



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIENCIA DA SAUDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Lisandra de Oliveira Silva

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS CITOTÓXICOS INDUZIDOS PELOS
COMPOSTOS SINTÉTICOS INÉDITOS DERIVADOS DA IMIDAZOPIRIDINAS,
DO ÁCIDO CINÂMICO E DO COMPOSTO NATURAL ISOLADO DA ALGA
Desmarestia menziesii SOBRE CÉLULAS DE LINFOMA DE BURKITT.**

Florianópolis
2021

Lisandra de Oliveira Silva

Avaliação dos mecanismos citotóxicos induzidos pelos compostos sintéticos inéditos derivados da imidazopiridinas, do ácido cinâmico e do composto natural isolado da alga *Desmarestia menziesii* sobre células de linfoma de Burkitt.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dra. Maria Cláudia Santos da Silva

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra

Silva, Lisandra de Oliveira

Avaliação dos mecanismos citotóxicos induzidos pelos compostos sintéticos inéditos derivados da imidazopiridinas, do ácido cinâmico e do composto natural isolado da alga *Desmarestia menziesii* sobre células de linfoma de Burkitt. / Lisandra de Oliveira Silva ; orientador, Maria Cláudia Santos Silva, 2021.

115 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Linfoma de Burkitt. 3. Citotoxicidade. 4. Apoptose. I. Silva, Maria Cláudia Santos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia. III. Título.

Lisandra de Oliveira Silva

Avaliação dos mecanismos citotóxicos induzidos pelos compostos sintéticos inéditos derivados da imidazopiridinas, do ácido cinâmico e do composto natural isolado da alga *Desmarestia menziesii* sobre células de linfoma de Burkitt.

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Ana Carolina Rabello de Moraes, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Iara Fabrícia Kretzer, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Izabella Thaís da Silva, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmácia.

Prof.^a Dra. Thaís Cristine Marques Sincero
Coordenadora do Programa

Prof.^a Dra. Maria Cláudia Santos da Silva
Orientadora

Florianópolis, 17 de Setembro de 2021.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, **Rosana e João**, por todo apoio e por nunca medirem seus esforços para eu pudesse alcançar os meus sonhos. Por sonharem junto comigo, e por todo amor e paciência nessa caminhada. Agradeço também à minha irmã por todo apoio e carinho.

Em seguida, gostaria de agradecer a três pessoas muito importantes que me inspiram e que me ajudaram no meu crescimento profissional e pessoal. Primeiramente, a minha orientadora, **Prof.^a Maria Cláudia**, por todo apoio, confiança e incentivo. Que, desde o primeiro contato, me mostrou o mundo maravilhoso da hematologia e, com todo seu amor e entusiasmo, me contagiou e contagia todos os dias. Por me instigar e por acreditar em mim. Em segundo lugar, a **Laura**, que além da amizade, não mediu esforços para passar o seu conhecimento, seja com os experimentos do laboratório, seja com um conselho, um abraço ou uma palavra de consolo. Não poderia pedir pessoa melhor para estar sempre ao meu lado. E em terceiro lugar, a **Iris**, que fez eu me apaixonar pela citometria de fluxo e me mostrou esse mundo maravilhoso da pesquisa. Vocês três são um espelho e fazem-me querer sempre dar o meu melhor, que um dia eu possa me tornar uma profissional tão competente como vocês são.

Agradeço a todas as amigas(os) que LOEH me proporcionou, **Amanda, Bruna, Daniela, Mariana, Natalia, Ana Gabriela, Chandra, Heloisa, Tanara, Victória, Rafaela, Camila, Carolina C., Douglas, Cristiane, Carine**. Vocês fazem o meu dia melhor. Por todas as risadas e trocas de experiências. Por me fazerem eu me sentir em casa e, assim, tornar o laboratório um dos lugares que eu mais amo estar.

Aos meus amigos(as) **Lilian, Ana Claudia, Rafael, Marina, Maria Izabel, Marihá, Carolina C., Filipe, Marcos e Fernando** por cada palavra amiga, cada incentivo e por todas as risadas.

Agradeço à **Prof.^a Miriam de Barcelos Falkemberg** (UFSC) e ao **Prof. Ricardo Ferreira Affeldt** (UFSC) e à **Dr.^a Helena D. de Salles** que gentilmente disponibilizaram os compostos utilizados neste trabalho.

A banca examinadora que gentilmente aceitou ler o meu trabalho, à **Prof.^a Ana Carolina Rabelo de Moraes**, à **Prof.^a Iara Fabricia Kretzer** e à **Prof.^a Izabella Thaís da Silva**.

Agradeço ao **PGFAR**, ao **CNPQ** e à **CAPES** por me auxiliarem neste mestrado, por incentivarem e acreditarem na pesquisa.

Por fim, agradeço a cada pessoa que foi importante para a minha formação e que contribuiu de alguma forma para a realização deste trabalho. Vocês fizeram a diferença, muito obrigada!

RESUMO

O linfoma de Burkitt (LB) é uma neoplasia linfoide de células B maduras do centro germinativo. Devido à agressividade dessa neoplasia, o tratamento deve ser iniciado rapidamente, a fim de evitar o acometimento do sistema nervoso central (SNC). Apesar da inovação na indústria farmacêutica, essa doença possui altas taxas de recidiva e mortalidade. Assim, este estudo objetivou avaliar o efeito citotóxico de novos produtos de origem sintética e natural sobre células de linhagem de LB, além de investigar seus principais mecanismos de morte celular. Inicialmente, foi avaliado o efeito citotóxico de 19 compostos (18 sintéticos e um composto natural) sobre células Daudi pelo método do Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). Os compostos DSH65 e AP12 apresentaram maior citotoxicidade e, por isso, foram selecionados para dar continuidade ao estudo; que se iniciou com as curvas de tempos e concentrações respostas para a obtenção das concentrações inibitórias de 50 % (CI₅₀). O DSH65 apresentou CI₅₀ de 50,14 ± 3,14 μM, 17,62 ± 0,87 μM e 13,12 ± 0,71 μM em 24, 48 e 72 h, respectivamente. Já o composto AP12 apresentou CI₅₀ de 51,86 ± 2,22 μM, 33,88 ± 1,86 μM e 15,13 ± 0,89 μM em 24, 48 e 72 h, respectivamente. Em seguida, os compostos foram avaliados em células mononucleares (CM), em que foi observada para o composto DSH65 a CI₅₀ de 24h de 74,08 ± 1,62 μM e para o composto AP12 CI₅₀ de 24 h de 130,9 ± 2,95 μM. Foi avaliada a capacidade hemolítica dos compostos em até 10x a CI₅₀ de 48 h dos mesmos e não foi observada hemólise significativa. A morte celular causada por apoptose após incubação com os compostos DSH65 e AP12 foi confirmada por meio da morfologia celular e por citometria de fluxo pela identificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina. Os resultados apresentados para os compostos DSH65 e AP12 mostraram que o mecanismo de ação envolve a apoptose intrínseca, pois houve aumento da relação Bax/Bcl-2, perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) e ativação de caspase-3. A incubação com o composto DSH65 também diminuiu a expressão da proteína de resistência survivina e do marcador de proliferação celular Ki-67. Ambos os compostos aumentaram a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A partir do conjunto de resultados apresentados, sugere-se que ambos os compostos são bons candidatos para desenvolvimento de novos fármacos contra o LB.

Palavras-chave: Linfoma de Burkitt. Citotoxicidade. Apoptose. EROs. Imidazopiridina. Quinona.

**EVALUATION OF CYTOTOXIC MECHANISMS INDUCED BY NOVEL
SYNTHETIC COMPOUNDS DERIVED FROM IMIDAZOPYRIDINES, CINNAMIC
ACID AND NATURAL COMPOUND ISOLATED FROM THE ALGA *Desmarestia
menziesii* ON BURKITT'S LYMPHOMA CELLS**

Burkitt lymphoma (BL) is a germinal center-derived B-cell neoplasm. Due to the aggressiveness of this neoplasm, treatment must be started rapidly, in order to avoid CNS involvement. Although innovation in the pharmaceutical industry, the disease still has high recurrence and mortality rates. Thus, this study aimed to evaluate the cytotoxic effect of new products of synthetic and natural origin on LB lineage cells, in addition to investigating their main mechanisms of cell death. Initially, the cytotoxic effect of 19 compounds (18 synthetic and one natural compound) on Daudi cells was evaluated by the (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) method (MTT). The compounds DSH65 and AP12 showed greater cytotoxicity, and, therefore, were selected to continue the study; which began with the concentration-and-time-response curves, to obtain the 50 % inhibitory concentration IC_{50} . DSH65 presented IC_{50} of $50.14 \pm 3.14 \mu\text{M}$, $17.62 \pm 0.87 \mu\text{M}$ and $13.12 \pm 0.71 \mu\text{M}$ at 24, 48 and 72 h, respectively. The compound AP12 presented IC_{50} of $51.86 \pm 2.22 \mu\text{M}$, $33.88 \pm 1.86 \mu\text{M}$ and $15.13 \pm 0.89 \mu\text{M}$ in 24, 48 and 72 h, respectively. Then, the compounds were formulated in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), where it was observed for the compound DSH65 a 24 h IC_{50} of $74.08 \pm 1.62 \mu\text{M}$ and for the compound AP12 24 h IC_{50} of $130.9 \pm 2, 95 \mu\text{M}$. The hemolytic effect of the compounds was evaluated up to 10 x their 48 h IC_{50} and no significant hemolysis was observed. Cell death caused by apoptosis after incubation the compounds DSH65 and AP12 was confirmed through cell morphology and the externalization of phosphatidylserine residues by flow cytometry. The results presented for the compounds DSH65 and AP12 show that the mechanism of action involves with intrinsic apoptosis pathway, with an increase in the Bax/Bcl-2 ratio, loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi\text{m}$) and caspase-3 activation. Incubation with the compound DSH65 also decreased the expression of the survivin resistance protein and the cell proliferation marker Ki-67. Both compounds increased oxygen-reactive species (ROS) production. The results presented suggest that both compounds are good candidates for the development of new drugs for BL.

Keywords: Burkitt Lymphoma, Cytotoxicity, Apoptosis, ROS, Imidazopyridine, Quinone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hematopoese.....	19
Figura 2 - Maturação do linfócito B	21
Figura 3 - Estrutura química da imidazopiridina.....	26
Figura 4 - AP12 (Sargatetraol)	27
Figura 5 - Redução de quinona e processo de formação de EROS	28
Figura 6 - Ciclo celular.....	20
Figura 7 - Apoptose intrínseca.....	23
Figura 8 - Apoptose extrínseca.....	24
Figura 9 - Aumento de EROS e formação ou morte da célula neoplásica	25
Figura 10 - Estrutura dos compostos sintéticos derivados do ácido cinâmico	28
Figura 11 - Estrutura das dihidropiridinas.....	29
Figura 12 - Estrutura das imidazopiridinas.....	30
Figura 13 - Estrutura do composto de origem natural, Sargatetraol (AP12).....	31
Figura 14 - Triagem de citotoxicidade dos compostos sintéticos derivados do ácido cinâmico, da dihidropiridinas, da imidazopiridinas e hidroquinona sobre células Daudi.....	43
Figura 15 - Efeito citotóxico do composto DSH65 sobre células Daudi	43
Figura 16 - Efeito citotóxico do composto AP12 em células Daudi	44
Figura 17 - Predição <i>in silico</i> da biodisponibilidade oral do composto DSH65	45
Figura 18 - Predição <i>in silico</i> da biodisponibilidade oral do composto AP12.	46
Figura 19 - Efeito citotóxico do composto DSH65 em células mononucleares em SP.....	52
Figura 20 - Efeito citotóxico do composto AP12 em células mononucleares em sangue periférico (SP).	53
Figura 21 - Efeito do composto DSH65 sobre eritrócitos de SP.	54
Figura 22 - Efeito do composto AP12 sobre eritrócitos de SP.....	55
Figura 23 Efeito do composto DSH65 na progressão do ciclo celular das células Daudi.	56
Figura 24 - Efeito do composto AP12 na progressão do ciclo celular das células Daudi	57
Figura 25 - Alterações morfológicas induzidas pelos compostos em células Daudi.....	58
Figura 26 - Efeito dos compostos na exposição dos resíduos de fosfatidilcerina em células Daudi por meio do método da anexina-V.....	59
Figura 27 - Efeito dos compostos no $\Delta\Psi_m$ de células Daudi após 12 h e 24 h de incubação..	60
Figura 28 - Efeito dos compostos na expressão das proteínas Bax em células Daudi.	62
Figura 29 - Efeito dos compostos na expressão das proteínas Bcl-2 em células Daudi.....	63
Figura 30 - Efeito dos compostos na expressão da proteína AIF em células Daudi.	64

