). O presente estudo demonstrou que ambas as pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** induzem um bloqueio significativo do ciclo celular na fase G0/G1 em células K562. Além disso, em células Jurkat houve um aumento da porcentagem de células na fase S após a incubação com **H3TM6**, porém o mesmo não foi observado com **H3TM4**, o que sugere uma tendência ao bloqueio nessa fase do ciclo celular. Segundo a literatura, um bloqueio na fase G0/G1 pode estar relacionado à ativação da proteína p53. A p53 age no primeiro ponto de checagem, localizado entre as fases G1 e S, e, é fundamental para a manutenção da integridade do genoma, pois permite a ação dos mecanismos de reparo do DNA e a remoção de células danificadas pelo processo de apoptose (HUNTER; LACASSE; KORNELUK, 2007; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; ABBAS; DUTTA, 2009; MALUF et al., 2011). Mutações genéticas nessa proteína levam à perda da capacidade de ligação ao DNA e a transcrição gênica. Além disso, um bloqueio na fase S sugere uma provável interferência na replicação do DNA celular (WIMAN et al., 2010; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Ainda, como descrito anteriormente, o ciclo celular é regulado pelas CDKs que atuam interagindo com as ciclinas. Estudos relatam que as ciclinas A2 e E1 ativam CDKs responsáveis pela progressão do ciclo celular da fase G1 para S. Dessa forma, a modulação dessas ciclinas, bem como dos genes inibidores de CDKs, p21 e p27, pode bloquear a fase S do ciclo celular (HU et al., 2015; YADAV et al., 2015). Assim, considerando que a linhagem K562 tem uma proteína p53 mutada e não funcional (CAVALCANTI et al., 2004) e que vários mecanismos estão envolvidos na replicação do DNA, estudos adicionais serão necessários em ambas as células de LAs, para elucidar os mecanismos completos do bloqueio do ciclo celular induzido pelas pirazolinas. Até o momento, poucos estudos elucidando a ação antileucêmica das pirazolinas foram descritos na literatura. Bao et al. (2018) relataram que o efeito citotóxico de um derivado pirazolínico (BHX) resultou em um bloqueio na fase G0/G1 em células K562. Por outro lado, o estudo de SANTOS-BUBNIAK et al. (2017) mostrou um aumento na porcentagem de células Jurkat e K562 na fase S, após a incubação com um derivado pirazolínico.

Ainda, considerando que a proliferação celular descontrolada é apontada como uma das principais características envolvidas na oncogênese, que as células neoplásicas em constante replicação superexpressam a proteína KI-67 em todas as fases do ciclo celular e que a mesma é utilizada na clínica, como um marcador de proliferação celular (YANG et al., 2004; YANG et al., 2006; PATHMANATHAN; BALLEINE, 2013), no presente estudo foi avaliada a expressão dessa proteína em células K562 e Jurkat após a incubação com as pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6**. Como mostra a Figura 13, a expressão de KI-67 em células K562 e Jurkat apresentaram uma tendência à diminuição após incubação com as pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6**, no entanto, apenas as células K562 incubadas com **H3TM4** e as células Jurkat incubadas com **H3TM6** mostram uma redução significativa na expressão dessa proteína. Considerando que houve uma tendência à redução da expressão da proteína KI-67 em células K562 incubadas com **H3TM6** e em células Jurkat incubadas com **H3TM4**, os resultados não significativos talvez possam ser justificados pelo fato de que os experimentos foram conduzidos em um único período de incubação (12 horas), o qual pode não ter sido ideal para se observar uma diferença significativa na expressão de KI-67. Portanto, estudos adicionais devem ser realizados em diferentes tempos a fim de confirmar o papel das pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** na modulação dessa proteína e na modulação da proliferação de células neoplásicas. Um estudo conduzido por INSUASTY et al (2011), reportou a inibição da proliferação de células de leucemias, após a incubação com derivados pirazolínicos, por meio da avaliação da GI₅₀ (concentração necessária do composto para inibir o crescimento de 50% das células), entretanto a DL₅₀ (dose letal do composto para 50% das células) foi acima de 100µM para todos os compostos investigados. Até o momento, nenhum estudo que demonstre a influência de pirazolinas ou seus derivados sintéticos na expressão de KI-67 foi encontrado na literatura.

Como descrito anteriormente, o ciclo celular é um processo altamente regulado e o bloqueio na sua progressão ocorre em situações em que há necessidade de reparos no genoma da célula para que a proliferação celular possa prosseguir de forma normal. Se houver falha no reparo e o dano não for corrigido são ativadas vias de sinalização para a morte celular, a qual pode ocorrer por diversos mecanismos, como apoptose, autofagia, necroptose e outros (MALUF et al., 2011; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; GALLUZZI et al., 2018). Nesse sentido, no presente estudo, três metodologias diferentes foram utilizadas para avaliar o tipo de morte celular induzida pelas pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6**.

Inicialmente, a morfologia celular das linhagens de LMA K562 e de LLA Jurkat incubadas com **H3TM4** e **H3TM6** foi analisada por microscopia de fluorescência após coloração com BE/AO. Como pode ser evidenciado na Figura 14, as células K562 e Jurkat incubadas com **H3TM4** e **H3TM6** demonstram características morfológicas típicas de células em apoptose, tais como diminuição do volume celular, condensação da cromatina, formação de *blebs* na membrana plasmática, formação de corpos apoptóticos e perda de permeabilidade da membrana plasmática, evidenciado pela fluorescência laranja.

Seguindo essa linha, a externalização dos resíduos de fosfatidilserina é um dos processos que ocorre no início da apoptose e é considerada um marcador importante desse tipo de morte celular (ENGELAND et al., 1998; SIVAGNANAM; PALANIRAJAN; GUMMADI, 2017). Nessa perspectiva, foi realizada a marcação das células de LA K562 e Jurkat incubadas ou não com as pirazolinias selecionadas **H3TM4** e **H3TM6** com Anexina-V conjugada a FITC, e analisada a expressão desse marcador. O aumento significativo da porcentagem de células K562 e Jurkat positivas para Anexina-V demonstrado na Figura 15, corrobora com a observação de características apoptóticas analisadas pela microscopia de fluorescência (Figura 14) e indica que a apoptose está envolvida no mecanismo de citotoxicidade causado pelas pirazolinias **H3TM4** e **H3TM6** sobre células de LAs. Segundo a literatura, uma das consequências finais da morte celular por apoptose é a fragmentação do DNA por endonucleases em fragmentos múltiplos de 180 a 200 pares de bases, formando o "padrão de escada" (HAAKE; POLAKOWSKA, 1993). Nesse sentido, a terceira metodologia utilizada para confirmar a morte celular por apoptose induzida pelas pirazolinias **H3TM4** e **H3TM6** nas células de LAs, foi a análise da fragmentação do DNA por eletroforese em gel de agarose. Confirmando os resultados anteriores, a Figura 16 mostra o "padrão de escada", resultante da fragmentação do DNA das células K562 e Jurkat após o tratamento com as pirazolinias **H3TM4** e **H3TM6**. Este bloco de resultados está de acordo com outros estudos encontrados na literatura, que também relataram morte celular por apoptose induzida por derivados pirazolínicos (SANTOS-BUBNIAK et al., 2017; BAO et al., 2018).

A identificação das vias de sinalização envolvidas no processo de apoptose é um dos objetivos na investigação de novos compostos que possam ser utilizados como potenciais agentes quimioterápicos (WICKMAN; JULIAN; OLSON, 2012; SIVAGNANAM; PALANIRAJAN; GUMMADI, 2017). Considerando o exposto, no presente estudo foi analisado o envolvimento da apoptose intrínseca e/ou

apoptose extrínseca no mecanismo de morte celular induzido pelas pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6**. Os resultados obtidos evidenciaram um aumento significativo na expressão da proteína pró-apoptótica Bax em células de LMA, K562, após a incubação com a pirazolina **H3TM6**, e em células de LLA, Jurkat, após incubação com ambas as pirazolinhas selecionadas (Figura 17). O composto **H3TM4** na linhagem K562 apresentou apenas uma tendência de aumento. Ainda, como mostra a Figura 18, houve uma diminuição significativa na expressão da proteína Bcl-2 nessas linhagens celulares após incubação com **H3TM4**, enquanto que a incubação com o **H3TM6** resultou somente em uma tendência à diminuição desta proteína. No entanto, ainda que a modulação da expressão das proteínas Bax e Bcl-2 não tenha sido significativa nas células incubadas com a pirazolina **H3TM6**, a incubação das duas linhagens celulares avaliadas (K562 e Jurkat) com ambas as pirazolinhas selecionadas (**H3TM4** e **H3TM6**) demonstra a predominância da expressão da proteína pró-apoptótica Bax em relação a Bcl-2 (Tabela 5). Segundo a literatura, o controle da apoptose intrínseca é baseado no equilíbrio entre os membros antiapoptóticos e pró-apoptóticos da família Bcl-2 (PERLMAN et al., 1999; GOLDAR et al., 2015; GALLUZZI et al., 2018). Dessa forma, como nas células K562 e Jurkat incubadas com **H3TM4** e **H3TM6** a expressão de Bax prevaleceu, isso indica que resultou na propagação do sinal pró-apoptótico.

Sabe-se que na apoptose intrínseca a sinalização ocorre pela via mitocondrial e é dependente da liberação de proteínas pró-apoptóticas pela mitocôndria após a perda do $\Delta\Psi_m$. Assim, o desequilíbrio entre os membros antiapoptóticos e pró-apoptóticos da família Bcl-2 nas células K562 e Jurkat incubadas com ambas as pirazolinhas selecionadas (Tabela 5) resultou na diminuição do $\Delta\Psi_m$ (Figura 19). Segundo a literatura, a inibição da proteína antiapoptótica Bcl-2 e o aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax, facilita a abertura de poros de permeabilidade transitória na membrana mitocondrial, o que permite que fatores pró-apoptóticos, como o AIF, migrem da mitocôndria para o citosol (DALLAPORTA et al., 1999; DANIAL; GIMENEZ-CASSINA; TONDERA, 2010; GOLDAR et al., 2015; GALLUZZI et al., 2018). Como mostra a Figura 20, a incubação das células de LA com **H3TM4** e **H3TM6** aumentou significativamente a expressão de AIF em células Jurkat, mas não em células K562, o que sugere que outras proteínas possam estar envolvidas na citotoxicidade das pirazolinhas em células de LMA, tais como o citocromo C e as proteínas SMAC/Diablo e endonuclease G. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com outros dois estudos que relataram a ativação da apoptose intrínseca por

derivados pirazolínicos, a qual foi evidenciada pelo aumento da expressão de Bax e AIF, redução de Bcl-2, (SANTOS-BUBNIAK et al., 2017) e perda de $\Delta\Psi_m$ (SANTOS-BUBNIAK et al., 2017; BAO et al., 2018).

Ainda, os resultados observados neste estudo demonstram expressão significativamente diminuída da proteína antiapoptótica survivina em células K562 incubadas com ambas as pirazolinas selecionadas e em células Jurkat incubadas com **H3TM6** (Figura 21). Sabe-se que a survivina é uma proteína antiapoptótica da família IAP que pode inibir a apoptose dependente de caspase tanto por mecanismos da apoptose intrínseca como da apoptose extrínseca. Pela apoptose intrínseca, a survivina pode se ligar e inibir a proteína SMAC/Diablo, o que resulta inibição da liberação e não ativação da caspase-9. Pela apoptose extrínseca, a survivina pode interagir com a proteína inibidora de apoptose ligada ao X (XIAP), formando um complexo survivina-XIAP que se liga à caspase-9 para inibir sua função apoptótica. Em ambas as situações, não há ativação da caspase-9 e, conseqüentemente, não há ativação da caspase-3. Além disso, a survivina é essencial na regulação da progressão da mitose, pois controla a fase G2/M do ciclo celular, por associação com o fuso mitótico. Estudos sugerem que, na clínica, a survivina está relacionada à resistência à radiação e à quimioterapia e que a inibição dessa proteína pode levar a maior sensibilidade das células neoplásicas aos atuais tratamentos disponíveis contra o câncer (ZAFFARONI; PENNATI; DAIDONE, 2005; LYU et al., 2018; EBRAHIMIYAN et al., 2018).

Segundo a literatura, a apoptose extrínseca é iniciada pela ativação de receptores de membrana, como FasR e TRAILR, que são capazes de desencadear cascatas de sinalização intracelulares que culminam na ativação da caspase-8. A caspase-8 ativada ativa diretamente as caspases efetoras -3 e -7, o que resulta em apoptose independente dos processos mitocondriais da apoptose intrínseca. Além disso, a caspase-8 ativada pode ativar a proteína pró-apoptótica Bid, membro da família Bcl-2, o que faz uma conexão entre a apoptose intrínseca e a apoptose extrínseca (RÖDER; TRAUZOLD; KALTHOFF, 2011; AMARANTE-MENDES; GRIFFITH, 2015; GOLDAR et al., 2015; GALLUZZI et al., 2018). De acordo com a Figura 22, foi observada uma expressão significativamente aumentada de FasR em células K562 incubadas com as pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** e em células Jurkat incubadas com **H3TM6**. Um único estudo foi encontrado na literatura avaliando o efeito de pirazolinas na apoptose extrínseca. SANTOS-BUBNIAK et al. (2017) relataram a ativação de FasR em células de LLA incubadas com um derivado

pirazolínico, semelhantemente ao que foi apresentado no presente trabalho.

Em relação à expressão de caspase-3 ativada, como evidenciado na Figura 23, somente a incubação com **H3TM4** levou ao aumento significativo da expressão dessa caspase nas células de LMA K562. Já nas células de LLA Jurkat, a incubação com ambas as pirazolinas resultaram em um aumento significativo da expressão dessa proteína. Até o momento, poucos estudos foram encontrados na literatura que investigaram os mecanismos de morte celular envolvidos na citotoxicidade de derivados pirazolínicos em células de LAs, mas todos eles relataram expressão aumentada de caspase-3 ativada (SANTOS-BUBNIAK et al., 2017; BAO et al., 2018).

Processos alternativos, como o estresse no retículo endoplasmático (RE), podem desencadear a apoptose intrínseca e a apoptose extrínseca. Quando o estresse no RE é desencadeado, a proteína BiP é ativada para manter a homeostase celular. Essa proteína se liga a fatores de transcrição para diminuir a síntese de proteínas desagregadas dentro do RE. No entanto, em situações em que a homeostase não pode ser recuperada, as células geram uma resposta que leva à expressão de genes reguladores da apoptose, como o CHOP. A ativação dessa proteína resulta na inibição de membros antiapoptóticos da família Bcl-2 e na regulação positiva de membros da família de receptores de morte (DUFEY et al., 2014; GRIESEMER et al., 2014; CUBILLOS-RUIZ; BETTIGOLE; GLIMCHER, 2017). Considerando os efeitos das pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** sobre as proteínas Bcl-2, Bax e FasR demonstrados anteriormente, seria interessante investigar futuramente o seu efeito sobre as proteínas BiP e CHOP, a fim de avaliar se a ativação da apoptose intrínseca e da apoptose extrínseca por essas pirazolinas ocorre como consequência do estresse no RE.

Os diferentes perfis observados para **H3TM4** e **H3TM6** nas células K562 e Jurkat apresentados no presente estudo podem ser justificados pelo fato de a expressão das proteínas da apoptose intrínseca e extrínseca (Bax, Bcl-2, AIF, survivina, FasR e caspase-3) foi avaliada somente após 12 horas de incubação com os compostos. É possível que outros períodos de incubação, menores ou maiores do que 12 horas dependendo da proteína a ser investigada e do seu papel na sequência de eventos que desencadeiam a morte celular por apoptose, poderiam ser suficientes para observar uma modulação significativa em experimentos nos quais apenas uma tendência de aumento ou diminuição foi observada. Assim, mais estudos são necessários a fim de elucidar

completamente os mecanismos envolvidos na apoptose induzida pelas pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** em células de LAs.

O bloco de resultados apresentado até o momento permite sugerir que o mecanismo de citotoxicidade das pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** em células de LMA e LLA envolve sinalizações de apoptose intrínseca e apoptose extrínseca, além do bloqueio do ciclo celular e da modulação da proliferação celular. Ainda, a pirazolina **H3TM6** na linhagem K562 parece induzir um tipo de morte celular regulada que ocorre de forma independente de caspase, porém que apresenta características de apoptose, tais como morfologia de células apoptóticas, fragmentação do DNA e modulação das proteínas envolvidas na sinalização da apoptose intrínseca e extrínseca. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar essa questão.

Finalmente, células mononucleadas de MO ou SP de pacientes com diferentes subtipos de LAs foram isoladas e incubadas com as pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** (Figuras 24 e 25). Como esperado, diferentes valores de CI_{50} foram encontrados para cada caso, uma vez que as leucemias são doenças heterogêneas que reagem de maneira diferente ao tratamento e a novos compostos (LOZZIO; LOZZIO, 1975; RUMJANEK et al 2001; SWERDLOW, 2017). Os resultados apresentados na Tabela 6 demonstram que, apesar de o composto **H3TM6** ter uma CI_{50} mais elevada sobre a linhagem celular K562 após 24 horas de incubação, de forma geral, essa pirazolina foi mais citotóxica do que o composto **H3TM4** sobre as células de pacientes com LMA (Pacientes 1 e 4 - 7). Como discutido anteriormente, esse resultado pode ser justificado pela origem da linhagem celular K562, uma vez que a mesma foi isolada de um paciente com LMC em crise blástica, a qual é considerada uma doença agressiva e de prognóstico desfavorável. Além disso, a proteína oncogênica BCR-ABL é expressa nessa linhagem, o que é uma característica de resistência aos tratamentos (MARTINS et al., 1997; COOPER, 2001; SWERDLOW et al., 2017). Nos dois casos de LLA avaliados no estudo (Pacientes 2 e 3), a pirazolina **H3TM6** se mostrou mais efetiva do que a **H3TM4**.

De todos os pacientes incluídos neste estudo, apenas o paciente 7 estava em recidiva no momento em que as células foram obtidas. Esse paciente foi diagnosticado com LPA t (15; 17), mutação FLT3/DIT e Bcr3 positivo. Os resultados obtidos após a incubação com as pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** (Figura 23) mostram que ambas as pirazolinas foram eficazes contra essas células, contudo o composto **H3TM6** foi o mais citotóxico (Tabela 6). Em geral, o protocolo de tratamento da LPA envolve o uso de ácido trans-retinóico associado à antraciclinas

(SWERDLOW et al., 2017), no entanto, o ácido trans-retinóico induz efeitos adversos graves e alguns pacientes não respondem bem a esse tratamento inicial, o que resulta em altas taxas de recidiva. Em pacientes jovens, quando a resistência à quimioterapia é persistente, o tratamento mais indicado é o transplante de MO (KAYSER et al., 2017; SAHAI et al., 2017; SHAN et al., 2017). Além disso, a presença da mutação DIT/FLT3 em pacientes com LPA t (15; 17) está associada a um pior prognóstico (CHAUFFAILLE et al., 1996; KRUM, 2006; FAN et al., 2017). Por estas razões, é muito importante desenvolver e estudar novas moléculas capazes de combater essas células resistentes (SHAN et al., 2017). Dessa forma, os resultados obtidos para as pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** sobre as células do paciente 7 são extremamente promissores, mas precisam ser avaliados em mais casos.

Os maiores valores de CI_{50} foram encontrados nas células coletadas do paciente 2, diagnosticadas com LLA-B. Sabe-se que, em geral, pacientes mais jovens com LLA e pacientes com menor contagem de leucócitos no momento do diagnóstico apresentam melhor prognóstico (SWERDLOW et al., 2017). A Tabela 6 mostra que, apesar de o paciente 2 ser jovem, quando os experimentos foram conduzidos a sua contagem de leucócitos era muito alta, o que, de acordo com o exposto acima, não favorece o seu prognóstico.

A respeito das células obtidas do paciente 3, diagnosticado com LLA de células T precursoras, a Tabela 6 mostra que o valor CI_{50} após a incubação com **H3TM6** foi semelhante ao encontrado em células Jurkat (Tabela 2). Além disso, uma alta CI_{50} foi observada nas células desses pacientes após a incubação com **H3TM4**. Para justificar esse resultado, uma hipótese seria que o composto **H3TM4** não foi tão eficiente nessas células porque as células T precursoras compreendem a população mais imatura detectável nas linhagem de células T (KRUEGER et al., 2017; SWERDLOW et al., 2017). Portanto, essa pirazolina pode não ser tão eficiente contra essas células mais indiferenciadas. Além disso, considerando que o paciente 3 tinha 81 anos de idade no momento do diagnóstico, seu prognóstico não era favorável devido à sua idade avançada (SWERDLOW et al., 2017).