Figura 31 - Efeito dos compostos na expressão de FasR.	65
Figura 32 - Efeito dos compostos na expressão da caspase-3 ativada.....	66
Figura 33 - Efeito dos compostos na expressão da proteína survivina em células Daudi.	67
Figura 34 - Efeito dos compostos na expressão da proteína Ki-67 em células Daudi.	68
Figura 35 - Efeito dos compostos na formação de EROs.....	69
Figura 36 - Esquema ilustrativo do mecanismo de ação do composto DSH65 em células Daudi.	84
Figura 37 - Esquema ilustrativo do mecanismo de ação do composto AP12 em células Daudi.	85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Anticorpos usados na avaliação de proteínas relacionadas com a proliferação celular e apoptose.	40
Quadro 2 - Resultados obtidos na predição <i>in silico</i> pelo SWISStargetprediction	48
Quadro 3 - Resultados obtidos na predição <i>in silico</i> pelo SWISStargetprediction	49
Quadro 4 - Resultados obtidos na predição <i>in silico</i> pelo SWISStargetprediction	50
Quadro 5 - Resultados obtidos na predição <i>in silico</i> pelo SWISStargetprediction	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de CI_{50} calculados para as células Daudi após 24, 48 e 72 h de incubação com o composto DSH65.....	44
Tabela 2 - Valores de CI_{50} calculados nas células Daudi após 24, 48 e 72 h de incubação com o composto AP12.	45
Tabela 3 - Predição <i>in silico</i> das características físico-químicas, farmacocinéticas e farmacológicas dos compostos DSH65 e AP12.	47
Tabela 4 - Taxa de hemólise (%) provocada pelo composto DSH65 em diferentes concentrações.....	54
Tabela 5 - Taxa de hemólise (%) provocada pelo composto AP12 em diferentes concentrações.....	55
Tabela 6 - Efeito dos compostos nas diferentes fases do ciclo celular das células Daudi.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
AIF	Fator indutor de apoptose
ANOVA	Análise de variância
APAF-1	Fator indutor de apoptose 1
BE	Brometo de etídio
BCR	Receptor de célula B (do inglês, <i>B cell receptor</i>)
BH	Domínios de homologia com Bcl-2
BHE	Barreira hematoencefálica
BSA	Albumina do soro bovino
CDKs	Quinases dependentes de ciclinas
CF	Citometria de fluxo
CG	Centro germinativo
CI₅₀	Concentração inibitória de 50%
CM	Células mononucleares
CO₂	Dióxido de carbono
CYP	Citocromo P450
DAUDI	Células de linfoma de Burkitt com mutações no códon 213
DISC	Complexo sinalizador indutor de apoptose
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBV	Epstein-Barr vírus
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FasR	Receptor Fas
FDA	Do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Do inglês, <i>forward scatter</i>
HSCs	Células-tronco hematopoiéticas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IAP	Proteínas inibidoras da apoptose
IAZP	Imidazopiridina
Ig	Imunoglobulina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LA	Laranja de acridina
LB	Linfoma de Burkitt
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LNH	Linfomas não-Hodgkin
LOEH	Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MO	Medula óssea
MOMP	Permeabilização da membrana mitocondrial externa (do inglês, <i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i>)
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Do inglês, <i>natural killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde

PAINS	Do inglês, <i>pan assay interference compounds</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PE	Ficoeritrina
PercP	Complexo proteína peridina-clorofila
P-gp	Glicoproteína-P
PI	Iodeto de propídeo
PI3K	Fosfoinositol-3-quinase
PBMC	Célula mononuclear de sangue periférico (do inglês, <i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
RNase	Ribonuclease
RNM	Ressonância magnética nuclear
RPMI	Do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro fetal bovino
SDS	Docetil sulfato de sódio
SLT	Síndrome de lise tumoral
SNC	Sistema nervoso central
SP	Sangue periférico
TGI	Trato gastrointestinal
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de célula T (do inglês, <i>T cell receptor</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UTI	Unidade de terapia intensiva
WB	<i>Western Blotting</i>
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral.....	18
2.2	Objetivos Especificos.....	18
3	REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1	HEMATOPOIESE.....	19
3.2	MATURAÇÃO DE CÉLULAS B.....	20
3.3	LINFOMA DE BURKITT (LB).....	21
3.4	FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DO LB.....	22
3.5	COMPOSTOS SINTÉTICOS E NATURAIS PARA O TRATAMENTO DO LB.....	25
3.5.1	Compostos Sintéticos	25
3.5.2	Os produtos naturais	26
3.5.3	Hidroquinonas	27
3.6	CICLO CELULAR.....	18
3.7	MECANISMOS DE MORTE CELULAR.....	20
3.7.1	Apoptose Intrínseca	22
3.7.2	Apoptose Extrínseca	23
3.8	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS).....	24
4	METODOLOGIA	27
4.1	SÍNTESE E ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS.....	27
4.1.1	Compostos sintéticos	27
4.1.2	Composto de origem natural	30
4.2	PREDIÇÃO IN SILICO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS.....	31
4.3	TRIAGEM E DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CONCENTRAÇÃO E TEMPO RESPOSTA.....	32
4.4	AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO (SP).....	33
4.4.1	Avaliação do efeito citotóxico dos compostos DSH65 e AP12 em Células Mononucleares (CM) de SP	33
4.4.2	Teste de hemólise	34
4.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE O CICLO CELULAR.....	35
4.6	DETERMINAÇÃO DA INDUÇÃO DA APOPTOSE.....	36
4.6.1	Avaliação das alterações morfológicas por microscopia de fluorescência com brometo de etídio (BE) e laranja de acridina (LA)	36
4.6.2	Deteção da externalização dos resíduos de fosfatidilserina pelo método da Anexina-V-FITC por CF	37
4.7	AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_M$).....	37

4.8 AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE (KI-67, BCL-2, BAX, AIF, FASR, CASPASE3 ATIVADA E SURVIVINA).....	38
4.9 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EROS.....	40
4.10 ESTATÍSTICA.....	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SINTÉTICOS E NATURAL SOBRE CÉLULAS DE LB (DAUDI).....	42
5.1.1 Triagem de citotoxicidade dos compostos sintéticos sobre as células de linhagem de LB (Daudi).....	42
5.1.2 Efeito citotóxico do composto DSH65 sobre células linhagem de LB (Daudi).....	43
5.1.3 Efeito citotóxico do composto natural AP12 sobre células de linhagem de LB (Daudi).....	44
5.2 PREDIÇÃO IN SILICO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS.....	45
5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS DSH65 E AP12 SOBRE CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO (SP).....	51
5.3.1 Efeito citotóxico do composto DSH65 em células mononucleares em SP.....	51
5.3.2 Efeito citotóxico do composto AP12 em células mononucleares em SP.....	52
5.3.3 Avaliação do efeito hemolítico induzido pelo composto DSH65 em eritrócitos humanos.....	53
5.3.4 Avaliação do efeito hemolítico induzido pelo composto AP12 em eritrócitos humanos.....	54
5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS DSH65 e AP12 SOBRE O CICLO CELULAR.....	55
5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS DSH65 E AP12 SOBRE A APOPTOSE.....	57
5.5.1 Avaliação das alterações morfológicas por microscopia de fluorescência com BE e LA	57
5.5.2 Detecção da externalização dos resíduos de fosfatidilserina pelo método da Anexina-V-FITC por CF.....	58
5.6 AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL.....	59
5.7 AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE (KI-67, BCL-2, BAX, AIF, FasR, CASPASE3 ATIVADA E SURVIVINA).....	61
5.7.1 Investigação do efeito dos compostos sobre as proteínas da família Bcl-2 (Bax e Bcl-2).....	61
5.7.2 Investigação do efeito dos compostos sobre o fator indutor da apoptose (AIF).....	63
5.7.3 Investigação do efeito dos compostos no receptor Fas.....	64
5.7.4 Investigação do efeito dos compostos sobre a caspase-3 ativada.....	65
5.7.5 Efeito dos compostos DSH65 e AP12 sobre a proteína antiapoptótica survivina ...	66
5.7.6 Efeito dos compostos sobre a proteína Ki-67.....	67
5.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS DSH65 e AP12 NA FORMAÇÃO DE EROs.....	68

6	DISCUSSÃO	70
7	CONCLUSÃO	83
8	PERSPECTIVAS	86
	REFERENCIAS	87
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA EM SERES HUMANOS	99

1 INTRODUÇÃO

O câncer representa um grupo de doenças malignas em que é observado o crescimento desordenado de células e que pode ocorrer em diversos tecidos e órgãos. Essas células malignas se dividem rapidamente e podem invadir e se espalhar para outros órgãos do corpo, em um processo denominado metástase ou infiltração. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2020, ocorreram 19 milhões de novos casos de câncer no mundo e, devido a isso, cerca de 9,9 milhões de pessoas foram a óbito (GLOBOCAN, 2021).

No cenário brasileiro, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima-se para o triênio 2020-2022 a ocorrência de 625 mil novos casos de câncer para cada ano. Entre as diversas formas de câncer, destacam-se as neoplasias hematológicas, que são divididas em neoplasias mieloides e linfoides, dentre as quais estão incluídos as leucemias e os linfomas. Com relação às leucemias, estima-se cerca de 5.920 novos casos em homens e 4.890 novos casos em mulheres para 100.000 habitantes durante o próximo triênio (INCA, 2020).

Entre as diversas neoplasias hematológicas existentes, neste trabalho foi focado os linfomas. De forma geral, os linfomas podem ser divididos em linfomas de Hodgkin e linfomas não-Hodgkin (LNH). Os LNH incluem todos os tipos de linfomas existentes, exceto o linfoma de Hodgkin. No Brasil, os linfomas não-Hodgkin (LNH) representam um dos dez tipos de câncer mais incidentes, as estimativas para esse grupo de doenças, para o ano de 2020, são de 6.580 novos casos para homens e 5.450 novos casos para mulheres em 100.000 habitantes (INCA, 2020).

De acordo com a OMS, os LNH podem ser classificados de acordo com a sua origem em linfomas derivados de células B, T ou *natural killer* (NK). Entre os linfomas de células B, encontra-se o linfoma de Burkitt (LB), o qual se caracteriza pela proliferação clonal de células B maduras no centro germinativo dos linfonodos. Além disso, o LB é um dos linfomas mais comuns em crianças e adultos jovens e estima-se que seja responsável por 25 a 40% dos linfomas em crianças e de 1% a 2% em adultos (ISHIZAWA, 2019). Por ser uma neoplasia agressiva e com capacidade de invasão do sistema nervoso central (SNC) (SWERDLOW et al., 2017), o regime terapêutico utilizado para o tratamento de LB segue um desafio, com muitos efeitos adversos e recidivas. O tratamento de primeira linha para o LB consiste em quimioterapia e leva em consideração características fenotípicas, histológicas, idade, presença ou não de comorbidades e estágio da doença (DUNLEAVY, 2018; TOMSKA et al., 2018).

Nesse contexto, mostra-se necessária a busca por novos compostos para o tratamento dessas neoplasias. Os produtos naturais são uma fonte inesgotável para o desenvolvimento de novos fármacos. Muitos fármacos utilizados na clínica são derivados de produtos naturais e estima-se que mais de 50% do total de substâncias aprovadas de 1981 a 2014 foram oriundas de produtos naturais ou derivados, e a maior parte para o tratamento de neoplasias (MAJOLO et al., 2019; NEWMAN; CRAGG, 2016). Em relação aos produtos sintéticos, estima-se que 85% dos fármacos aplicados na clínica são compostos sintéticos e, dentro desses medicamentos, cerca de 50% apresentam pelo menos um anel aromático, que pode conter substituições (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Os anéis heterocíclicos com adição de um anel imidazol são encontrados em varias substâncias importantes, com ampla variedade de atividades biológicas, entre elas, podem ser usados como antifúngico (SAWYER et al., 1975), antineoplásico, anticonvulsivantes e antibióticos (DEVI; JANA; SINGH, 2018; KISHBAUGH, 2016). Dentre os anéis heterocíclicos com adição de piridinas, é possível destacar a imidazopiridina (IAZP), o qual também apresenta atividades biológicas como potenciais inibidores do tromboxane sintetase, agregação plaquetária, antiviral e antitumoral (SAYEED et al., 2018).