Os resultados obtidos para as células do paciente 4 (diagnosticado com LMA sem maturação) e do paciente 5 (diagnosticado com LMA secundária à SMD) sugerem que ambas as pirazolinas podem ser eficazes contra essas neoplasias (Figura 23). No entanto, o composto **H3TM6** foi claramente mais citotóxico do que o **H3TM4** (Tabela 6), com valores de CI_{50} quase duas vezes inferiores aos encontrados para células incubadas com **H3TM4**. É interessante ressaltar que a LMA sem maturação

apresenta um prognóstico reservado, associado as características clínicas, pois as células são muito indiferenciadas (SWERDLOW et al., 2017). Além disso, a LMA secundária à SMD é uma doença muito agressiva e seu tratamento é realizado com terapias mais intensas (OGLE et al., 2015; SWERDLOW et al., 2017), portanto, a citotoxicidade do **H3TM6** sobre essas células é muito promissora.

Em desacordo com os resultados encontrados sobre as células dos pacientes 4 (diagnosticado com LMA sem maturação) e 5 (diagnosticado com LMA secundária à SMD), o efeito das pirazolinias selecionadas sobre as células do paciente 1, diagnosticado com LMA com inversão do cromossomo 16 (inv(16)), sugerem que a pirazolina **H3TM4** foi mais citotóxica do que **H3TM6** (Tabela 6), semelhante aos resultados observados nas células K562 após 24 horas de incubação (Tabela 2). No entanto, apesar de a pirazolina **H3TM4** ter se mostrado mais efetiva, ambos os compostos apresentaram atividade citotóxica promissora sobre as células desse paciente. Esse resultado já era esperado, pois a LMA com inv (16) é uma neoplasia que, de forma geral, apresenta um bom prognóstico, com altas taxas de remissão completa da doença após o tratamento com uma terapia intensiva de consolidação.

Surpreendentemente, as células do paciente 6, diagnosticado com LMA t(8; 21), incubadas com **H3TM4** e **H3TM6** revelaram valores elevados de CI_{50} (Tabela 6). Considerando que a LMA com t (8; 21) de forma geral apresenta um bom prognóstico (SWERDLOW et al., 2017), melhores resultados eram esperados para ambas as pirazolinias sobre essas células. Talvez esses resultados possam ser justificados por uma limitação da metodologia utilizada para a obtenção das células mononucleadas, pois na amostra havia apenas 27% de células blásticas e os outros 73% eram células saudáveis. Nesse sentido, talvez o número de blastos isolados não foi suficientemente representativo. Seguindo esse raciocínio, talvez os altos valores de CI_{50} encontrados para as pirazolinias sobre as células desse paciente tenham sido influenciados pela ausência de efeito citotóxico das mesmas sobre as células saudáveis, como demonstrado na Tabela 2.

É evidente que, apesar de todas essas considerações, o pequeno número de amostras incluídas neste estudo (sete pacientes) não nos permite afirmar qualquer conclusão a respeito da citotoxicidade das pirazolinias **H3TM4** e **H3TM6** sobre os subtipos específicos de LAs. No entanto, os resultados obtidos até o momento são bastante promissores, pois mostram que as pirazolinias investigadas são capazes de reduzir significativamente a viabilidade celular não apenas de linhagens neoplásicas, mas também de células de SP e MO obtidas de pacientes

portadores de LAs. Até o momento, nenhum estudo foi encontrado na literatura relatando o efeito de derivados pirazolínicos sobre células de pacientes com LAs.

7 CONCLUSÃO

- As pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** foram citotóxicas de forma dependente da concentração e do tempo para as linhagens celulares de LAs, K562 e Jurkat, bem como para as linhagens celulares de linfoma de Burkitt, Daudi, e melanoma, B16-F10;
- As pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** não foram citotóxicas para as células não neoplásicas de voluntários saudáveis e não induziram hemólise significativa em eritrócitos normais;
- As pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** se mostraram seletivas para as células neoplásicas, em relação às células não neoplásicas de voluntários saudáveis;
- As pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** induziram um bloqueio no ciclo celular da linhagem K562 na fase G0/G1;
- A pirazolina **H3TM4** em células K562 e a pirazolina **H3TM6** em células Jurkat, reduziram significativamente a expressão do marcador de proliferação celular KI-67;
- As pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** induziram morte celular com características de apoptose em células K562 e Jurkat;
- A citotoxicidade das pirazolinas **H3TM4** em células K562 envolveu fatores reguladores da apoptose intrínseca e extrínseca, tais com a modulação do $\Delta\Psi_m$, das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Survivina, FasR e Caspase-3 ativada, enquanto que em células Jurkat envolveu somente fatores reguladores da apoptose intrínseca, como a modulação da proteína pró-apoptótica Bax, proteína Bcl-2, $\Delta\Psi_m$, AIF e Caspase-3 ativada ;
- A citotoxicidade das pirazolinas **H3TM6** envolveu fatores reguladores da apoptose intrínseca e extrínseca nas células K562 e Jurkat, modulando a expressão da proteína pró-apoptótica Bax, $\Delta\Psi_m$, Survivina, AIF, FasR e Caspase-3 ativada;
- As pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** foram citotóxicas para células mononucleadas de SP e MO de pacientes portadores de LAs.

Como conclusão, o presente estudo demonstra que as pirazolinas inéditas **H3TM4** e **H3TM6** possuem atividade citotóxica sobre diferentes células de neoplasias hematológicas e que o mecanismo de citotoxicidade envolvido na atividade desses compostos envolve o bloqueio do ciclo celular, a inibição da proliferação celular e a indução de morte celular regulada pela ativação da apoptose intrínseca e extrínseca. Além disso, os resultados demonstram que as pirazolinas **H3TM4** e **H3TM6** apresentaram propriedades físico-químicas adequadas para uma boa

biodisponibilidade oral e não apresentam citotoxicidade significativa sobre células não neoplásicas, o que sugere que esses novos compostos são candidatos promissores ao desenvolvimento de novos quimioterápicos eficientes contra as LAs.

REFERÊNCIAS

ALBAKR, R. B.; KHOJAH, O. T. Incidence Trend of The Leukemia Reported Cases in The Kingdom of Saudi Arabia, Observational Descriptive Statistic From Saudi Cancer Registry. **International Journal of Biomedical Research**, v. 5, n. 8, p. 522, 2014.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P; WILSON, J.; HUNT, T. **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1133p.

ALMEIDA, V. L. D.; LEITÃO, A.; REINAL, L. C. B.; MONTANARIL, C. A.; DONNICIL, C; L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

AMARANTE-MENDES, G. P.; GRIFFITH, T. S. Therapeutic applications of TRAIL receptor agonists in cancer and beyond. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 155, p.117-131, 2015.

American Association for Cancer Research. **AACR Cancer Progress Report 2014**. Clin Cancer Res 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Chemotherapy for acute lymphocytic leukemia. TREATING LEUKEMIA - ACUTE LYMPHOCYTIC (ALL) IN ADULTS TOPICS, Atlanta, 2016. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/leukemiaacutelymphocyticallinadults/detailedguide/leukemia-acute-lymphocytic-treatingchemotherapy>>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2018.

ANNOVAZZI, L.; MELLAI, M.; SCHIFFER D. Chemotherapeutic Drugs: DNA Damage and Repair in Glioblastoma. **Cancers**, [s.l.], v. 9, n. 12, p.57-60, 2017.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1305-8, 1998.

AUTRET, A.; MARTIN, S. J. Emerging role for members of the Bcl-2 family in Mitochondrial morphogenesis. **Molecular cell**, v. 36, n. 3, p. 355-363, 2009.

BAIG, S.; SEEVASANT, I.; MOHAMAD, J.; MUKHEEM, A.; HURI, H. Z.; KAMARUL, T. Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand? **Cell Death & Disease**. v. 7, e 2058, 2016.

BAIN, B. J. **Células Sangüíneas: um guia prático**. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

BANDGAR, B. P.; GAWANDE, S. S. Synthesis and biological screening of a combinatorial library of b-chlorovinylchalconas as anticancer, anti-inflammatory and antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 2060-2065, 2010.

BANDGAR, B. P.; ADSUL L. K.; CHAVAN, H. V.; JALDE, S. S.; SHRINGARE, S. N.; SHAIKH, R.; MESHARAM, R. J.; GACCHE, R. N.; MASAND, V. Synthesis, biological evaluation, and docking studies of 3-(substituted)-aryl-5-(9-methyl-3-carbazole)-1H-2-pyrazolines as potent anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 22, n. 18, p.5839-5844, 2012.

BAO, H.; ZHANG, Q.; DU, Y.; ZHANG, C.; XU, H.; ZHU, Z.; YAN, Z. Apoptosis induction in K562 human myelogenous leukaemia cells is connected to the modulation of Wnt/ β -catenin signalling by BHX, a novel pyrazoline derivative. **Cell Proliferation**, [s.l.], p.12433-12443, 2018.

BASSAN, R.; HOELZER, D. Modern Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 29, n. 5, p.532-543, 2011.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; **Química Medicinal - As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos** 3ª ed. Artmed, 2015. p.608.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 21, n. 6, p. 167-223, 2000.

BONELLI, P.; TUCCILLO, F. M.; BORRELLI, A.; SCHIATTARELLA, A.; BUONAGURO, M. CDK/CCN and CDKI Alterations for Cancer Prognosis and Therapeutic Predictivity. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 15, 2014.

BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum**, v. 97, p. 77-89, 1968.

BOSE, P.; GRANT, S. Rational Combinations of Targeted Agents in AML. **Journal of Clinical Medicine**, v. 4, n. 4, p. 634, 2015.

BRADFORD, J.A; LANGSDORF, C.; BULLER, G.; LUKE, T.; DAVIES, D.; Non- Cytotoxic Near – IR DNA stein for cell cycle analysis in living cells. **Life Technologies**, v. 5791, 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas em Oncologia/Ministérioda Saúde**. Ministério da Saúde, 2014.

BRISSOT, E.; MOTY, M. Which Acute Myeloid Leukemia Patients Should Be Offered Transplantation? **Seminars in Hematology**, v. 52, n. 3, p.223-231, 2015.

CALDECOTT, K. W. Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Reviews Genetics*, [s.l.], v. 9, n. 8, p.619-631, 2008.

CAO, J.; ZANG, J.; MA, C.; LI, X.; HOU, J.; LI, J.; HUANG, Y.; XU, W.; WANG, B.; ZHANG, Y. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Pyrazoline-Based Hydroxamic Acid Derivatives as Aminopeptidase N (APN) Inhibitors. **Chemmedchem**, [s.l.], v. 13, n. 5, p.431-436, 2018.

CAVALCANTI JÚNIOR, G. B.; SCHEINER, M. A.; OLIVEIRA, J. G. P.; VASCONCELOS, F. C.; DOBBIN, J. A.; KLUMB, C. E.; MAIA, R. C. Detecção da proteína p53 em células leucêmicas por citometria de fluxo e western blot. **Revista brasileira de cancerologia**. v. 50, n. 3, p. 191–202, 2004.

CHAUFFAILLE, M.; YAMAMOTO, M.; MONCAU, J. E.; BRAGA, G. W.; SOUTO, E. X.; KERBAUY, J. Cytogenetic abnormalities as prognostic factors in acute myeloid leukemia. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 42, n. 4, p. 200-4, 1996.

CHEN, L. Z.; SUN, W. W.; BO, L.; WANG, J. Q.; XIU, C.; TANG, W. J.; SHI, J. B.; ZHOU, H. P.; LIU, X. H. New arylpyrazoline-coumarins: Synthesis and anti-inflammatory activity. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 138, p.170-181, 2017.

CLAVERIA-GIMENO, R.; VEJA, S.; ABIAN, O.; VELAZQUEZ-CAMPOY, A. A look at ligand binding thermodynamics in drug discovery. *Expert Opinion On Drug Discovery*, [s.l.], v. 12, n. 4, p.363-377, 2017.

COGLE, C. R.; SCOTT, B. L.; BOYD, T.; GARCIA-MANERO, G. Oral Azacitidine (CC-486) for the Treatment of Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia. **The Oncologist**, [s.l.], v. 20, n. 12, p.1404-1412, 2015.

COOPER, G.M., **A célula**, 2^o ed., Artmed_ Editora LTDA, Porto Alegre, 712, 2001.

CORNELL, R. F.; PALMER, J. Adult acute leukemia. **Disease-a-month**, v. 58, n. 4, p. 219-38, 2012.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: patologia estrutural e funcional**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

CUBILLOS-RUIZ, J. R.; BETTIGOLE, S. E.; GLIMCHER, L. H. Tumorigenic and Immunosuppressive Effects of Endoplasmic Reticulum Stress in Cancer. **Cell**, [s.l.], v. 168, n. 4, p.692-706, 2017.

CZABOTAR, P. E.; LESSENE, G.; STRASSER, A.; ADAMS, J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 49-63, 2014.

DAHHAM, S. S.; TABANA, Y. M.; IQBAL, M. A.; AHAMED, M. B.; EZZAT, M. O. MAJID, A. S.; MAJID, A. M. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11808-29, 2015.

DALLAPORTA, B.; MARCHETTI, P.; DE PABLO, M. A.; MAISSE, C.; DUC, H. T.; MÉTIVIER, D.; ZAMZAMI, N.; GEUSKENS, M.;

KROEMER, G. Plasma membrane potential in thymocyte apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 11, p. 6534-6542, 1999.

DANIAL, N. N.; GIMENEZ-CASSINA, A.; TONDERA, D. Homeostatic functions of BCL-2 proteins beyond apoptosis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 687, p. 1-32, 2010.

DEBNATH, S.; MUKHERJEE, A.; KARAN, S.; DEBNATH, M.; CHATTERJEE, T. K. Induction of apoptosis, anti-proliferation, tumor-angiogenic suppression and down-regulation of Dalton's Ascitic Lymphoma (DAL) induced tumorigenesis by poly- l -lysine: A mechanistic study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 102, p.1064-1076. 2018.

DE FARIA, J. L. **Patologia geral: fundamentos das doenças, com aplicações clínicas**. 4. ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

DÖHNER, H.; WEISDORF, D. J.; BLOOMFIELD, C. D. Acute Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 12, p. 1136-1152, 2015.

DUFEY, E.; SEPÚLVEDA, D.; ROJAS-RIVERA, D.; HETZ, C. Cellular Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Health and Disease. 1. An overview. **American Journal of Physiology**, v. 37, n. 7, p. 1152-1162, 2014.

DORRANCE, A. M.; NEVIANI, P.; FERENCHAK, G. J.; HUANG, X.; NICOLET, D.; MAHARRY, K. S.; OZER, H. G.; HOELLARBAUER, P.; KHALIFE, J.; HILL, E. B.; YADAY, M.; BOLON, B. N.; LEE, R. J.; LEE, L. J.; CROCE, C. M.; GARZON, R.; CALIGIURI, M. A.; BLOOMFIELD, C. D.; MARUCCI, G. Targeting leukemia stem cells in vivo with ANTAGOMIR-126 nanoparticles in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 29, n. 11, p. 2143-2153, 2015.

EBRAHIMIYAN, H.; ASLANIA, S.; REZAEI, N.; JAMSHIDI, A.; MAHMOUDI, M. Survivin and autoimmunity; the ins and outs. **Immunology Letters**, [s.l.], v. 193, p.14-24, 2018.

ELMAN, I.; SILVA, M. E. M. P. Crianças portadoras de leucemia linfóide aguda: análise dos limiares de detecção dos gostos básicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 297-303, 2007.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ENGELAND, M. V.; NIELAND, L. J. W.; RAMAEKERS, F. C. S.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, n. 1, p. 1-9, 1998.

ESTRADA, R.; JIMÉNEZ, S. Diferentes alteraciones genéticas sausan diferentes melanomas y nuevas posibilidades Terapêuticas. v. 101, p. 394-400, 2010.

EVANS, H. M.; SCHULEMANN, W.. THE ACTION OF VITAL STAINS BELONGING TO THE BENZIDINE GROUP. **Science**, [s.l.], v. 39, n. 1004, p.443-454, 1914.

FAN, Y.; CAO, Y.; BAI, X.; ZHUANG, W. The clinical significance of FLT3 ITD mutation on the prognosis of adult acute promyelocytic leukemia. **Hematology**, [s.l.], p.1-6, 2017.

FENG, Q.; LEONG, W. S.; LIU, L.; CHAN, W.I. Peruvoside, a Cardiac Glycoside, Induces Primitive Myeloid Leukemia Cell Death. **Molecules**, v. 21, n. 4, p.534, 2016.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; RABELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D. BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. 359-386, 2015.

FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. 469 p.

FESIK, S. W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 11, p.876-885, 2005.

FILHO, G. B.; GUIMARÃES, R. C.; BOGLIOLO, L. Capítulo 8: Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: FILHO, G. B. BOGLIOLO: **Patologia Geral**. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1998. p. 148-192.

FREEDBERG, I. M.; EISEN, A. Z.; WOLFF, K.; AUSTEN, K. F.; GOLDSMITH, L. A.; KATZ, S. I.; FITZPATRICK, T. B. **Fitzpatrick's dermatology in General Medicine**. 8th ed. New York: The McGraw-Hill Co.; 2012.

FREEMAN-COOK, K. D.; HOFFMAN, R. L.; JOHNSON, T. W. Lipophilic efficiency: the most important efficiency metric in medicinal chemistry. *Future Medicinal Chemistry*, [s.l.], v. 5, n. 2, p.113-115, 2013.

FRENZEL, A.; GRESPI, F.; CHMELEWSKI, W.; VILLUNGER, A. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. **Apoptosis**, v. 14, n. 4, p. 584-596, 2009.

FRIEDBERG, E. C. Correcting the blueprint of life: an historical account of the discovery of DNA repair mechanisms. **Plainview**, p.210, 1997.

FRIEDBERG, E. C.; WALKER, C. G.; SIEDE, W.; WOOD, R. D.; SCHULTZ, R. A.; ELLENBERGER, T. DNA repair and mutagenesis. Washington: ASM Press. p. 9-57. 2006.

FULDA, S. Cell death in hematological tumors. **Apoptosis**, v. 14, n. 4, p. 409-23, 2009.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; DAWSON, T. M.; EL-DEIRY, W. S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M. O.; KEEP, O.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; LU, X., MADEO, F.; MALOMI, W.; MEHLEN, P.; NUÑES, G.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; RUBINZTEIN, D. C.; SHI, Y.; SIMON, H. U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107-20, 2012.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; DAWSON, T. M.; EL-DEIRY, W. S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M. O.; KEEP, O.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; LU, X., MADEO, F.; MALOMI, W.; MEHLEN, P.;

NUÑES, G.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; RUBINZTEIN, D. C.; SHI, Y.; SIMON, H. U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.486-541, 23 jan. 2018.

GENG, Y.; ISHIKAWA, Y.; VATNER, D. E.; WAGNER, T. E.; BISHOP, S. P.; VANER, S. F.; HOMCY, C. J. Apoptosis of cardiac myocytes in Gsalpha transgenic mice. **Circulation Research**, v. 84, n. 1, p.34-42, 1999.

GEORGE, R. F.; FOUAD, M. A.; GOMAA, I. E. Synthesis and cytotoxic activities of some pyrazoline derivatives bearing phenyl pyridazine core as new apoptosis inducers. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 112, p.48-59, 2016.

GOLDAR, S. KHANIANI, M. S.; DERAKHSHAN, S. M.; BARADARAN, B. Molecular mechanism of apoptosis and roles in cancer development and treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 6, p. 2129 –2144, 2015.

GONG, J.; TRAGANOS, F.; DARZYNKIEWICZ, Z. A Selective Procedure for DNA Extraction from Apoptotic Cells Applicable for Gel Electrophoresis and Flow Cytometry. **Analytical Biochemistry**, v. 218, n. 2, p. 314-319, 1994.

GOODMAN, S. L.; GILMAN, G. A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12. ed. Porto Alegre – RS: AMGH; 2012.

GRIESEMER, M.; YOUNG, C.; ROBINSON, A. S.; PETZOLD, L. BiP Clustering Facilitates Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum. **Plos Computational Biology**, [s.l.], v. 10, n. 7, p.36-75, 2014.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 53, p.335-343, 2007.