Considerando o exposto, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito citotóxico de produtos de origem natural e sintética sobre células de linhagem de LB, além de investigar seus principais mecanismos de morte celular.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito citotóxico de oito imidazopiridinas, cinco derivados do ácido cinâmico, cinco dihidropiridinas e um composto natural isolado da alga parda *Desmarestia menziesii* sobre células de LB, e investigar seus principais mecanismos envolvidos na morte celular.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Investigar o efeito citotóxico de oito imidazopiridinas, cinco derivados do ácido cinâmico, cinco dihidropiridinas e um composto natural isolado da alga parda *Desmarestia menziesii* sobre células de linhagem de LB (Daudi) e selecionar os compostos que apresentaram maior redução na viabilidade celular;
- Determinar as respostas dos compostos selecionados em relação à concentração e ao tempo de incubação e calcular as suas concentrações inibitórias de 50 % (CI₅₀) em células de linhagem LB (Daudi);
- Realizar a predição *in silico* das características físico-químicas e biológicas dos compostos que apresentaram maior redução da viabilidade celular;
- Investigar o efeito dos compostos selecionados sobre células sanguíneas mononucleadas (CM) e sobre eritrócitos de sangue periférico (SP) de indivíduos clinicamente saudáveis;
- Verificar se os compostos selecionados causam morte celular por apoptose em células Daudi;
- Analisar o efeito dos compostos selecionados sobre o ciclo celular e sobre a expressão do marcador de proliferação celular KI-67 em células de linhagem de LB Daudi;
- Avaliar se os compostos selecionados alteram o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) de células de linhagem Daudi;
- Investigar se o efeito citotóxico dos compostos selecionados sobre as células Daudi envolve a modulação das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e survivina, da proteína pró-apoptótica Bax, do receptor Fas (FasR), do fator indutor de apoptose (AIF) e caspase-3-ativada.

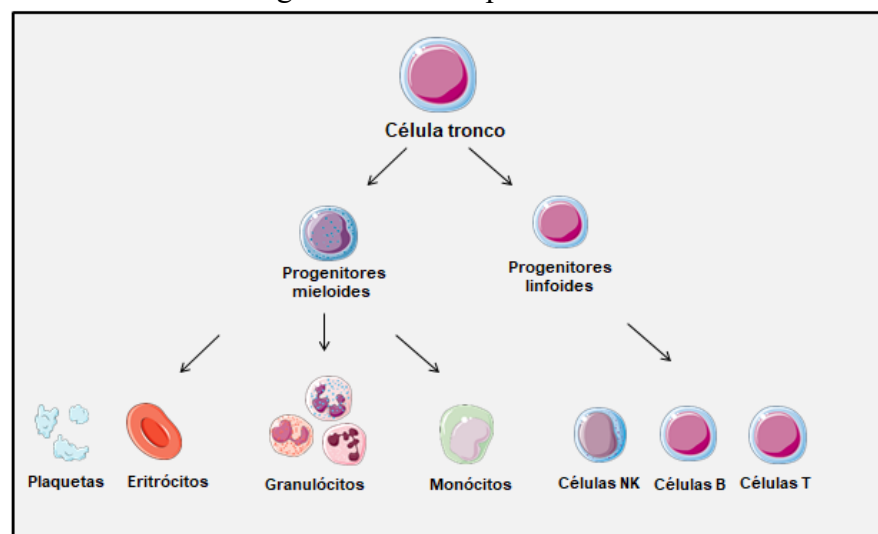
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 HEMATOPOIESE

A hematopoiese é o processo pela qual se originam as células sanguíneas. Esse processo inicia-se em poucos dias de vida no saco vitelino, seguido do baço, medula óssea (MO) e fígado (até duas semanas após o nascimento). Na infância e na vida adulta, o desenvolvimento das células ocorre na MO. A hematopoiese tem início a partir de uma célula-tronco, a qual possui capacidade de auto-renovação e pluripotencialidade e, a partir dela, ocorre a proliferação, diferenciação e maturação das células sanguíneas (HOFFBRAND; MOSS, 2017; TAICHMAN, 2005). O controle desse processo se dá por meio de interações entre fatores de crescimento, ação de citocinas na MO e elementos estromais, os quais constituem o microambiente medular, como células endoteliais, macrófagos, adipócitos, osteoblastos, fibroblastos e células sanguíneas em desenvolvimento.

As células-tronco, depois de formadas, poderão se diferenciar em células de linhagem mieloide como eritrócitos, plaquetas, monócitos/macrófagos, granulócitos e células dendríticas, e em células de linhagem linfóide que, posteriormente, se diferenciam em linfócitos B, T ou NK. As células linfóides imaturas se diferenciam em células maduras nos tecidos linfóides primários (MO e timo) e secundários (tecidos linfóides associados a mucosas, baço e gânglios) (Figura 1) (RIEGER; SCGRIEDER, 2012).

Figura 1 - Hematopoese



Desenvolvimento das células sanguíneas a partir de uma célula-tronco pluripotente. Fonte: A Autora

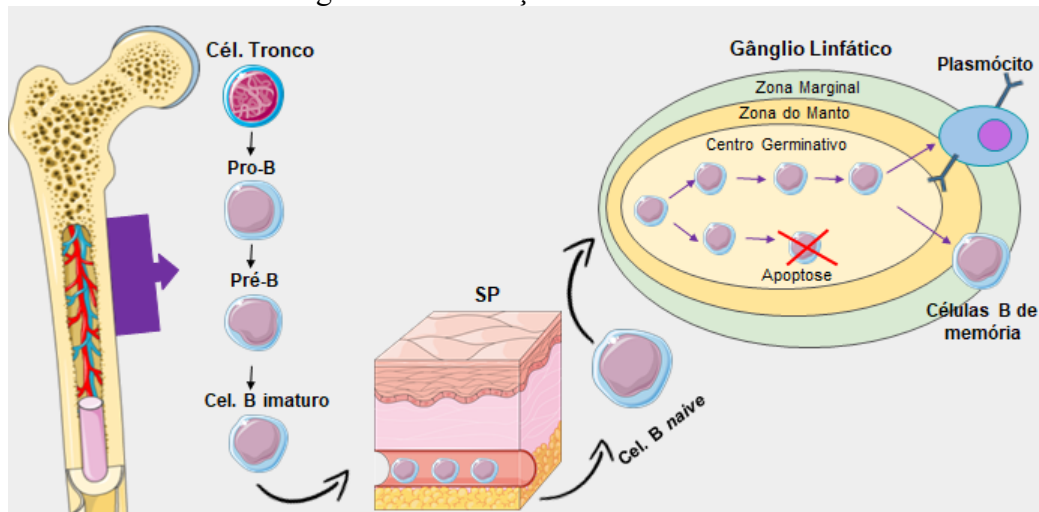
3.2 MATURAÇÃO DE CÉLULAS B

O processo de formação dos linfócitos B ocorre a partir de células-tronco hematopoiéticas (HSCs) na MO. Esses progenitores que estão comprometidos com a linhagem B se proliferam e dão origem aos precursores de linfócitos B, que são chamados de células pró-B. Em seguida, ocorre a recombinação V-D-J com a formação das cadeias pesadas das imunoglobulinas (Igs) e, também, a formação do pré-receptor de células B (pré-BCR), que dá origem às células pré-B. Logo em seguida, ocorre a formação das cadeias *kappa* (κ) ou cadeias *lambda* (λ). Portanto, cada linfócito apresenta um tipo de cadeia leve associada a uma cadeia pesada. No processo de formação do linfócito B, caso ocorra o reconhecimento de algum antígeno próprio, essa célula entra em apoptose em um processo chamado de seleção negativa, a fim de evitar a produção de auto-anticorpos.

Após formação das cadeias *Kappa e Lambda*, as células linfóides B passam a expressar IgM e o receptor de célula B (BCR) em sua superfície. Por fim, os linfócito B *naive* ou células B imaturas saem da MO e vão para o baço. Após isso, passam a expressar também IgD na superfície celular, denominados assim de células B virgens maduras. Depois, essas células migram para o centro germinativo e entram em contato com antígenos, apresentados por outras células (células dendríticas e células T, por exemplo), e são ativadas por modificações no seu DNA. Dessa forma, ocorre a mudança de classe de imunoglobulinas (Ig), e os linfócitos B passam a expressar IgG, IgE ou IgA. A partir desse momento, ocorre também a hipermutação somática, em que se desenvolve uma mutação da região variável da cadeia leve (IgV) e as células B passam a ter afinidade para um antígeno específico. Como resultado, tem-se a formação de plasmócitos ou células B de memória (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; BANNARD; CYSTER, 2017; HUSBY; GRØNBAEK, 2017; MELCHERS, 2015).

Durante o processo de maturação dos linfócitos B, podem ocorrer alterações e/ou mutações que levam a translocações cromossômicas e, com isso, ocasionam o desenvolvimento de células neoplásicas (SIGVARDSSON, 2018). Caso essa alteração se desenvolva no centro germinativo, pode dar origem a diferentes linfomas, dentre eles, o linfoma folicular, o linfoma de grandes células B e o LB (Figura 2) (SWERDLOW et al., 2017).

Figura 2 - Maturação do linfócito B



A maturação dos linfócitos B se inicia na medula óssea a partir de uma célula tronco que sofre diferenciação e maturação tornando-se um linfócito pró-B e depois pré-B, com a formação das cadeias leves e pesadas de imunoglobulina a célula torna-se um linfócito B maduro virgem (*naive*) que segue para os órgãos linfoides secundários. No centro germinativo do linfonodo, após o reconhecimento do antígeno, o linfócito troca a classe de imunoglobulina produzida passando de IgM, para IgG, IgA ou IgE, dependendo do tipo de antígeno reconhecido. Esse é o local onde também ocorre a hipermutação somática, mutação da região variável da cadeia leve (IgV) e as células B passam a ter afinidade para um antígeno específico. Após essa etapa, o linfócito B pode dar origem a uma célula de memória ou a formação do plasmócito. Nota: SP: sangue periférico. Fonte: Adaptado de SANTOS-PIRATH, 2020.

3.3 LINFOMA DE BURKITT (LB)

O LB é uma neoplasia linfóide de células B maduras que se desenvolve no centro germinativo dos gânglios linfáticos (SWERDLOW et al., 2017). Estima-se que, nos Estados Unidos da América (EUA), o LB represente de 20 a 30% dos linfomas pediátricos e 1% dos linfomas em adultos para 1840 casos anualmente (GASTWIRT; ROSCHEWSKI, 2018). De acordo com as características clínicas, epidemiológicas e biológicas, o LB pode apresentar-se de três formas. A primeira delas é a forma endêmica, localizada na África Ocidental, e costuma manifestar-se em crianças, associada ao vírus Epstein-Barr (EBV) e ao *Plasmodium falciparum* (malária), ambas as doenças são associadas a instabilidade genética das células B. Proteínas latentes do EBV bloqueiam a apoptose em células B e assim auxiliam ao desenvolvimento da translocação *c-myc*, mediante as proteínas EBNA1, BHRF1, transcrição EBV e/ou modificação epigenética e repressão da proteína BIM pela transcrição latente de LMP1 (HESLOP, 2005; MOLYNEUX et al., 2012; ROCHFORD; CANNON; MOORMANN, 2005; SHIMIZU et al., 1994). A segunda forma de LB é a esporádica, localizada em outros continentes, e a terceira está relacionada à imunodeficiência humana e acomete pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (HERNANDEZ-RAMIREZ, 2019).

O LB é uma neoplasia agressiva, com rápida proliferação (entre 24 e 48h) e altas taxas de apoptose (KALISZ et al., 2019). Esse tipo de linfoma costuma envolver locais extranodais como ossos, trato gastrointestinal (TGI), seios e gônadas. A translocação *MYC* ocasiona o desenvolvimento do LB. A translocação *MYC* é composta de oncogenes e por genes reguladores que codificam fatores de transcrição e fazem a regulação do ciclo celular. O gene *myc* codifica o fator de transcrição do proto-oncogene *c-myc*, localizado no cromossomo 8q24, e regula a diferenciação, proliferação e apoptose celular. A translocação t(8;14)(q24;q32) causa um aumento de *c-myc* e, com isso, a duplicação das células neoplásicas e proliferação descontrolada de células B (KALISZ et al., 2019). Outras translocações envolvendo o cromossoma 8 também podem ser observadas, como t(2;8)(p12;q24) e t(8;22)(q24;q11), que ocorrem em menor quantidade e fazem a justaposição *MYC* com o *locus* da cadeia leve (κ e λ) da Ig (DALLA-FAVERA et al. 1982; DANG et al, 1999; NGUYEN; PAPENHAUSEN; SHAO, 2017; SCHMITZ et al., 2014; ZECH et al., 1976). Um proto-oncogene controla várias funções celulares como crescimento celular, ciclo celular, metabolismo, sobrevivência, além de adesão, biossíntese celular e função mitocondrial.

3.4 FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DO LB

O tratamento para o LB se baseia na administração de altas concentrações de quimioterápicos. A maioria dos medicamentos utilizados foram adaptados de protocolos desenvolvidos para crianças ou adultos jovens com leucemia linfocítica aguda (LLA) (DUNLEAVY, 2018; GASTWIR; ROSCHEWSKI, 2018). Contudo, os tratamentos que foram adaptados a partir de tratamentos para crianças costumam ser tolerados por adultos jovens e crianças, entretanto, para adultos e pacientes imunossuprimidos, os mesmos costumam ser tóxicos (DUNLEAVY, 2018).

A escolha do tratamento baseia-se principalmente em características fenotípicas e histológicas das células, bem como a idade, presença ou não de comorbidades e estágio da doença (DUNLEAVY, 2018; TOMSKA et al., 2018). Estudos mencionam que, no momento do diagnóstico, em torno de 70% dos pacientes apresentam doença avançada, em estágio III ou IV, segundo a classificação Lugano, a qual é baseada no sistema Ann Arbor (ANSELL, 2015; CAMARA-CLAYETTE, 2020; CHASON, et al., 2014; SALEH; MICHOT).

A fim de evitar o comprometimento do SNC, o tratamento deve ser iniciado rapidamente após a confirmação do diagnóstico. Além disso, após início da terapia

farmacológica, há o aumento do risco do desenvolvimento da síndrome de lise tumoral (SLT), se isso ocorrer, o paciente deve ser admitido em unidade de terapia intensiva (UTI) e deve-se realizar hemodiálise preventiva nos pacientes que já apresentem como comorbidade insuficiência renal ou concentrações elevadas de ácido úrico (BONNET et al., 2015; SALEH et al., 2020).

Inicialmente, nos protocolos quimioterápicos, eram usadas combinações de ciclofosfamida, vincristina, doxorrubicina e metotrexato (CODOX-M) com adição de ifosfamida, mesna, etoposideo e citarabina (IVAC), este protocolo era denominado de regime Magrath, o qual foi desenvolvido para o tratamento de LNH agressivo (SALEH; MICHOT; CAMARA-CLAYETTE et al., 2020). Magrath e colaboradores (1996) mostraram que o seu protocolo atingia uma sobrevida livre de eventos (EFS) de 92% em dois anos para uma população de crianças e adultos. Contudo, a taxa de complicações foi alta e os pacientes apresentavam septicemia em 22% dos casos, neutropenia prolongada em 100% dos casos e mortalidade relacionada ao tratamento em 5% dos casos (GASTWIRT; ROSCHEWSKI, 2018; MARGRATH et al., 1996).

Posteriormente, um grupo francês publicou um estudo com 561 crianças com linfoma de células B maduras e leucemia linfocítica aguda de células B (LLA-B) em que foi utilizada a combinação de ciclofosfamida, prednisona, doxorrubina e vincristina (fase de indução) seguida de metotrexato, vincristina, predinisona, metotrexato e etoposideo (ciclos de consolidação e manutenção). Esse protocolo, também era denominado de *Lymphome Malins de Burkitt* (LMB89), atingiu uma taxa de EFS (em cinco anos) em torno de 90% em crianças, entretanto, quando utilizado em adultos, a EFS (em dois anos) foi de 65% e a mortalidade relacionada ao tratamento foi em torno de 4% (DIVINÉ M et al., 2005; GASTWIRT; ROSCHEWSKI, 2018; ZAYAC; OLSZEWSKI, 2020).

Nos anos seguintes, foi avaliada a combinação de vincristina, ciclofosfamida hiperfracionada, doxorrubicina e dexametasona, alternando com altas doses de citarabina e metotrexato (hiper-CVAD) em pacientes classificados como LLA do tipo Burkitt. Com essa combinação de fármacos, 81% dos pacientes alcançaram remissão completa e a sobrevida global (três anos) foi de 49%. Entretanto, esses pacientes tinham como complicações mielossupressão e a taxa de mortalidade foi de 19% (GASTWIRT; ROSCHEWSKI, 2018; THOMAS et al., 1999).

Nos casos em que o LB infiltra o SNC, são utilizados fármacos que atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) como a citarabina e o metotrexato. No entanto, um estudo

publicado no ano de 2012 mostrou que essa combinação, acrescida de radiação, causava grave toxicidade neurológica e a profilaxia com base nesse tratamento permanece controversa (GASTWIRT; ROSCHEWSKI, 2018; MAGRATH, 2012).

Com a introdução do anticorpo monoclonal rituximabe, houve um aumento na sobrevida livre de progressão de 87% para 95% (três anos) dos pacientes com LB (crianças e adolescentes) e, de acordo com um estudo randomizado publicado em 2020, a adição de rituximabe ao protocolo LMB89 fez com que os pacientes obtivessem 95% de remissão completa a longo prazo (MINARD-COLIN et al., 2020).

Dunleavy e colaboradores (2013) relataram o uso de doxorrubicina, ciclofosmida, etoposídeo, vincristina, prednisona e rituximabe (Da-EPOCH-R) em conjunto com oito doses de metotrexato como profilaxia para o SNC em pacientes com LB soro-negativos para HIV. Nesse estudo, após um acompanhamento dos pacientes por 86 meses, foi observada uma taxa de sobrevida livre de progressão de 95% e nenhuma morte de pacientes com LB (DUNLEAVY et al., 2013; MINARD-COLIN et al., 2020). Esse estudo também demonstrou que o uso dessa combinação é baseado no tempo de exposição e não na sua dose e, com isso, estudos *in vivo* demonstram que a terapia com baixa intensidade por um tempo de exposição prolongado faz com que ocorra um estresse genotóxico com o uso dessa combinação e isso maximiza a morte das células neoplásicas (GASTWIRT; ROSCHEWSKI, 2018).

A utilização de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina com adição de rituximabe (CHOP-R) costuma levar à recidiva e baixa sobrevida global de dois anos, em torno de 38,8% (WASTERLID et al., 2013; ZAYAC; OLSZEWSKI, 2020). Por isso, essa terapia passou a não ser indicada para o tratamento do LB (WASTERLID et al., 2013).

No LB associado à imunodeficiência, podem ser usadas combinações de CODOX-M/IVAC com adição de rituximabe e DA-EPOCH-R infusional ou SC-EPOCH-RR. À combinação de CODOX-M/IVAC, foi acrescido rituximabe para pacientes soro-positivo para HIV e, com alteração de dose nos medicamentos ciclofosfamida, vincristina e metotrexato, e apresentaram 69% de sobrevida global (dois anos) e baixa taxa de toxicidade (79%) quando comparados ao regime original (ZAYAC; OLSZEWSKI, 2020).

Como mencionado, os tratamentos com elevadas concentrações de fármacos costumam ser bem tolerados por jovens, por outro lado, pacientes idosos e imunossuprimidos costumam apresentar toxicidade aumentada. Assim, torna-se necessário a busca por novos medicamentos para o LB, com mais sensibilidade, com menos efeitos adversos, visto que o LB tem certa sensibilidade às terapias atuais, porém alguns pacientes podem não responder a terapia inicial, ou tem recaída após administração de terapia padrão, o que leva a um

prognóstico desfavorável (ALSHARIF; DUNLEAVY, 2019; CASULO; FRIEDBERG, 2018; ZENG et al., 2017).

Nesse sentido, novos alvos estão em fase de estudo e são promissores para o desenvolvimento de novos fármacos, como inibidores da PI3K, inibidores da CDK3, inibidores de Bcl-2, inibidores da MYC. (ZAYAC; OLSZEWSKI, 2020).

Com isso, à medida que são incorporados novos fármacos aos esquemas iniciais de tratamento do LB, diminui a necessidade do uso de agentes altamente tóxicos e há o aumento na qualidade de vida dos pacientes (ALSHARIF; DUNLEAVY, 2019; DUNLEAVY; LITTLE; WILSON, 2016; DUNLEAVY, 2018).

3.5 COMPOSTOS SINTÉTICOS E NATURAIS PARA O TRATAMENTO DO LB

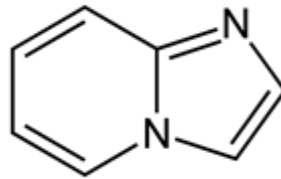
3.5.1 Compostos Sintéticos

Os compostos sintéticos são de grande importância para a indústria farmacêutica e também para outras áreas como agricultura, biologia, na produção de vitaminas, diagnósticos, cosméticos, pois facilitaram o fornecimento de substâncias que servem de ferramenta para a indústria em geral. Os primeiros produtos a serem sintetizados foram os corantes como o mauvine e o índigo, dando um impulso na indústria de corantes. Já na indústria farmacêutica, a síntese de compostos facilitou a fabricação dos medicamentos que antes eram produzidas apenas com base na utilização de produtos naturais, o que poderia alterar de acordo com a matéria prima, a época do ano, quantidade de metabolitos secundários e outros fatores que impediam a produção de um medicamento com as mesmas características. A partir da síntese, pode-se fabricar os medicamentos em grande quantidade e com controle analítico dos produtos preparados. O primeiro medicamento totalmente sintético e puro a ser produzido foi o ácido acetilsalicílico (NICOLAOU, 2016).

Aproximadamente, 85% dos medicamentos utilizados na rotina são de origem sintética e estima-se que 50% dos medicamentos tenham pelo menos um anel aromático que pode conter substituições (BARREIRO; FRAGA, 2015). Os anéis heterocíclicos contendo um anel imidazol são encontrados em várias substâncias importantes, com ampla variedade de atividades biológicas, podendo serem usados como antifúngico (SAWYER et al., 1975), antineoplásico, anticonvulsivante e antibiótico (DEVI; JANA; SINGH, 2018; KISHBAUGH,

2016). Dentre os resultados da adição de anéis heterocíclicos às piridinas, é possível destacar a imidazopiridina (IAZP) (Figura 3), a qual também apresenta atividades biológicas como potenciais inibidores da tromboxane sintetase e da agregação plaquetária, antiviral e antitumoral (SAYEED et al., 2018).

Figura 3 - Estrutura química da imidazopiridina



Fonte: A AUTORA

3.5.2 Os produtos naturais

Os produtos naturais compreendem uma fonte inesgotável para a produção de novos fármacos, que incluem medicamentos antineoplásicos. Os produtos naturais podem ser isolados a partir de plantas, organismos marinhos e podem ser usados inalterados ou como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2016). Os produtos naturais marinhos são compostos biologicamente ativos e são capazes de interagir com diferentes alvos moleculares, dessa forma, podem promover e inibir algumas funções biológicas e, por isso, podem ser possíveis candidatos a novas terapias (CHAMNI et al., 2020; HU et al., 2015).

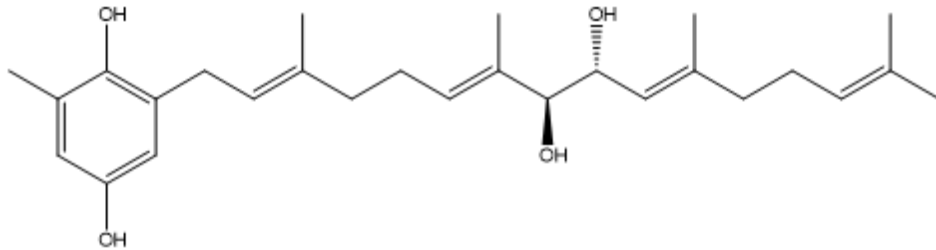
Dentre os produtos naturais obtidos de plantas e organismos marinhos, encontram-se os terpenos, alcaloides, flavonoides, esteroides, quinonas, peptídeos, ligninas, entre outros, os quais, posteriormente, serviram de modelo para síntese de novos fármacos (KUMAR; JAITAK, 2019b; LI et al., 2019; NEWMAN; CRAGG, 2016). Existem vários medicamentos derivados de produtos naturais que são utilizados para o tratamento de diferentes cânceres, dentre eles, vincristina, vimblastina (alcaloides da vinca) (GIDDING et al., 1999; HAQUE et al., 2018) e paclitaxel (*Taxus brevifolia*) (YANG; HORWITZ et al., 2018). Outros organismos também são importantes, como os microrganismos, em que é possível citar o fármaco doxorubicina, que foi desenvolvido a partir de um produto natural isolado do *Streptomyces peucetius*. A citarabina é outro fármaco que foi desenvolvido inspirado em um produto natural marinho (esponja *Tectitethya crypta*) utilizado para o tratamento de neoplasias

hematológicas (BLAIR, 2018; NASTRUCCI; CESARIO; RUSSO, 2012; SOEST, 2018; WALI et al., 2019).

3.5.3 Hidroquinonas

O sargatetraol (Figura 4) é uma hidroquinona isolada da alga parda *Desmarestia menziessi*, pertencente à classe Phaeophyceae e a família Desmarestiaceae (PHILIPPUS, 2020; DAVYT et al., 1997). Ele foi descrito pela primeira vez em 1979, isolado da alga *Sargassum tortile* (ISHITSKA et al., 1979).