GUSTAFSSON, A. B.; GOTTLIEB, R. A. Heart mitochondria: gates of life and death. **Cardiovascular Research**, v. 77, p. 334-43, 2008.

HAAKE, A. R.; POLAKOWSKA, R. R. Cell Death by Apoptosis in Epidermal Biology. **Journal Of Investigative Dermatology**, v. 101, n. 2, p.107-112, 1993.

HAJDU, S. I. A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1. **Cancer**, [s.l.], v. 117, n. 5, p.1097-1102, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n.1, p.57-70, 2000.

HAO, Z.; KOTA, V. Volasertib for AML: clinical use and patient consideration. **Onco Targets and Therapy**, v. 8, p.1761-1771, 2015.

HARASHIMA, H.; DISSMEYER, N.; SCHNITTGER, A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. **Trends In Cell Biology**, [s.l.], v. 23, n. 7, p.345-356, 2013.

HARDFIELD, J. A.; DUCKI, S.; HIRST, N.; MCGOWN, A. T. Tubulin and microtubules as targets for anticancer drugs, **Progress in Cell Cycle Research**, v. 5, p.309-325, 2003.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**. v. 18, p. 45–51, 2003.

HAVRYLYUK, D.; KOVACH, N.; ZIMENKOVSKY, B.; VASYLENKO, O.; LESYK, R. Synthesis and Anticancer Activity of Isatin-Based Pyrazolines and Thiazolidines Conjugates. **Archiv Der Pharmazie**, [s.l.], v. 344, n. 8, p.514-522, 16 jun. 2011.

HE, X.; LEI, Z.; SHU, L.; ZHIGANG, C.; XIAOYING, Z. Loperamide, an anti-diarrheal agent, induces apoptosis and DNA damage in leukemia cells. **Oncology Letters**, [s.l.], p.765-774, 2017.

HELMAN, R.; SANTOS, F. P.; SIMÕES, B.; ATTA, E. H.; CALLERA, F.; DOBBIN, J. A.; MATTOS, É. R.; ATALLA, A.; MAIOLINO, A.; ZANICHELLI, M. A.; DIEFENBACH, C. F.; DELAMAIN, M. T.; HAMERSCHLAK, N. Acute myeloid leukemia: update in diagnosis and treatment in Brazil. **Einstein**. [s.l.], v. 9, n. 2, p.179-183. 2011.

- HU, L.; SU, P.; LI, R.; YAN, K.; CHEN, Z.; SHANG, P.; QIAN, A. Knockdown of microtubule actin crosslinking factor 1 inhibits cell proliferation in MC3T3-E1 osteoblastic cells. **BMB Reports**, v. 48, n. 10, p. 583-588, 2015.
- HUNGER, P.; MULLIGHAN, C. G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 373, n. 16, p.1541-1552, 2015.
- HUNTER, A. M.; LACASSE, E. C.; KORNELUK, R. G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. **Apoptosis**, v. 12, n. 9, p. 1543-68, 2007.
- HUSSAINI, S. M. A.; YEDLA, P.; BABU, K. S.; SHAIK, T. B.; CHITYAL, G. K.; KAMAL, A. Synthesis and Biological Evaluation of 1,2,3-triazole tethered Pyrazoline and Chalcone Derivatives. **Chemical Biology & Drug Design**, [s.l.], v. 88, n. 1, p.97-109, 2016.
- INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C.G. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, [s.l.], v. 381, n. 9881, p.1943-1955, 2013.
- INCA. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva: Rio de Janeiro, 2018.
- INSUASTY, B.; CHAMIZO, L.; MUÑOZ, J.; TIGREROS, A.; QUIROGA, J.; ABOÍNA, R.; NOGUERAS, M.; COBO, J. Synthesis of 1-Substituted 3-Aryl-5-aryl(hetaryl)-2- pyrazolines and Study of Their Antitumor Activity. **Archiv Der Pharmazie**, v. 345, n. 4, p.275-286, 2011.
- JAMIESON, C. H.; WEISSMAN, I. L.; PASSEQUÉ, E. Chronic versus acute myelogenous leukemia. **Cancer Cell**, [s.l.], v. 6, n. 6, p.531-533, 2004.
- JANG, S.; REDON, C. E.; ALADJEM, M. I. Chromatin-Bound Cullin-Ring Ligases: Regulatory Roles in DNA Replication and Potential Targeting for Cancer Therapy. **Frontiers In Molecular Biosciences**, [s.l.], v. 5. 2018.

JIN, Z.; EL-DEIRY, W. S. Overview of cell death signaling pathways.

Cancer Biology & Therapy, v. 4, p.139-63, 2005.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 4, n. 4, p.253-265, 2004.

JOSHI, S. D.; DIXIT, S. R.; KIRANKUMAR, M. N.; AMINABHAVI, T. M.; RAJU, K. V.; NARAYAN, R.; LHERBET, C.; YANG, K. S. Synthesis, antimycobacterial screening and ligand-based molecular docking studies on novel pyrrole derivatives bearing pyrazoline, isoxazole and phenyl thiourea moieties. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 107, p.133-152, 2016.

KAHRIMAN, N.; HAŞIMOĞLU, Z.; SERDAROĞLU, V.; BERİŞ, F. Ş.; BARUT, B.; YAYLI, N. Synthesis of Novel Pyrazolines, Their Boron-Fluorine Complexes, and Investigation of Antibacterial, Antioxidant, and Enzyme Inhibition Activities. **Archiv Der Pharmazie**, [s.l.], v. 350, n. 2, p.1600285-1600295, 2016.

KAINA, B.; CHRISTMANN, M.; NAUMANN, S.; ROOS, W. P. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. **Dna Repair**, [s.l.], v. 6, n. 8, p.1079-1099, 2007.

KARABACAK, M.; ALTINTOP, M. D.; IBRAHIM, C. H.; KOGA, R.; OTSUKA, M.; FUJITA, M.; OZDEMIR, A. Synthesis and Evaluation of New Pyrazoline Derivatives as Potential Anticancer Agents. **Molecules**, [s.l.], v. 20, n. 12, p.19066-19084, 2015.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v.18, n. 432, p. 316– 323, 2004.

KAYSER, S.; KRZYKALLA, J.; ELLIOTT, M. A.; NORSWORTHY, K.; GONZALES, P.; HILLS, R. K.; BAER, M. R.; RÁČIL, Z.; MAYER, J.; NOVAK, J.; ŽÁK, P.; SZOTKOWSKI, T.; GRIMWADE, D.; RUSSELL, N. H.; WALTER, R. B.; ESTEY, E. H.; WESTERMANN, J.; GÖRNER, M.; BENNER, A.; KRÄMER, A.; SMITH, B. D.; BURNETT, A. K.; THIEDE, C.; RÖLLIG, C.; HO, A. D.; EHNINGER, G.; SCHLENK, R. F.; TALLMAN, M. S.; LEVIS, M. J.; PLATZBECKER, U. Characteristics and outcome of patients with therapy-related acute

promyelocytic leukemia front-line treated with or without arsenic trioxide. **Leukemia**, [s.l.], v. 31, n. 11, p.2347-2354, 2017.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**. v. 6, 239-257, 1972.

KIM, B. T.; KWANG-JOONG, O.; CHUN, J.C.; HWANG, K.J. Synthesis of Dihydroxylated Chalcone Derivatives with Diverse Substitution Patterns and Their Radical Scavenging Ability toward DPPH Free Radicals. **Bull. Korean Chemical Society**. v. 29, n. 6, p. 1125-1130, 2008.

KOFF, J. L.; RAMACHANDIRAN, S.; BERNAL-MIZRACHI, L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 2, p. 2942-55, 2015.

KOZAK, J.; WEST, C. E.; WHITEC, C.; COSTA-NUNES, J. A.; ANGELIS, K. J. Rapid repair of DNA double strand breaks in *Arabidopsis thaliana* is dependent on proteins involved in chromosome structure maintenance. **Dna Repair**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.413-419, 2009.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. **Physiological Reviews**, v.87, p. 99 - 163, 2007.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIANCENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death And Differentiation**, v. 16, n. 1, p.3-11, 2008.

KRUEGER, A.; ZIĘTARA, N.; ŁYSZKIEWICZ, M. T Cell Development by the Numbers. **Trends In Immunology**, [s.l.], v. 38, n. 2, p.128-139, 2017.

KRUG, U.; BÜCHNER, T.; BERDEL, W. E.; MÜLLER-TIDOW, C. The Treatment of Elderly Patients With Acute Myeloid Leukemia. **Deutsches Aerzteblatt Online**, p.863- 870, 2011.

KRUM, E. A. Correlação entre cariótipo, duplicação interna em tandem do gene FLT3 e polimorfismo do códon 72 do P53 em leucemia mieloide aguda (tese). São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2006.

KUMAR, P.; KUMAR, S.; HUSAIN, K.; KUMAR, A. An efficient synthesis of pyrazole chalcones under solvent free conditions at room temperature. **Chinese Chemical Letters**, 22, 37-40, 2011.

KUMAR, S.; BAWA, S.; DRABU, S.; KUMAR, R; GUPTA, H. Biological Activities of Pyrazoline Derivatives -A Recent Development. **Recent Patents On Anti-infective Drug Discovery**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.154-163, 1 nov. 2009.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C.: **Robbins Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 928.

LEE, J.; TANEJA, V.; VASSALLO, R. Cigarette Smoking and Inflammation: Cellular and Molecular Mechanisms. **Journal Of Dental Research**, v. 91, n. 2, p.142-149, 2011.

LEONCINI, L., CAMPO, E., STEIN, H., et al. Burkitt lymphoma. In: The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. Lyon: IARC; p. 330-334, 2017.

LEONI, L. M.; BAILEY.; REIFERT, J.; BENDALL, H. H.; ZELLER, R. W.; CORBEIL, J.; ELLIOTT, G.; NIEMEYER, C. C. Bendamustine (Treanda) Displays a Distinct Pattern of Cytotoxicity and Unique Mechanistic Features Compared with Other Alkylating Agents. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.309-317, 2008.

LI, LY.; LUO, X.; WANG, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. **Nature**, v. 412, p. 95-99, 2001.

LI, M. X.; DEWSON, G. Mitochondria and apoptosis: emerging concepts. **F1000Prime Reports**, v. 7, p. 42, 2015.