Figura 4 - AP12 (Sargatetraol)



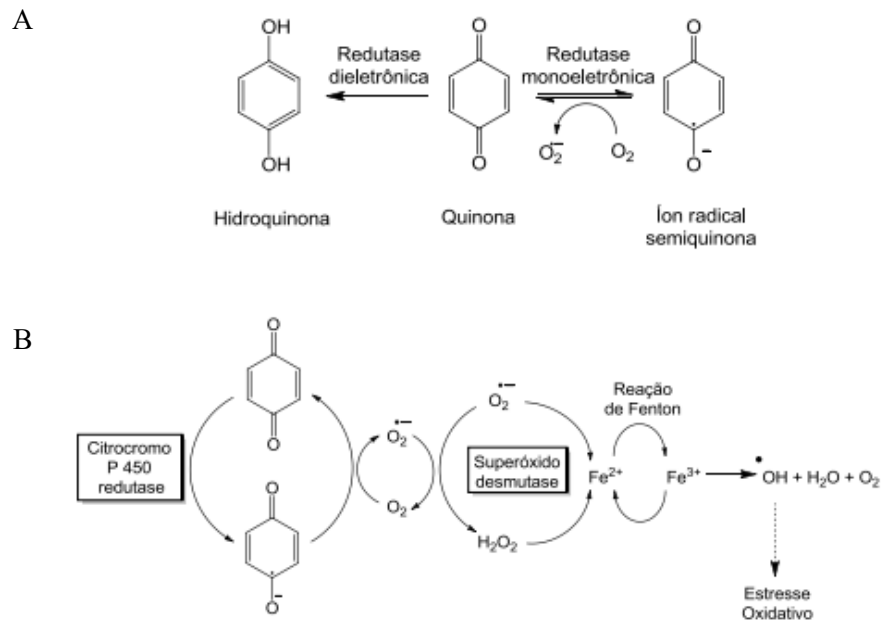
Fonte: PHILIPPUS, 2020

As hidroquinonas são caracterizadas pela presença de um anel aromático com duas hidroxilas na posição para e são geradas a partir da redução de quinonas (SIMÕES et al., 2017; DAVYT et al., 1997). Ainda não existem relatos na literatura sobre a atividade biológica do sargatetraol, entretanto, sabe-se que as hidroquinonas podem induzir morte de células de linfoma e leucemia (XU et al., 2017), bem como apresentam atividade antiagregante, antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória (CHANG et al., 2019). Várias quinonas já são utilizadas na clínica para o tratamento de diferentes neoplasias hematológicas e também de alguns tumores sólidos, dentre elas, a doxorubicina e daunorrubicina, que são utilizadas para o tratamento de LB e leucemia mieloide aguda (LMA), respectivamente (BONNET, et al., 2015; HEUSER, et al., 2020).

As quinonas, de forma característica, podem inibir as enzimas telomerase e topoisomerase por processos de alquilação ou intercalação do DNA. Além disso, também apresentam propriedade citotóxica por meio da produção de EROS, pois durante o processo de redução das quinonas, elas podem gerar íons superóxidos e levar a processos de morte celular (Figura 5). As hidroquinonas podem ser facilmente convertidas em quinonas e são catalisadas por enzimas oxidativas como CYP450 e peroxidase (BOLTON; DUNLAP, 2017;

KLOPCIC; DOLENC, 2019). Assim, o sargatetraol pode ser um composto com potencial efeito citotóxico, com possível geração de EROS em LB.

Figura 5 - Redução de quinona e processo de formação de EROS



(A) As hidroquinonas podem ser facilmente convertidas em quinonas, sendo catalisadas por enzimas oxidativas.
 (B) O processo de redução das quinonas pode gerar ions superóxidos, e formação de EROS. Fonte: Adaptado de Delarmelina, 2013.

Como citado anteriormente, as quinonas podem inibir a topoisomerase e também induzir quebras no DNA e, assim, levar a processos de morte celular. De forma semelhante às quinonas, a doxorrubicina tem como mecanismo de ação inibir a topoisomerase II, porém o medicamento apresenta como consequência o desenvolvimento de cardiomiopatias irreversíveis. Nesse contexto, torna-se necessário a busca por medicamentos que causem danos sobre as células neoplásicas de maneira seletiva sem causar danos às células não neoplásicas (KLOPCIC; DOLENC, 2019). Sendo assim, é necessário um melhor entendimento sobre como as quinonas agem sobre a duplicação do DNA e no ciclo celular, a fim de se investigar novos alvo terapêuticos.

3.6 CICLO CELULAR

O ciclo celular corresponde a processos fisiológicos complexos que desencadeiam o desenvolvimento de uma nova célula. Esses processos ocorrem de forma contínua e envolvem a regulação de diversas proteínas, que incluem ciclinas, quinases dependentes de ciclinas (CDKs), genes supressores de tumor e proteínas de controle mitótico, o que resulta na duplicação correta das células (CAGLAR; CIGIR; AVCI, 2020; SCHAFER, 1998). O ciclo celular pode ser dividido em duas fases: interfase, período que compreende o tempo entre duas mitoses e que corresponde às fases G1, S e G2; e mitose (Figura 6). Durante a interfase, ocorre a preparação da célula para a divisão celular e, assim, a célula aumenta de tamanho e replica seu DNA. A fase G1 é o espaço entre o final da citocinese e o início da fase S, em que ocorre aumento do volume celular, condensação dos cromossomos e a síntese de proteínas; essa fase também decide se a célula começa uma nova divisão ou entra na fase G0, momento em que a célula permanece em repouso (quiescência). Na fase posterior, denominada síntese (S), ocorre a replicação do DNA, cada cromossomo é duplicado e resulta em duas cromátides irmãs. Por fim, na fase G2, a célula sintetiza materiais necessários para dar início à mitose, como o RNA e as proteínas. A mitose, também denominada de fase M, é o último estágio do ciclo celular, em que ocorre a divisão celular e é dividida em prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase, com isso, ocorre a formação de duas células filhas idênticas à célula precursora inicial (SCHAFER, 1998; WENZEL; SINGH, 2018).

O ciclo celular é controlado por pontos de verificação, denominados de *checkpoints*, os quais têm a função de evitar que a célula passe para fase posterior com alguma falha no processo. Caso algum erro seja identificado, ocorre a sinalização e, se possível, a reparação da mesma. Com isso, o ciclo celular é interrompido e ocorrem alterações na ativação e na expressão de CDK, o que evita com que a célula se divida de forma inadequada. Se o reparo não for possível, a célula entra em processo de apoptose. Existem três *checkpoints* principais ao longo do ciclo celular: o primeiro encontra-se na fase G1, antes de iniciar a fase S; o segundo na fase G2, antes da célula iniciar a mitose; e, por fim, na metáfase, onde ocorre o impedimento de ligação dos cromossomos aos microtúbulos (LIU et al., 2019; POON, 2016; WENZEL; SINGH, 2018).

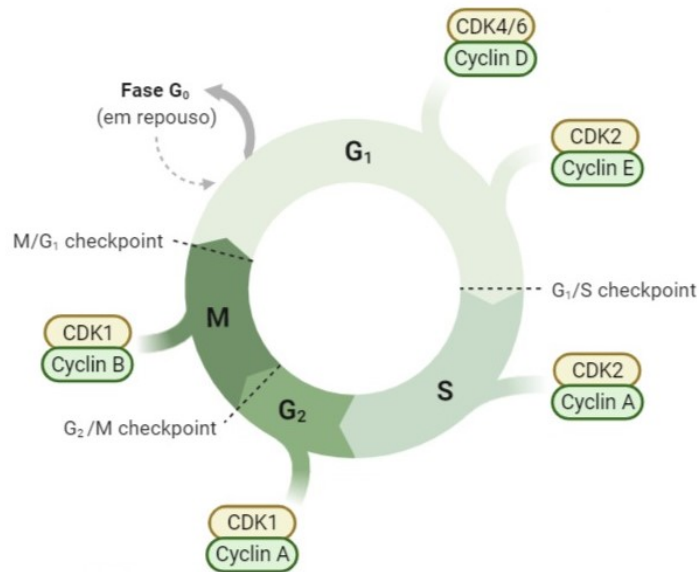
Esse controle é regulado pela ação das CDKs que, pela interação com ciclinas específicas, direcionam a célula para a próxima fase do ciclo celular. Entretanto, diante de alguma falha, as CDKs podem ser inibidas por inibidores de cinases dependente de ciclinas

(CDKs). Esses inibidores impedem que as CDKs se liguem às ciclinas até que ocorra o reparo do DNA. Por outro lado, se não houver a reparação, a célula sofre apoptose ou inicia processo de replicação, o que favorece o desenvolvimento das neoplasias (CAGLAR; CAGLAR; AVCI, 2020; MARTINELLI, 2017; RORA; IACOBUCCI; SATYANARAYANA; KALDIS, 2009).

Diversos genes supressores de tumor e oncogenes desempenham um papel importante na regulação do ciclo celular. As proteínas p53 e p27, por exemplo, apresentam características de supressão tumoral, indução da apoptose e parada do ciclo celular por meio da inibição da ativação das CDKs. Essas proteínas encontram-se mutadas ou silenciadas em diferentes tipos de cânceres. No LB, a desregulação do ciclo celular ocorre mediante as mutações na ciclina D3, CDKN2A ou *TP53*. Estima-se que a mutação no *TCF3* ocorra em 70-90% dos LB esporádicos, 40% dos LB endêmicos e 67% dos LB associado à imunodeficiência (SCHMITZ, et al., 2014; ZAYAC, OLSZEWKI, 2020).

Além das CDKs, diversas outras proteínas atuam na regulação do ciclo celular, como a KI-67. Essa proteína é considerada um marcador de proliferação celular devido ao fato de estar presente em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G0. Esse marcador se encontra aumentado em diversas neoplasias, inclusive no LB (100% dos casos) (ZHANG et al., 2020). Nesse contexto, apesar dos avanços na compreensão do LB e da proliferação celular das células neoplásicas, esse conhecimento ainda não foi convertido em novas terapias e os pacientes continuam a depender de tratamentos com elevada citotoxicidade, uma vez que esses medicamentos não são citotóxicos apenas para as células neoplásicas, mas também para as células não neoplásicas dos pacientes, o que ocasiona um efeito adverso importante, (ZAYAC, OLSZEWKI, 2020). Sendo assim, o bloqueio do ciclo celular e das proteínas envolvidas na sua regulação podem se tornar possíveis alvos para terapia antineoplásica.

Figura 6 - Ciclo celular



O ciclo celular é dividido em interfase (G₁, G₂ e S) e mitose. Entre as fases do ciclo, existem pontos de checagem que são controladas por *checkpoints*, que irá permitir que a célula passe para a próxima fase, sem nenhum erro. Fonte: A AUTORA. Figura criada em BioRender.com (2021).

Como mencionado anteriormente, os tratamentos utilizados para as neoplasias hematológicas e mais especificamente para o LB costumam apresentar muitos efeitos adversos pela toxicidade. Adicionalmente, muitos pacientes apresentam após o tratamento inicial. Isso reforça a necessidade de busca por novos tratamentos, mais efetivos e seletivos para as neoplasias hematológicas (KUMAR; JAITAK, 2019a). Assim, é importante a busca de mecanismos que levem morte celular das células malignas como o bloqueio do ciclo celular.

3.7 MECANISMOS DE MORTE CELULAR

A homeostase celular ocorre com o balanço entre a proliferação e a morte celular. A morte celular regulada (MCR) pode ocorrer de forma coordenada a fim de eliminar as células que tiveram alguma perturbação intracelular ou extracelular, ou células danificadas que não passaram do processo de reparação. Quando esse processo ocorre de maneira fisiológica, ele é chamado de morte celular programada (MCP). Os tipos de morte celular mais estudados são: apoptose, necrose e autofagia. Entretanto, existem outros, entre eles: piroptose, necroptose, ferroptose, esferocitose, autosis, anoikis, morte celular netótica, morte celular dependente de

lisossomos, morte celular imunogênica e processos que não são classificados como MCR, como é o caso da senescência celular e catástrofe mitótica (GALLUZI et al., 2018).

As terapias antineoplásicas existentes têm como finalidade a indução da apoptose e de outras vias de morte celular, a fim de eliminar células neoplásicas. Quando ocorre o desenvolvimento de um câncer, há um desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular, em que as células se proliferam de forma descontrolada. Sendo assim, é necessário a busca por novos compostos que culminam na morte celular e que não apresentem efeitos nos tecidos adjacentes como, por exemplo, a apoptose (GALLUZI et al., 2018).

O processo de autofagia, por sua vez, é gerado por estímulos como, por exemplo, o estresse, e leva à destruição celular por ação de lisossomos (LEVINE; KLIONSKY, 2016; LEVINE; KLIONSKY; ARBOR, 2004). Durante esse processo, ocorre a degradação e/ou reabsorção de compostos celulares que já não são mais necessários para a célula. As células englobam partes do conteúdo citoplasmático e formam vacúolos autofágicos que são chamados de autofagossomos. A união do autofagossoma com um lisossoma faz com que o conteúdo do fagossoma seja digerido por meio de enzimas e, com isso, ocorre a digestão celular. Em outros casos, pode ocorrer a autólise da célula, em que ocorre a ruptura dos lisossomos (D'ARCY et al., 2019; GALLUZI et al., 2015).