- LI, M.; YU, X. The role of poly(ADP-ribosyl)ation in DNA damage response and cancer chemotherapy. **Oncogene**, [s.l.], v. 34, n. 26, p.3349-3356, 2014.
- LI, N. N.; MENNG, X. S.; BAO, Y. R.; WANG, S.; LI, T. J. Evidence for the involvement of COX-2/VEGF and PTEN/PI3K/AKT pathway the mechanism of oroxin B treated liver cancer. **Pharmacognosy Magazine**, [s.l.], v. 14, n. 54, p.207-213, 2018.
- LIN, Y.; HAYNES, C. L. Impacts of Mesoporous Silica Nanoparticle Size, Pore Ordering, and Pore Integrity on Hemolytic Activity. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 132, n. 13, p.4834-4842, 2010.
- LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discov**, v. 1, p. 337-341, 2004.
- LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computacional approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 46; p. 3-26, 2001
- LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmomths. **Journal of Insect Physiology**, v. 10, p.643-349, 1964.
- LOZZIO C. B., LOZZIO B. B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. **Blood**. V. 45, p. 321–334,1975.
- LYU, H.; HUANG, J.; HE, Z.; LIU, B. Epigenetic mechanism of survivin dysregulation in human cancer. **Science China Life Sciences**, [s.l.], p.1-7, 2018.
- MAIORAL, M. F.; BODACK, C. D. N.; STEFANES, N. M.; BIGOLIN, Á.; MASCARELLO, A.; CHIARADIA-DELATORRE, L. D.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; SANTOS-SILVA, M. C. Cytotoxic effect of a novel naphthylchalcone against multiple cancer cells focusing on hematologic malignancies. **Biochimie**, [s.l.], v. 140, p.48-57, 2017.

MAIORAL, M. F.; GASPAR, P. C.; ROSA, G. R. S.; MASCARELLO, A.; CHIARADIA, L. D.; LICÍNIO, M. A., MORAES, A. C.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; SANTOS-SILVA, M. C. Apoptotic events induced by synthetic naphthylchalcones in human acute leukemia cell lines. **Biochimie**, [s.l.], v. 95, n. 4, p.866-874, 2013.

MAIORAL, M. F. Investigação dos eventos apoptóticos induzidos por chalconas sintéticas derivadas de 1-naftaldeído e 2-naftaldeído sobre linhagens de células de leucemias agudas humanas. 2013. 144 p. (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MAJNO, G.; JORIS, I. *Cells, Tissues, and Disease: Principles of General Pathology*. New York: Oxford University Press, Inc., 2004.

MALUF, S. W. et al. **Citogenética humana**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 334p.

MALUMBRES, M.; BARBACIA, M. Cell cycle, CDK's and câncer: a changing paradigma. **Nature review**, v. 9, p. 153-166, 2009.

MARTINS, L.M., KOTTKE, T., MESNER, P.W., BASI, G.S., SINHA, S., FRIGON, N. JR., TATAR, E., TUNG, J.S., BRYANT, K., TAKAHASHI, A., SVINGEN, P.A., MADDEN, B.J., MCCORMICK, D.J., EARNSHAW, W.C., KAUFMANN, S.H. Activation of multiple interleukin-1beta converting enzyme homologues in cytosol and nuclei of HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p.7421-7430, 1997.

MCHUGH, P. J.; SPANSWICK, V. J.; HARTLEY, J. A. Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. **The Lancet Oncology**, v. 2, n. 8, p. 483-490, 2001.

MELET, A.; SONG, K.; BUCUR, O.; JAGANI, Z.; GRASSIAN, A. R.; KHOSRAVI-FAR, R. Apoptotic pathways in tumor progression and therapy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 615, p. 47-79, 2008.

MIN, Y. H.; LEE, S.; LEE, J. W.; CHONG, S. Y.; HAHN, J. S.; KO, Y. W. Expression of FAS antigen in acute myeloid leukaemia is associated

with therapeutic response to chemotherapy. **British Journal of Haematology**, v. 93, n. 4, p. 928-930, 1996.

MITA, M. M.; MITA, A. C.; TOLCHER, A. W. Apoptosis: mechanisms and implications for cancer therapeutics. **Targeted Oncology**, v. 1, n. 4, p. 197-214, 2006.

MOCAN, T.; Hemolysis as Expression of Nanoparticles-Induced Cytotoxicity in Red Blood Cells. **Biotechnology, Molecular Biology and Nanomedicine**, v. 1, n. 1, 2013.

MOLINARI, M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. **Cell Proliferation**, v. 33, p.261-274, 2000.

MOORMAN, A. V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 101, n. 4, p.407- 416, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MÓTYÁN, G.; ZUPKÓ, I.; MINORICS, R.; SCHNEIDER, G.; WÖLFLING, J.; FRANK, É. Lewis acid-induced intramolecular access to novel steroidal ring D-condensed arylpyrazolines exerting in vitro cell-growth-inhibitory effects. **Molecular Diversity**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.511-527, 2015.

MULLIGHAN, C.H. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leucemia. **Hematology**, n. 1, p. 389-396, 2012.

MUMTAZ, A.; SAEED, A.; MAALIK, A.; KHAN, W.; AZHAR, S.; FATIMA, N.; ZAIDI, A.; ATIF, M. Synthesis, characterization, antimicrobial and phytotoxic screening of 1- aroyl-3,5-diarylpyrazoline derivatives. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 72, n. 5, p.937-941, 2015.

MUNEERA, M. S.; JOSEPH, J. Design, synthesis, structural elucidation, pharmacological evaluation of metal complexes with pyrazoline derivatives. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 163, p.57-68, out. 2016.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. What Is Cancer? About Cancer, S.I., 2015. Disponível em: < <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer> >. Acesso em: 01 abr. 2018.

NICHOLSON, Donald W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, [s.l.], v. 407, n. 6805, p.810-816, out. 2000.

NIELSEN, S.F.; BOESEN, T., LARSEN, M., SCHONNING, K., KROMANN, H Antibacterial chalcones-bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 3047-3054, 2004.

O'DRISCOLL, M.; JEGGO, P. A. The role of double-strand break repair — insights from human genetics. **Nature Reviews Genetics**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.45-54, 2006.

OLIVEIRA, M. E. I. M. Avaliação do efeito citotóxico de piranonaftoquinonas inibidoras de DNA topoisomerasas sobre células de leucemia. 2015. 85f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2015.

ONUBR (Brasil). Casos de câncer devem aumentar 70% até 2038, calcula OMS. 2018. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/casos-de-cancer-devem-aumentar-70-ate-2038-calcula-oms/>>. Acesso em: 06 fev. 2018.

OW, Y. L. P.; GREEN, D. R.; HAO, Z.; MAK, T. W. Cytochrome c : functions beyond respiration. **Cancer**, v. 9, p. 532-542, 2008.

PATHMANATHAN, N.; BALLEINE, R. L. Ki67 and proliferation in breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 66, n. 6, p. 512-6, 2013.

PEPPONI, R.; MARRA, G.; FUGGETTA, M. P.; FALCINELLI, S.; PAGANI, E.; BONMASSAR, E.; JIRICNY, J.; D'ATRI, S. The effect of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and mismatch repair activities on the sensitivity of human melanoma cells to temozolomide, 1, 3-bis(2-chloroethyl)1-nitrosourea, and cisplatin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 304, n. 2, p. 661-668, 2003.

- PERLMAN, H. et al. An elevated bax/bcl-2 ratio corresponds with the onset of prostate epithelial cell apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 6, n. 1, p. 48-54, 1999.
- PETER, M. E.; KRAMMER, P. H. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, n. 5, p. 545-51, 1998.
- PETERS, C.; BROWN, S. Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. **Bioscience Reports**, v. 35, n. 4, 2015.
- POKHAREL, M. Leukemia : A Review Article. **International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics**, [s.l.], v. 1, n. 4, p. 397-407. 2012.
- POPESCU, R.C.; ANDRONESCU, E.; VASILE, B.S.; TRUSCA, R.; BOLDEIU, A.; MOGOANTA, L.; MOGOSANU, G.D.; TEMELIE, M.; RADU, M.; GRUMEZESCU, A.M.; SAVU, D. Fabrication and Cytotoxicity of Gemcitabine-Functionalized Magnetite Nanoparticles. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1080-1090, 2017.
- PUGAZHENDHI, A.; EDISON, T. N. J. I.; KARUPPUSAMY, I.; KATHIRVEL, B. Inorganic nanoparticles: A potential cancer therapy for human welfare. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 539, n. 1-2, p.104-111, 2018.
- PUI, C. H. Acute lymphoblastic leukemia: introduction. **Seminars in Hematology**, v.46, n.1, p.1-2, 2009.
- PUI , C. H.; EVANS , W. E. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 2, p. 166-178, 2006.
- PULTE, D., GONDOS, A., BRENNER, H. Improvement in survival in younger patients with acute lymphoblastic leukemia from the 1980 to the early 21st century. **Blood**, v. 113, p. 1408–1411, 2009
- PUTIN, E.; ASADULAEV, A.; VANHAELEN, Q.; IVANENKOV, Y.; ALADINSKAYA, A. V.; ALIPER, A.; ZHAVORONKOV. A. Adversarial Threshold Neural Computer for Molecular de Novo Design. **Molecular Pharmaceutics**, [s.l.], p.1-12, 2018.

QI, X.; READY, J. M. Copper-promoted cycloaddition of diazocarbonyl compounds and acetylides. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, p. 3242–3244, 2007.

RAMÍREZ-PRADA, J.; ROBLEDO, S. M.; VÉLEZ, I. D.; CRESPO, M. D. P.; QUIROGA, J.; ABONIA, R.; MONTOYA, A.; SVETAZ, L.; ZACCHINO, S.; INSUASTY, B. Synthesis of novel quinoline-based 4,5-dihydro-1 H -pyrazoles as potential anticancer, antifungal, antibacterial and antiprotozoal agents. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 131, p.237-254, 2017.

RANG, H. P.; DALE. M. M. *Farmacologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.

RENVOIZÉ, C.; BIOLA, A.; PALLARDY, M.; BRÉARD, J. Apoptosis: identification of dying cells. **Cell biology and toxicology**, v. 14, n. 2, p. 111-120, 1998.