Já a morte celular por necrose é uma forma não controlada de morte celular, desencadeada por lesão externa que pode ser inflamação, hipóxia, produtos químicos e radiação (GALLUZI et al., 2008). Para que esse processo ocorra, é necessária a regulação de diversas proteínas e compostos pró-inflamatórios. Para dar início ao processo de necrose, a célula aumenta de tamanho, o que leva a ruptura da membrana nuclear, plasmática e de suas organelas e, dessa forma, ocorre o extravasamento do conteúdo para áreas adjacentes, o que causa dano tecidual (D'ARCY et al., 2019; GALLUZZI et al., 2018).

A apoptose pode ser desencadeada por vários estímulos, exógenos e/ou endógenos, que levam a ativação de caspases iniciadoras e efetoras, e que causam alterações morfológicas e biológicas na célula. Morfologicamente, a apoptose se inicia com a diminuição do volume celular e condensação da cromatina, seguidas de formação de *blebings* na membrana celular, formação de corpos apoptóticos e, assim, ocorrerá a exposição de resíduos de fosfatidilserina que serão fagocitados e degradados em fagolisossomos (D'ARCY et al., 2019; GALLUZI et al., 2018; PISTRITTO et al., 2016).

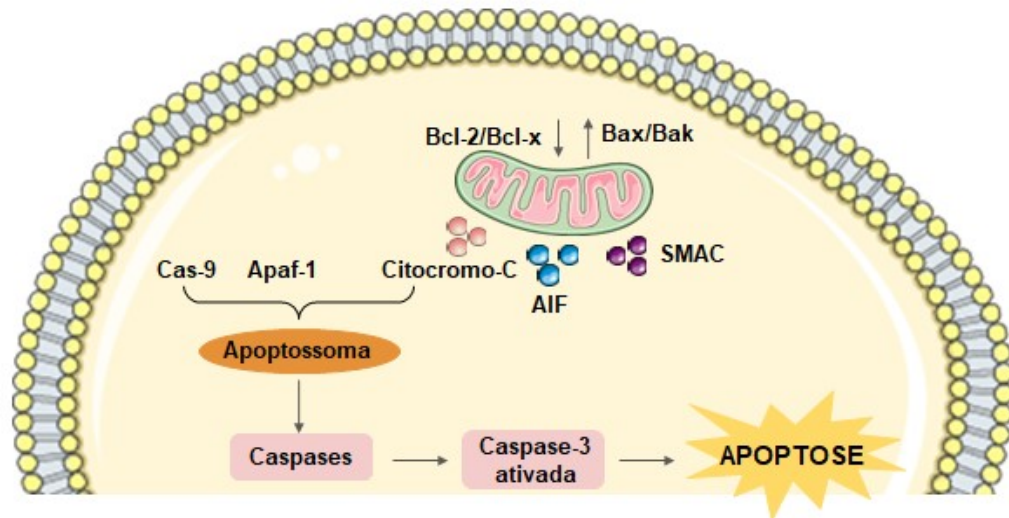
A apoptose pode ser dividida em apoptose intrínseca e extrínseca. A apoptose intrínseca é iniciada pela célula quando são detectados danos por meio de sensores intracelulares. Já a apoptose extrínseca é iniciada após um dano ou em resposta a algum antígeno reconhecidos pelos receptores de morte. Ambas as formas de apoptose podem ocorrer simultaneamente e se convergem na ativação da caspase-3, o que resulta na morte celular (D'ARCY et al., 2019).

3.7.1 Apoptose Intrínseca

A apoptose intrínseca se inicia com perturbações na parte externa e interna da membrana celular. Esses danos podem ser gerados por hipóxia, formação de EROS, aumento de cálcio no citosol e danos ao DNA. Desta forma, inicia-se a ativação dos membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, denominados BH3 (Bax, Bak, Bid, Puma e Noxa) e diminuição da ativação de proteínas antiapoptóticas, como BCL-2, MCL-1, BCL-W, BCL-XL, e A1 / BFL-1. Esse desequilíbrio leva a formação de poros na membrana externa mitocondrial (MOMP, do inglês *mitochondrial outer membrane permeabilization*), o que acarreta a liberação para o citosol de proteínas que antes permaneciam no espaço intermembranar da mitocôndria como o citocromo c, fator indutor da apoptose (AIF) e segundo ativador mitocondrial de caspases (SMAC) (Figura 7).

Quando liberado, o citocromo c liga-se a fator-1 ativador de protease apoptótica (APAF-C) e, juntos, formam o apoptossoma que cliva a pró-caspase-9 em caspase-9 ativada, que ativa caspase-7 e caspase-3 e, com a caspase-3 ativada, leva a fragmentação do DNA e inibição de flipases, o que leva à morte celular (GALLUZI et al., 2018; PISTRITTO, et al., 2016; VOSS; STRASSER, 2020).

Figura 7 - Apoptose intrínseca

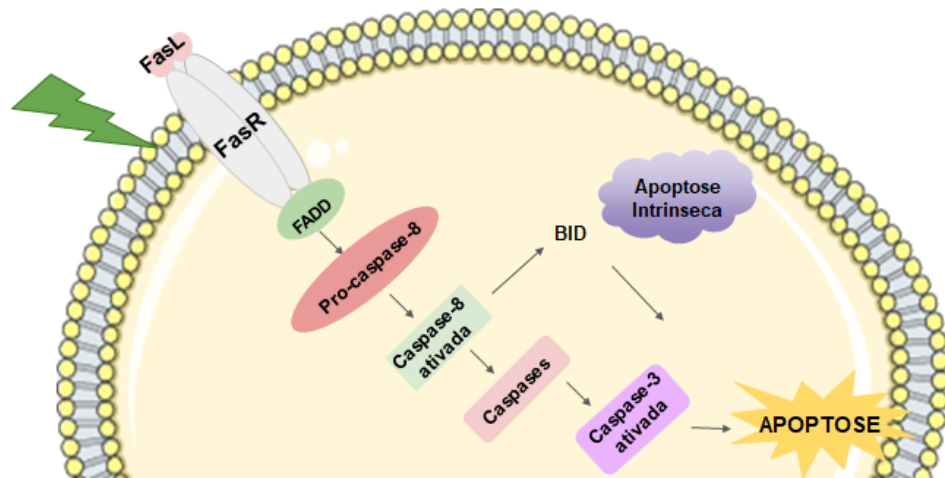


A apoptose intrínseca se inicia com perturbações na parte externa e interna da membrana celular, estas causam um desbalanço entre as proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas, o que faz com que ocorra a perda do potencial de membrana mitocondrial e liberação de proteínas como citocromo c, AIF e SMAC/Diablo. Citocromo c, juntamente com a caspase-9 e a Apaf-1, formam o apoptossoma e, em seguida, ocorre a ativação de caspase-9 e esta, por sua vez, ativa caspases efetoras que darão início ao processo de apoptose. Fonte: Adaptado de Walter, 2019.

3.7.2 Apoptose Extrínseca

A apoptose extrínseca tem início por meio de estímulos captados pelos receptores de morte expostos na superfície celular. Os receptores de morte fazem parte da família de receptores de necrose tumoral (TNF), que incluem TNF-R, TRAIL-R (D4 e D5) e DR3 (Apo-2) e FasR (CD95 ou Apo-1). Estes interagirão com o ligante Fas (Fas-L) e, após esse momento, os domínios de morte (DD) serão recrutados, tais com TRADD (do inglês, *tumor necrosis factor receptor-1-associated death domain*) ou FADD (do inglês, *Fas-associated via death domain*). Em seguida, junto às caspases-8 e -10, formarão o complexo DISC (complexo sinalizador indutor de apoptose) (Figura 8). Após esse processo, o complexo DISC induz a clivagem de caspase-8 e a liberação de sua forma ativa a qual, posteriormente, ativará as caspases-3 e -7, as quais serão as responsáveis pela execução da morte celular. A caspase-8 também pode clivar a proteína pró-apoptótica Bid, o que resulta em aumento da permeabilidade mitocondrial e liberação de fatores pró-apoptóticos, o que culmina no início da via intrínseca (D'ARCY, 2019; GALLUZZI et al., 2018).

Figura 8 - Apoptose extrínseca



A apoptose extrínseca se inicia com perturbações no ambiente extracelular, esses estímulos são captados pelos receptores de morte na superfície celular e, assim, ocorre a ligação desses receptores ao receptor Fas e, juntamente com a caspase-8, formam o complexo DISC. Em seguida, ocorre a ativação de caspase-8 e esta ativará as caspases efetoras que dão início à apoptose. A caspase-8 também pode ativar a proteína Bid e, assim, ativar a apoptose intrínseca. Fonte: Adaptado de Walter, 2019.

3.8 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS).

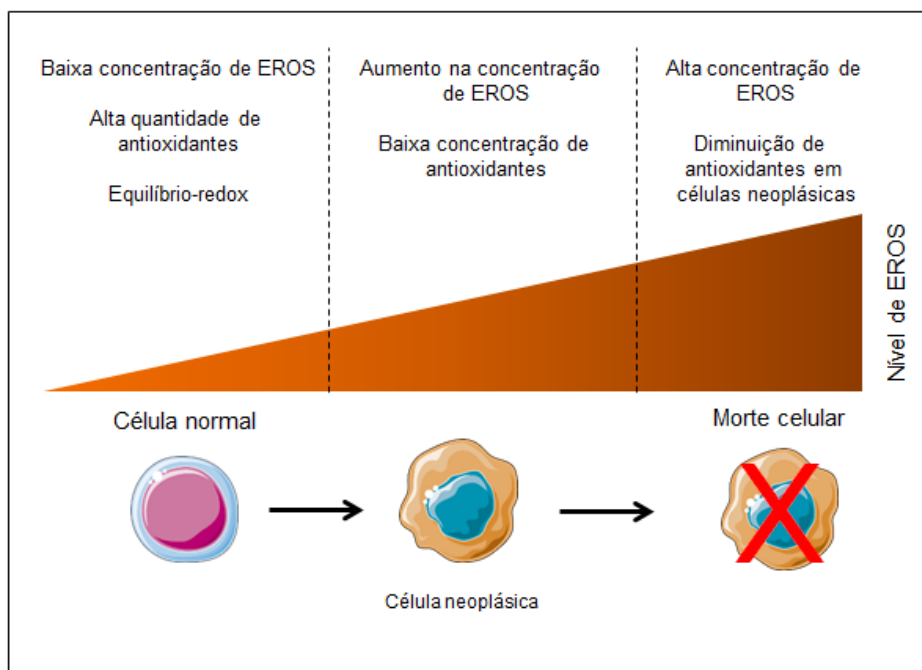
Vários fatores contribuem para o desenvolvimento de uma neoplasia, dentre eles, o aumento de EROS e diminuição da sua eliminação. As EROS são espécies que contêm oxigênio quimicamente reativas e são formadas pela redução incompleta de um elétron de oxigênio sendo elas peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH) e ânion superóxido (O_2^-) (AGGARWAL et al., 2019; PRASAD; GUPTA; TYAGI, 2017; YANG et al., 2018).

As EROS são produzidas de maneira endógena, como um subproduto mitocondrial, por meio da cadeia transportadora de elétrons, pela ativação de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, e pelo metabolismo de p450. Também são formadas de maneira exógena pela exposição à radiação, poluentes, fumaça, xenobióticos, drogas e tabagismo (AGGARWAL et al., 2019; PRASAD; GUPTA; TYAGI, 2017). Em condições fisiológicas, há um equilíbrio entre a geração de EROS e sua eliminação devido a ações mediadas por enzimas antioxidantes (estado redox de uma célula) e, por isso, as células mantêm uma concentração basal baixa dessas espécies. Quando o equilíbrio é interrompido, pela produção excessiva de EROS ou esgotamento de antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo

(AGGARWAL et al., 2019; HRYCAYL; BANDIERA, 2015). As EROS são moléculas instáveis, altamente reativas, que reagem com diferentes proteínas, lipídios e com o DNA e, portanto, são responsáveis pela patogênese de diversas doenças neurodegenerativas, inflamatórias e diferentes tipos de câncer (ASSI, 2017). Em altas concentrações, as EROS podem dar início a processos de angiogênese, supressão da apoptose, proliferação celular, sobrevivência e resistência tumoral à quimioterapia (AGGARWAL, et al., 2019; GALADARI, et al., 2017). Sabe-se também que o aumento das EROS está intimamente ligada à ativação de diferentes vias como via da PI3K/Akt/ mTOR, NF- κ B e MAPK/ERK que costumam estar desreguladas em vários tipos de neoplasias (REZATABAR et al., 2019).