ROBAK, T.; WIERZBOWSKA, A. Current and Emerging Therapies for Acute Myeloid Leukemia. **Clinical Therapeutics**, v. 31, p. 2349-2370, 2009.

RÖDER, A.; TRAUZOLD, A.; KALTHOFF, A. Impact of death receptor signaling on the malignancy of pancreatic ductal adenocarcinoma. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 6-7, p. 450-455, 2011.

ROSE-INMAN, H.; KUEHL, D. Acute leukemia. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 32, n. 3, p. 579-96, 2014.

RUBNITZ, J. E. Childhood acute myeloid leukemia. **Current Treatment Options in Oncology**, v.9, n.1, p.95-105, 2008.

RUMJANEK, V. M.; TRINDADE, G. S.; WAGNER-SOUZA, K.; OLIVEIRA, M. C.; MARQUES-SANTOS, L. F.; MAIA, R. C.; CAPELLA, M. A. Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 73, p. 57–69, 2001.

SAHAI, T.; HENRICH, K.; REFAAI, M.; HEAL, J. M.; KIRKLEY, S. A.; SCHMIDT, A. E.; MENGLER, J. H.; MASEL, D.; LIESVELD, J.;

AQUINA, C.; BLUMBERG, N. ABO identical and washed blood transfusions as candidate strategies to reduce early mortality in acute promyelocytic leukemia. **Leukemia Research**, [s.l.], v. 62, p.1-3, 2017

SALUM, L.; ALTEI, W. F.; CHIARADIA, L. D.; CORDEIRO, M. N.; CANEVAROLO, R. R.; MELO, C. P.; WINTER, E.; MATTEI, B.; DAGHESTANI, H. N.; SANTOS-SILVA, M. C.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; YUNES, R. A.; YUNES, J. A.; ANDRICOPULO, A. D.; DAY, B. W.; NUNES, R. J.; VOGT, A. Cytotoxic 3,4,5-trimethoxychalcones as mitotic arresters and cell migration inhibitors. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 63, p.501-510, 2013.

SALUM, L. B.; MASCARELLO, A.; CANEVAROLO, R. R.; ALTEI, W. F.; LARANJEIRA, A. B.; NEUENFELDT, P. D.; STUMPF, T. R.; CHIARADIA-DELATORRE, L. D.; VOLLMER, L. L.; DAGHESTANI, H. N.; DE SOUZA MELO, C. P.; SILVEIRA, A. B.; LEAL, P. C.; FREDERICO, M. J.; DO NASCIMENTO, L. F.; SANTOS, A. R.; ANDRICOPULO, A. D.; DAY, B. W.; YUNES, R. A.; VOGT, A.; YUNES, J. A.; NUNES, R. J. N-(10 -naphthyl)-3,4,5-trimethoxybenzohydrazide as microtubule destabilizer: Synthesis, cytotoxicity, inhibition of cell migration and in vivo activity against acute lymphoblastic leukemia. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 96, p. 504-518, 2015.

SAMPAIO, S. A.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 3.ed. São Paulo, Brasil: Artes Médicas Editora; 2008.

SANTOS-BUBNIAK, L.; GASPAR, P. C.; DE MORAES, A. C. R.; BIGOLIN, A.; DE SOUZA, R. K.; BUZZI, F. C.; CORREA, R.; FILHO, V. C.; BRETANHA, L. C.; MICKE, G. A.; NUNES, R. J.; SANTOS-SILVA, M. C. Effects of 1,3,5-triphenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives on cell-cycle and apoptosis in human acute leukemia cell lines. **Canadian Journal Of Physiology And Pharmacology**, [s.l.], v. 95, n. 5, p.548-563, 2017.

SAULTZ, J. N.; GARZON, R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 5, n. 3, 2016.

SAYGIN, C.; CARRAWAY, H. E. Emerging therapies for acute myeloid leukemia. **Journal Of Hematology & Oncology**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.1-14, 18 abr. 2017.

SCHWARTZ, G. K.; SHAH, M. Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 36, p. 9408-9421, 2005.

SEVRIOUKOVA, I. F. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, 2545-7259, 2011.

SHAH, M.; AGARWAL, B. Recent advances in management of acute myeloid leukemia (AML). **Indian Journal of Pediatrics**, v.75, n.8, p.831-837, 2008.

SHAMSUZZAMAN; KHANAM, H.; MASHRAI, A.; SHERWANI, A.; OWASIS, M.; SIDDIQUI, N. Synthesis and anti-tumor evaluation of B-ring substituted steroidal pyrazoline derivatives. **Steroids**, v. 78, n. 12-13, p.1263-1272, 2013.

SHAN, Z.; LIANG, Z.; CHU-LAN, X.; LIU-GEN, G.; TING, X.; HAO, S.; RONG, Y.; LIU, L.; BEI-ZHONG, L. Shikonin suppresses proliferation and induces apoptosis in human leukemia NB4 cells through modulation of MAPKs and c-Myc. **Molecular Medicine Reports**, [s.l.], v. 16, n. 3, p.3055-3060, 2017.

SHEIKHBAHAEI, F.; KHAZAEI, M.; NEMATOLLAHI-MAHANI, S. N. Teucrium polium Extract Enhances the Anti-Angiogenesis Effect of Tranilast on Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.131-139, 2018

SHERIDAN, C.; DELIVANI, P.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Baxor Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. **Molecular cell**, v. 31, n. 4, p. 570-585, 2008.

SHIN, S. Y.; AHN, S.; YOON, H.; JUNG, H.; JUNG, Y.; KOH, D.; LEE, Y. H.; LIM, Y. Colorectal anticancer activities of polymethoxylated 3-naphthyl-5-phenylpyrazolinecarbothioamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 17, p.4301- 4309, 2016.

SIEGEL, S. E.; STOK, W.; JOHNSON, R. H.; ADVANI, A.; MUFFLY, L.; DOUER, D.; REED, D.; LEWIS, M.; FREYER, D. R.; SHAH, B.; LUGER, S.; HAYES-LATTIN, B.; JABOIN, J. J.; COCCIA, P. F.; DE ANGELO, D. J.; SEIBEL, N.; BLEYER, A. Pediatric-Inspired Treatment Regimens for Adolescents and Young Adults With Philadelphia Chromosome–Negative Acute Lymphoblastic Leukemia. **Jama Oncology**, [s.l.], 2018.

SILVA, C. P.; COSTA, T. R.; PAIVA, R. M. A.; CINTRA, A. C. O.; MENALDO, D. L.; ANTUNES, L. M. G.; SAMPAIO, S. V. Antitumor potential of the myotoxin BthTX-I from *Bothrops jararacussu* snake venom: evaluation of cell cycle alterations and death mechanisms induced in tumor cell lines. **Journal Of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.44-53, 2015.

SILVA, I. T. D. AVALIAÇÃO DA AÇÃO CITOTÓXICA E ANTITUMORAL DE CUCURBITACINAS NATURAIS E DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS. 2013. 229 (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SIVAGNANAM, U.; PALANIRAJAN, S. K.; GUMMADI, S. N. The role of human phospholipid scramblases in apoptosis: An overview. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Cell Research*, [s.l.], v. 1864, n. 12, p.2261-2271, 2017.

SIVEEN, K. S.; SIKKA, S.; SURANA, R.; DAI, X.; ZHANG, J.; KUMAR, A. P.; TAN, B. K.; SETHI, G.; BISHAYEE, A. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1845, n. 2, p. 136-54, 2014.

SLOWING, I. I.; WU, C. W., VIVERO-ESCOTO, J. L; LIN, V. S. Mesoporous Silica Nanoparticles for Reducing Hemolytic Activity Towards Mammalian Red Blood Cells. **Small**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.57-62, 2009.

SMART, D. J.; HALICKA, H. D.; SCHMUCK, G.; TRAGANOS, F.; DARZYNKIEWICZ, Z.; WILLIAMS, G. M. Assessment of DNA double-strand breaks and γ H2AX induced by the topoisomerase II poisons etoposide and mitoxantrone. *Mutation Research/fundamental*

And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis, [s.l.], v. 641, n. 1-2, p.43-47, 2008.

SPEIRS, C. K.; HWANG, M.; KIM, S.; LI, W.; CHANG, S.; VARKI, V.; MITCHELL, L.; SCHLEICHER, S.; LU, B. Harnessing the cell death pathway for targeted cancer treatment. **American Journal of Cancer Research**, v. 1, n. 1, p. 43-61, 2011.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test): A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. **Dna Repair Protocols**, [s.l.], p.203-212, 1999.

STEWART, B. W.; WILD, C. P., editors. **World Cancer Report 2014**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2014.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J. (Eds): **WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues** (Revised 4th edition). IARC: Lyon 2017.

SYKES, D. B. ; HAYNES, M. K. ; WALLER, A. ; GARCIA, M. ; URSU, O. ; GOUVEIA, K. E. ; SKLAR, L. ; LEWIS, T. A. ; DANDAPANI, S. ; MUNOZ, B. ; SCADDEN, D. T. ; PALMER, M. ; SCHREIBER, S. L. Discovering Small Molecules that Overcome Differentiation Arrest in Acute Myeloid Leukemia. Probe Reports From The Nih Molecular Libraries Program. Bethesda (Md): National Center For Biotechnology Information, 2015.

TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 9, p. 621-32, 2010.

TAJ, T.; KAMBLE, R. R.; GIREESH, T. M.; HUNNUR, R. K.; MARGANKOP, S. B. One-pot synthesis of pyrazoline derivatised carbazoles as antitubercular, anticancer agents, their DNA cleavage and antioxidant activities. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 46, n. 9, p.4366-4373, 2011.

TARN, W. Y.; LAI, M. C. TRANSLATIONAL CONTROL OF CYCLINS. CELL DIVISION, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2011.

TESSMANN, J. W.; BUSS, J.; BEGNINI, K. R.; BERNEIRA, L. M.; PAULA, F. R.; DE PEREIRA, C. M. P.; COLLARES, T.; SEIXAS, F. K. Antitumor potential of 1-thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-1 H - pyrazoles in human bladder cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 94, p.37-46, 2017.

VAN DE LOOSDRECHT, A. A.; NENE, E.; OSSENKOPPELE, G. J.; BEELEN, R. H. J.; LANGENHUIJSE, M. M. A. C. Cell Mediated Cytotoxicity Against U937 Cells by Human Monocytes and Macrophages in a Modified Molorimetric MTT Assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 141, p. 15-22, 1991.