Por outro lado, concentrações muito aumentadas de EROS podem gerar citotoxicidade na célula tumoral e levar a processos de morte celular, como a apoptose, uma vez que o aumento de EROS diminui a permeabilidade mitocondrial, criando poros na mesma e liberando citocromo c que, juntamente com Apaf-1 e pro-caspase-9, levam à ativação de caspase-9 e, assim, a ativação de caspases efetoras, o que resulta na clivagem de proteínas celulares e morte celular apoptótica (AGGARWAL, et al., 2019). O efeito das EROS sobre células normais e neoplásicas pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 - Aumento de EROS e formação ou morte da célula neoplásica



Vários fatores podem contribuir para a formação de uma célula neoplásica e, dentre eles, o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS) pode influenciar no surgimento de uma neoplasia. Por outro lado, o aumento excessivo de EROS no interior da célula tumoral, pode acarretar na ativação de vias antitumorais e levar a morte celular da célula neoplásica. Fonte: A AUTORA.

A investigação de compostos que induzam o aumento de EROS nas células neoplásicas pode ser uma alternativa interessante para o desenvolvimento de novos fármacos. Principalmente, se esses compostos conseguirem contornar a adaptação tumoral a esse ambiente oxidativo, já que dependendo da quantidade de EROS no interior, ocorre também o aumento de antioxidantes (adaptação redox), o que leva a diminuição das proteínas anti-apoptóticas e, conseqüentemente, resistência aos quimioterápicos.

4 METODOLOGIA

4.1 SÍNTESE E ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS

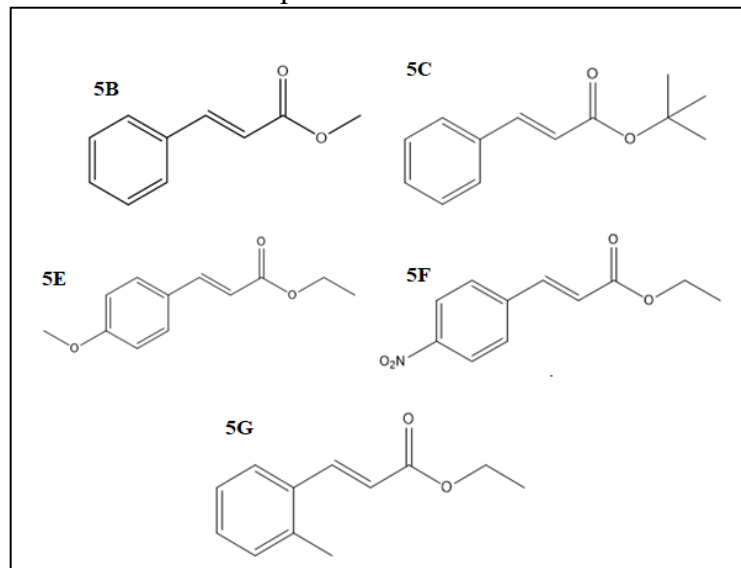
Neste trabalho, foram utilizados cinco compostos derivados do ácido cinâmico, cinco dihidropiridinas, oito imidazopiridinas e um composto de origem natural isolado da alga parda *Desmarestia menziessi*.

4.1.1 Compostos sintéticos

Os compostos sintéticos foram sintetizados pelo Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais da (LACFI) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob orientação do professor Dr. Ricardo Ferreira Affeldt, e cedidos ao Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH). Os compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck Millipore®) na concentração de 10 mM, a fim de se ter uma solução estoque (SE) que, em seguida, foi armazenada a 4 °C.

Os compostos derivados do ácido cinâmico (Figura 10) foram sintetizados pelo doutorando Elvis Naoto Nishida do Programa de pós-graduação em química e caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN) (Figura 10) (BELVAL; BACQUÉ; BALTAS, 2021).

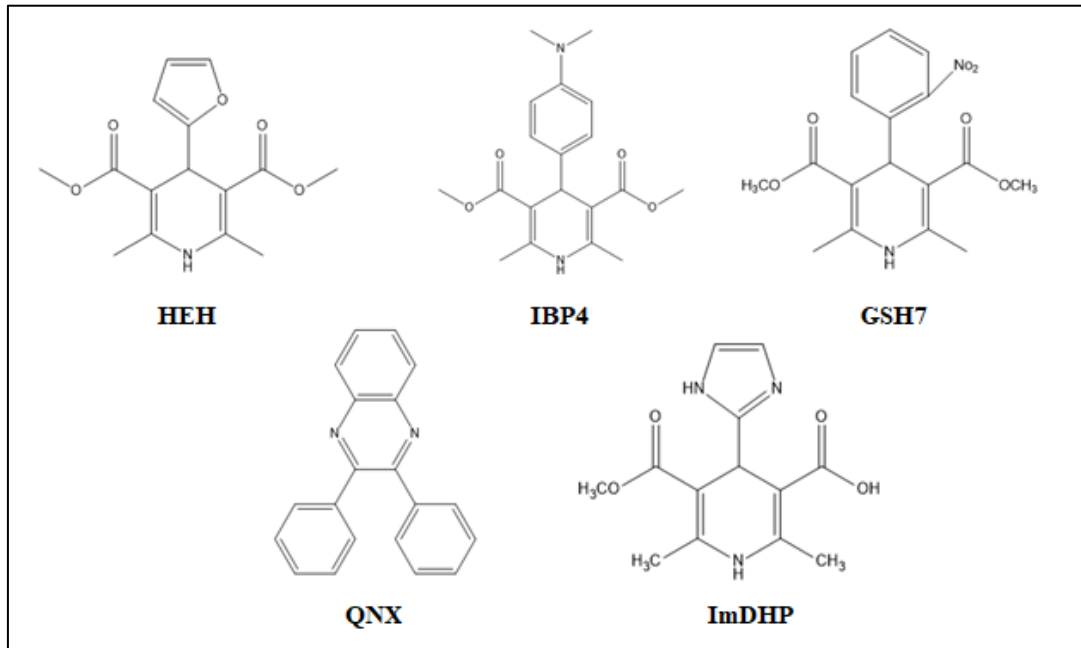
Figura 10 - Estrutura dos compostos sintéticos derivados do ácido cinâmico



Fonte: A AUTORA

As dihidropiridinas GSW e IPB foram sintetizadas pela química Isadora Bolzoni Pacheco. Os compostos foram caracterizados por cromatografia gasosa–espectrometria de massa (CG-EM), ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , COSY, infravermelho (IV) e espectroscopia UV-visível. O composto ImDHP foi sintetizado pelo químico Allison Thomé e foi caracterizado por cromatografia em camada delgada (CCD) e revelado com solução de vanilina sulfúrica e observado em câmara de luz ultravioleta (254nm). O composto QNX foi sintetizado pela mestrandia Jennifer Kupas Ramos do programa de pós-graduação em Química da UFSC e caracterizado por espectroscopia na região do IV, ponto de fusão e RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 11).

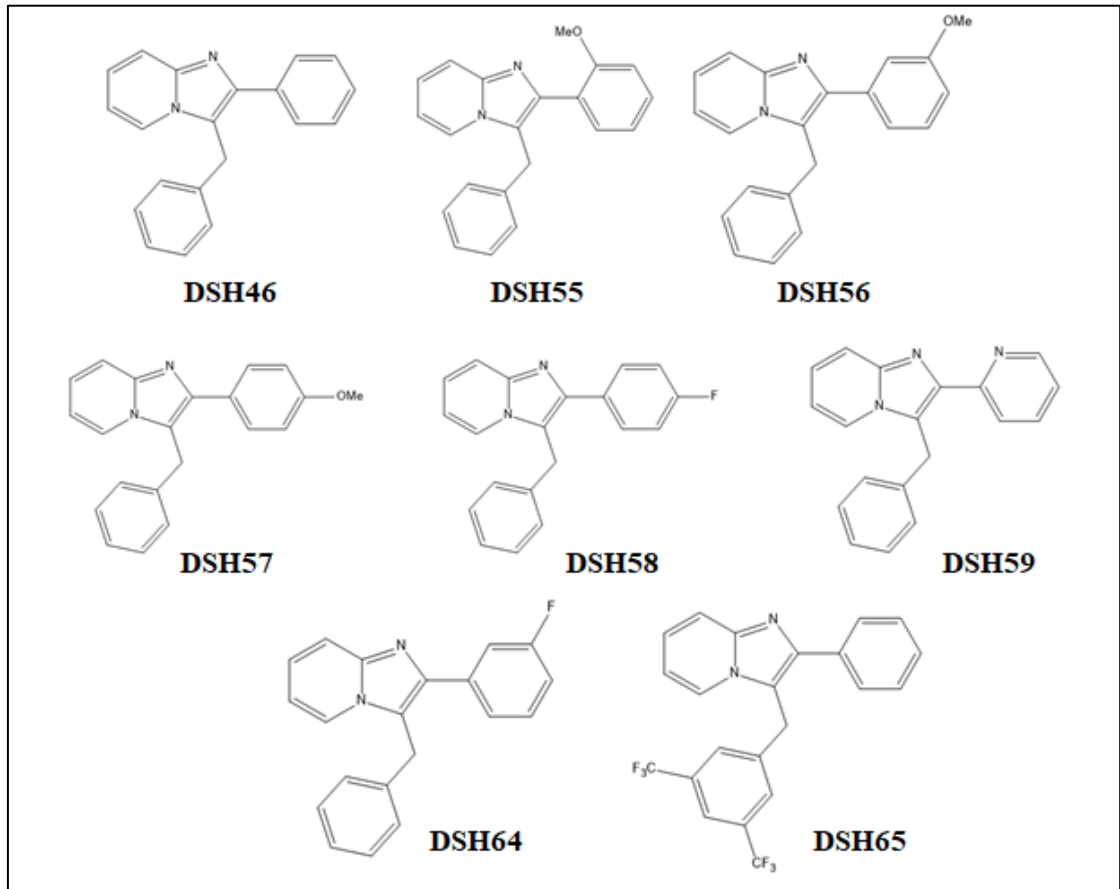
Figura 11 - Estrutura das dihidropiridinas



Fonte: A AUTORA

As imidazopiridinas foram sintetizadas e descritas por Salles e colaboradores (2019). Os compostos foram caracterizados por meio de RMN, espectrometria de massas de alta resolução e cromatografia de camada fina (Figura 12).

Figura 12 - Estrutura das imidazopiridinas



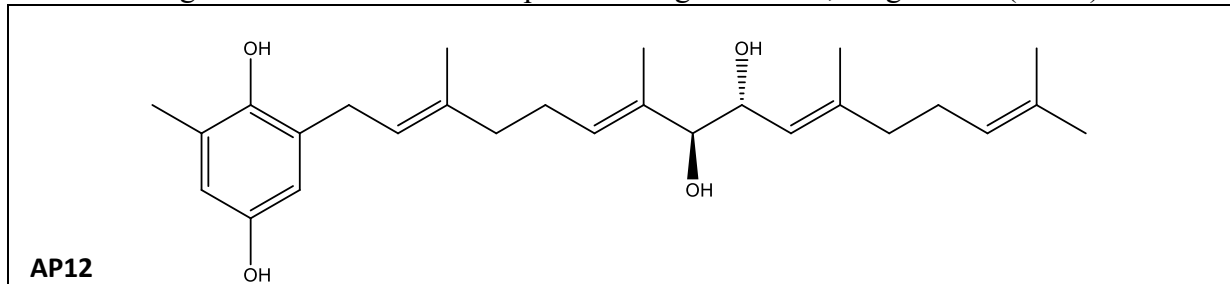
Fonte: A AUTORA

4.1.2 Composto de origem natural

O composto AP12 foi gentilmente cedido pela Dra. Ana Cláudia Philippus, sob orientação da professora Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg, do Laboratório de Química Farmacêutica/CCS da UFSC. AP12 foi isolado da alga parda *Desmarestia menziessi* J. Agardt, coletada por pesquisadores do Programa Antártico Brasileiro (MCTI/CNPq – Proantar) em Punta Plaza, em dezembro de 2015, na Baía do Amirantado, Ilha do Rei George, Antártica. A alga foi coletada por meio da expedição do Programa Antártico Brasileiro (ProAntar). A identificação do composto foi realizada por meio de obtenção e análise do espectro de RMN de ^1H e mapas de correlação *heteronuclear single quantum coherence* (HSQC) e *heteronuclear multiple bond correlation* (HMBC). A partir dos dados obtidos, foram realizadas buscas na literatura e nas bases de dados MarinLit (*Royal Society of*

Chemistry) e *Reaxys*, e foi possível constatar que o composto AP12 se tratava de uma hidroquinona, denominada Sargatetraol (Figura 13).