VANDE WALLE, L.; LAMKANFI, M.; VANDENABEELE, P. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. **Cell Death & Differentiation**, v. 15, 453-60, 2008.

VEBER, D. F.; JOHNSON, S. R.; CHENG, H. Y.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; KOPPLE, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 2615- 2623, 2002.

VOGEL, A. I. **Vogel's Textbook of Pratical Organic Chemistry**, 5 ed. New York: John Wiley & Sons, 1989. p.1017.

WANG, H.; ZHENG, J.; XU, W.; CHEN, C.; WEI, D.; NI, W.; PAN, Y. A New Series of Cytotoxic Pyrazoline Derivatives as Potential Anticancer Agents that Induce Cell Cycle Arrest and Apoptosis. **Molecules**, [s.l.], v. 22, n. 12, p.1635-1645, 2017.

WICKMAN, G.; JULIAN, L.; OLSON, M F. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 5, p.735-742, 2012.

WILDES, T. M.; FARRINGTON, L.; YEUNG, C.; HARRINGTON, A. M.; FOYIL, K. V.; LIU, J.; KREISEL, F.; BARTLETT, N. L.; FENSKE, T. S. Rituximab is associated with improved survival in Burkitt lymphoma: a retrospective analysis from two 127 US academic medical centers. **Therapeutic Advances in Hematology**, v. 5, n. 1, p. 3- 12, 2014.

WIMAN, K. G. Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient. **Oncogene**, [s.l.], v. 29, n. 30, p.4245-4252, 2010.

WINTER, S. S. Pediatric Acute Leukemia Therapies Informed by Molecular Analysis of High-Risk Disease. *Hematology*, v. 2011, n. 1, p. 366-373, 2011.

WYLLIE, A. H.. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, [s.l.], v. 284, n. 5756, p.555-556, 1980.

WYLLIE, A. H. “ here, O Death, Is Thy Sting?” A Brief Review of Apoptosis Biology. *Molecular Neurobiology*, v. 42, n. 1, p.4-9, 2010.

YADAV, V.; VARSHNEV, P.; SULTANA, S.; YADAV, J.; SAINI, N. Moxifloxacin and ciprofloxacin induces S-phase arrest and augments apoptotic effects of cisplatin in human pancreatic cancer cells via ERK activation. *BMC Cancer*, v. 581, 2015.

YANG, J.; RAMNATH, N.; MOYSICH, K. B.; ASCH, H. L.; SWEDE, H.; ALRAWI, S. J.; HUBERMAN, J.; GERADTS, J.; BROOKS, J. S. J.; TAN, D. Prognostic significance of MCM2, Ki-67 and gelsolin in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2006.

YANG, J.; TAN, D.; ASCH, H. L.; SWEDE, H.; BEPLER, G.; GERADTS, J.; MOYSICH, K. B. Prognostic significance of gelsolin expression level and variability in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, v. 46, 2004.

YAN, S. An early history of human breast cancer: West meets East. *Chinese Journal Of Cancer*, [s.l.], v. 32, n. 9, p.475-477, 5 2013..

YOULE, R. J.; STRASSER, A. The Bcl-2 Protein Family: Opposing Activities that Mediate Cell Death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 9, p. 47- 59, 2008.

YUAN, S.; AKEY, C. W. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure*, v. 21, p. 501-15, 2013.

YU, M.; YANG, H.; WU, K.; JI, Y.; JU, L.; LU, X. Novel pyrazoline derivatives as bi-inhibitor of COX-2 and B-Raf in treating cervical

carcinoma. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, [s.l.], v. 22, n. 15, p.4109-4118, 2014.

ZAFFARONI, N.; PENNATI, M.; DAIDONE, M. G. Survivin as a target for new anticancer interventions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. v. 9, p. 360-372, 2005.

ZAIDI, M. R.; DAY, C.; MERLINO, G. From UVs to Metastases: Modeling Melanoma Initiation and Progression in the Mouse. *Journal Of Investigative Dermatology*, [s.l.], v. 128, n. 10, p.2381-2391, 2008.

ZHANG, N.; YU, Z.; YANG, X.; HU, P.; HE, Y. Synthesis of novel ring-contracted artemisinin dimers with potent anticancer activities. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, [s.l.], v. 150, p.829-840, 2018.

ZILFOU, J. T.; LOWE, S. W. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 1, n. 5, p. 1-12, 2009.

ZONG, W. X.; Thompson, C. B. Necrotic death as a cell fate. *Genes & Development*. v. 20, n. 1, p.1-15, 2006.

ZOU, H.; HENZEL, W. J.; LIU, X.; LUTSCHG, A.; WANG, X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, v. 90, p. 405-413, 1997.

ZSOLDOS-MÁDY, V.; CSÁMPAI, A.; SZABÓ, R.; MÉSZÁROS-ALAPI, E.; PÁSZTOR, J.; HUDECZ, F.; SOHÁR, P. Synthesis, Structure, and in vitro Antitumor Activity of Some Glycoside Derivatives of Ferrocenyl-Chalcones and Ferrocenyl-Pyrazolines. *ChemMedChem*, [s.l.], v. 1, n. 10, p.1119-1125, 2006.

APÊNDICE 1: Produções científicas durante o período do mestrado (artigos publicados)



Biochimie

Volume 140, September 2017, Pages 48-57



Research paper

Cytotoxic effect of a novel naphthylchalcone against multiple cancer cells focusing on hematologic malignancies

Mariana Franzoni Maioral ^{a, b}, Camila do Nascimento Bodack ^a, Natália Marcelli Stefanos ^{a, b}, Álisson Bigolin ^{a, b}, Alessandra Mascarello ^c, Louise Domeneghini Chiaradia-Delatorre ^c, Rosendo Augusto Yunes ^c, Ricardo José Nunes ^c, Maria Cláudia Santos-Silva ^{a, b}, 

 [Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.06.004>

[Get rights and content](#)

Highlights

- **A23** was cytotoxic against 12 tumor cell lines and had no effect on normal cells.
- **A23** induced apoptosis by triggering both the intrinsic and the extrinsic pathways.
- **A23** seems to have a synergic effect with the drugs cytarabine and vincristine.

Abstract

Chalcones are natural compounds described in the literature by its several properties including cytotoxic activity against several tumor types. Considering that the search for new chemotherapeutic agents is still necessary, the aim of this study was to investigate the cytotoxic mechanisms involved in cell death induced by a synthetic chalcone (**A23**) on different tumor cells. Chalcone **A23** reduced the cell viability of twelve tumor cell lines in a concentration and time dependent manner and it was more cytotoxic against acute leukemia cells. Interestingly, the compound was non cytotoxic to normal cells and non-hemolytic to normal red blood cells. Chalcone **A23** decreased the expression of cell proliferation marker KI-67 and blocked the G2/M phase in both K562 and Jurkat cell lines. Cells treated with **A23** showed morphological features suggestive of apoptosis, the "ladder pattern" in agarose gel, the externalization of phosphatidylserine and caspase-3 and PARP cleavage. Chalcone **A23** significantly reduced the mitochondrial membrane potential, decreased the expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and survivin and increased the expression of pro-apoptotic protein Bax, confirming the involvement of the intrinsic pathway. The increased mitochondrial permeability resulted in the release of AIF, cytochrome c and endonuclease G from the mitochondria to the cytosol. In addition, chalcone **A23** increased the expression of FasR and induced Bid cleavage, showing the involvement of the extrinsic pathway. Finally, chalcone **A23** seems to have a synergic effect with the chemotherapy drugs cytarabine and vincristine. These results suggest that **A23** is an interesting compound with strong and selective anti-tumor activity.

APÊNDICE 2: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da expressão de marcadores celulares em indivíduos adultos saudáveis para auxílio no diagnóstico de hemopatias

Pesquisador: Maria Cláudia Santos da Silva

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 22406413.5.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 746.486

Data da Relatoria: 11/08/2014

Apresentação do Projeto:

"Análise da expressão de marcadores celulares em indivíduos adultos saudáveis para auxílio no diagnóstico de hemopatias". Projeto que visa criar um banco de imagens de referência com fins de comparação diagnóstica em doenças hematológicas, a partir de indivíduos considerados saudáveis, a fim de estudar as doenças possíveis de serem diagnosticadas pela citometria de fluxo que resulta de uma mutação somática adquirida no gene PIG-A localizado no braço curto do cromossomo X (Xp22.1), relacionado à biossíntese de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), um fosfolípide acrescentado a determinadas proteínas logo após a sua tradução, para fixa-las à parte externa da membrana celular, como uma âncora de proteínas de superfície.

Objetivo da Pesquisa:

Criação de um banco de imagens de referência com fins de comparação diagnóstica em doenças hematológicas, a partir de indivíduos considerados saudáveis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores não existem riscos, pois não haverá duas coletas, será aproveitado o mesmo sangue colhido para os exames laboratoriais realizados na amostra para a doação de sangue, desta forma não há nenhum desconforto adicional.

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-900
UF: SC **Município:** FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-9096 **E-mail:** oep@reitoria.ufsc.br

Continuação do Parecer: 746,486

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata o presente de um projeto de pesquisa coordenado pela Pro^{fa}. Dr^a. Maria Cláudia Santos da Silva do Departamento de Análises Clínicas da UFSC e tem como objetivo criar um banco de imagens de referência com fins de comparação diagnóstica em doenças hematológicas, a partir de indivíduos considerados realizarem a coleta da amostra de sangue periférico, os doadores serão examinados e entrevistados por um profissional da saúde. No exame físico, os doadores serão avaliados quanto à temperatura corporal, o peso, a altura, a pressão arterial, o pulso e a quantificação de hemoglobina capilar. A entrevista será realizada de acordo com os parâmetros para a seleção dos doadores estabelecidos pelo Ministério da Saúde pela Portaria MS nº 1.353 de 13 de junho de 2011 e pela Resolução RDC nº 57 de 16 de dezembro de 2010. O projeto se encontra devidamente instruído, documentação completa e TCLE adequado aos participantes, estando portanto de acordo com a Resolução CNS nº466/12 e normas complementares. Assim, recomendamos a sua aprovação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentação completa.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram detectadas pendências ou inadequações neste projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9208 Fax: (48)3721-9696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 746.486

FLORIANOPOLIS, 11 de Agosto de 2014

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-900
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9208 **Fax:** (48)3721-9096 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br