Figura 13 - Estrutura do composto de origem natural, Sargatetraol (AP12)



Fonte: PHILIPPUS, 2020

4.2 PREDIÇÃO *IN SILICO* DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS

Para a predição *in silico*, foram utilizadas as ferramentas *SwissADME* e *SwissTargetPrediction*, as quais auxiliam na predição das características físico-químicas e biológicas de moléculas. Essas são ferramentas gratuitas e foram desenvolvidas pelo grupo de Modelagem Molecular do SIB (Instituto Suíço de Bioinformática). A primeira plataforma (*SwissADME*) prediz as propriedades farmacocinéticas e farmacológicas dos compostos em estudo, bem como a predição de parâmetros ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), características físico-químicas (tamanho, lipofilicidade, polaridade, flexibilidade, solubilidade e saturação) e aplicação das regras de Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge (DAIANA; MICHIELIN; ZOETE, 2017; DAIANA; ZOETE, 2019; EGAN; MERZ; BALDWIN, 2000; GHOSE et al., 1998; LIPINSKI et al., 2001; MUEGGE; HEALD; BRITTELLI, 2001). Dentro da mesma plataforma, os compostos também foram avaliados com relação à química medicinal e quanto à presença de alertas estruturais, os quais mostram a presença de grupamentos tóxicos, metabolicamente instáveis, quimicamente reativos ou se possuem propriedades responsáveis por uma deficiente farmacocinética. Por fim, foi estabelecido um escore de zero a 10, em que 10 indica dificuldade de síntese dos compostos (BRENK et al., 2008).

Posteriormente, utilizou-se a ferramenta *SwissTargetPrediction*, a qual busca auxiliar na previsão de possíveis alvos farmacológicos dos compostos em estudo por medidas de similaridade 2D e 3D com compostos já descritos na literatura. Além disso, a ferramenta busca estimar a probabilidade do composto em se ligar a determinadas proteínas e, assim, estimar o seu alvo (GFELLER et al., 2014; DAIANA; ZOETE, 2019).

4.3 TRIAGEM E DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CONCENTRAÇÃO E TEMPO RESPOSTA

Para obter as concentrações utilizadas nos experimentos, foram preparadas soluções intermediárias por meio de diluição das soluções estoque com meio de cultura.

Inicialmente, foi avaliado o efeito citotóxico de todos os compostos na concentração de 100 μM sobre as células Daudi (1×10^5 células/poço) por 24 horas de incubação. As células Daudi foram cedidas pela professora Dra. Patrícia Maria Bergamo Favado da Universidade Federal de São Paulo (Brasil). A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio). O método consiste na clivagem do anel tetrazólico do MTT, de cor amarela, que, pela ação das desidrogenases mitocondriais, é convertido em um precipitado de coloração roxa (formazan). Assim, a quantidade de formazan formado é diretamente proporcional à viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Após 24 horas de incubação das células com os compostos, o MTT (5 mg/mL em PBS, Sigma-Aldrich[®]) foi adicionado às placas de cultivo celular e depois incubadas por 3 horas a temperatura 37 °C com 5% de CO₂. Após esse período, o meio de cultura foi removido, os precipitados foram dissolvidos em 100 μL de solução de álcool isopropílico/HCL 0,04 N e, em seguida, as placas foram centrifugadas a 264 g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outra placa em que foi realizada leitura em espectrofotômetro (Microwell Systems, Organon Teknika[®]) no comprimento de onda de 540 nm.

Para a determinação das curvas de concentração e tempo resposta, as células Daudi foram incubadas em diferentes tempos (24, 48 e 72 horas) e concentrações (1-100 μM).

Foram utilizadas 1×10^5 células/poço para 24 horas de incubação, 5×10^4 células/poço para 48 horas e $2,5 \times 10^4$ células/poço para 72 horas, em 200 μL de meio de cultura.

Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes de forma independente. As amostras foram preparadas em condições estéreis e as placas com as células foram armazenadas em estufa nas condições descritas acima. A densidade óptica do grupo controle foi considerada como 100% de viabilidade celular. Também foi realizada uma curva com o veículo de dissolução (DMSO) nas mesmas concentrações dos compostos (1-100 μM), a fim de descartar a interferência do veículo. A concentração inibitória de 50% (CI_{50}) foi obtida a partir da regressão não linear das curvas de concentração com auxílio do *software* GraphPad Prism 5.0[®].

Os compostos que causaram menor viabilidade celular em 100 μM foram selecionados para realização dos experimentos posteriores.

4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO (SP)

Para avaliação do efeito citotóxico dos compostos selecionados sobre células mononucleares (CM) do sangue periférico (SP) e do potencial hemolítico dos compostos, foram coletadas amostras de SP de pacientes clinicamente saudáveis e não fumantes que assinaram previamente à coleta do sangue o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme o Comitê de Ética de Pesquisa em Seres humanos da UFSC (CLAE n^o: 80430317.0.0000.0121) (Anexo A). As amostras foram coletadas por punção venosa e processadas imediatamente após a coleta.

4.4.1 Avaliação do efeito citotóxico dos compostos DSH65 e AP12 em células mononucleares (CM) de sangue periférico (SP)

As amostras de SP foram coletadas em tubo com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Após a coleta, as amostras foram diluídas em *phosphate buffered saline*

(PBS) na proporção 1:1 e gentilmente colocadas em tubos com Ficoll-Hypaque (densidade 1.077 g/m^3) na proporção 1:1 e, em seguida, centrifugadas a 300 g por 30 minutos. O sobrenadante foi retirado e a interface com as CM foi transferida para outro tubo contendo 10 mL de PBS. Após, a amostra foi centrifugada a 200 g por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi novamente descartado e as células foram suspensas em 2 mL de meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) e realizou-se a contagem das células (método de exclusão com corante Azul de Trypan) (TENNANT, 1964). Foram utilizadas somente as amostras em que a viabilidade celular encontrava-se maior ou igual a 95%. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços com densidade de $5,0 \times 10^5$ células/poço e incubadas com concentrações crescentes dos compostos (25-200 μM) a 37 °C com 5% de CO_2 por 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT.

4.4.2 Teste de hemólise

O teste de hemólise tem como finalidade avaliar a capacidade do composto em causar lise nas membranas dos eritrócitos e, com isso, a perda de integridade da membrana e extravasamento do conteúdo intracelular. Para os experimentos, as amostras de SP foram coletadas em tubos com citrato de sódio e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 265 g por 10 minutos e o plasma foi descartado.

O *pellet* de hemácias foi lavado três vezes com solução salina (NaCl 0,9%) e, em seguida, suspenso em salina a fim de obter uma dispersão estoque de eritrócitos. Posteriormente, foram preparados o controle positivo, constituído de 50 μL de dispersão de eritrócitos com adição de 950 μL de água destilada, e o controle negativo com 50 μL de dispersão de eritrócitos e 950 μL de salina. As amostras incubadas com os compostos foram diluídas em 950 μL de salina com adição de 50 μL de dispersão de eritrócitos. As amostras foram incubadas em termobloco (Thermomixer compact, Eppendorf[®]), sob agitação (100 g) por 1 hora à 37 °C e, em seguida, foram centrifugadas a 500 g por 5 minutos. Ao fim, o sobrenadante foi retirado e transferido para uma placa de 96 poços. O ensaio foi realizado em triplicata. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Microwell Systems, Organon Teknika[®]). A taxa de hemólise foi calculada de acordo com a quantidade de hemoglobina liberada devido à lise dos eritrócitos a partir da seguinte equação (SAHU et al., 2017):

$$\text{Taxa de hemolise (\%)}: \frac{(Dt - Dnc)}{(Dpc - Dnc)} \times 100$$

Onde: D_{OT}, densidade óptica da amostra teste; D_{Ocn}, densidade óptica do controle negativo; D_{Ocp}, densidade óptica do controle positivo.

4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE O CICLO CELULAR

A fim de avaliar o efeito dos compostos escolhidos nas diferentes fases do ciclo celular, foi utilizado o conjunto comercial PI/RNase Solution (Immunostep[®], Espanha), que consiste na coloração dos ácidos nucléicos pelo corante iodeto de propídio (PI) após a digestão do RNA pela enzima ribonuclease (RNase). O PI emite diferentes intensidades de fluorescência de acordo com a quantidade de DNA presente nas células, o que varia ao longo das fases do ciclo celular (GONG et al., 1994; POZAROWSKI; DARZYNKIEWICZ, 2004).

Para a realização dos experimentos, as células Daudi (5×10^5 células/poço) foram incubadas com os compostos na sua CI_{50} pelo período de 24 horas em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂. O controle negativo foi obtido a partir das células sem tratamento para posterior caracterização do estado basal das células. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS e fixadas com 200 µL de etanol 70% durante 30 min à 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS acrescido de 2% de albumina do soro bovino (BSA) a fim de evitar ligações inespecíficas. Por fim, o sobrenadante foi descartado, o sedimento foi suspenso com 300 µL de PI com RNase e a suspensão foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Os *doublets* foram excluídos após a realização de *gates* no canal PE (área x largura) e foram adquiridos 10.000 eventos em ciclo celular (*storage gate*) no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) com o *software* BD FACSDiva versão 6.1.2. Os resultados foram analisados no *software* Infinicyt versão 2.0 (Cytognos[®]).

4.6 DETERMINAÇÃO DA INDUÇÃO DA APOPTOSE

Para avaliar se os compostos escolhidos (DSH65 e AP12) induzem morte celular por apoptose nas células Daudi, foram utilizadas duas metodologias: avaliação da morfologia das células coradas com brometo de etídio (BE) (Sigma-Aldrich[®], EUA) e laranja de acridina (LA) (Sigma-Aldrich[®], EUA) por microscopia de fluorescência e avaliação da exposição dos resíduos de fosfatidilserina na membrana celular por citometria de fluxo (CF) pelo método da anexina-V. Para todos os ensaios foi realizado um controle negativo com células sem tratamento e os experimentos foram repetidos de forma independente por pelo menos três vezes.

4.6.1 Avaliação por microscopia de fluorescência das alterações morfológicas em células coradas com brometo de etídio (BE) e laranja de acridina (LA)

Para avaliar a indução à morte celular por apoptose, foi utilizada a microscopia de fluorescência e as células são coradas com brometo de etídio (BE) (Sigma-Aldrich[®], EUA) e laranja de acridina (LA) (Sigma-Aldrich[®], EUA). O método permite a avaliação morfológica por microscopia de fluorescência, o que possibilita determinar se elas estão em apoptose e/ou necrose. O corante LA é permeável à membrana citoplasmática e, ao interagir com o DNA, emite coloração verde quando observado ao microscópio de fluorescência, o que permite a identificação das células viáveis e com membrana íntegra. Já o corante BE não possui a capacidade de atravessar a membrana íntegra e permeia a célula somente quando há alguma perda na integridade da membrana celular, o que confere coloração vermelha às células mortas ou em processo de morte celular.

Para a realização do ensaio, as células Daudi (1×10^6 células/poço) foram incubadas com os compostos na sua CI_{50} de 24 h pelo período de 24 h, em estufa úmida com 5% de CO_2 a 37 °C. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS, o sobrenadante foi descartado, e o sedimento suspenso com 40 μ L de uma solução com BE (5 μ g/mL) e LA (10 μ g/mL) na proporção 1:1. Para a leitura em microscópio de fluorescência, 25 μ L da mistura foram transferidos para uma lâmina de vidro e a mesma foi recoberta por uma lamínula e posteriormente observada em microscópio de fluorescência (Nikon ECLIPSE Ni-U[®]) na objetiva de 20x. Foram observados e fotografados pelo menos dez campos diferentes.

O controle negativo utilizado foi preparado com células sem tratamento e os experimentos foram repetidos três vezes de forma independente.

4.6.2 Detecção da externalização dos resíduos de fosfatidilserina pelo método da Anexina-V por citometria de fluxo (CF)

A anexina-V é uma substância com afinidade pelos resíduos de fosfatidilserina que são externalizados na membrana citoplasmática no processo de apoptose celular. Com a exposição de fosfatidilserina, as células são fagocitadas e degradadas em fagolisossomas (KOOPMAN et al., 1994). Para a realização dos ensaios, as células Daudi (5×10^5 células/poço) foram incubadas com a CI_{50} de 24 horas pelo período de 24 horas em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO_2 . Também foi preparado um controle negativo, com células sem tratamento, a fim de caracterizar a expressão basal de fosfatidilserina. Após a incubação, as células foram centrifugadas e lavadas com 4 mL de PBS, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso com 500 μ L de buffer tampão (10 mM HEPES, 2,5 mM $CaCl_2$ e 140 mM NaCl). A partir dessa suspensão, foi retirada uma alíquota de 100 μ L, onde foram adicionados 5 μ L de anexina-V conjugada a FITC (BD Pharmingen™ - Catálogo: 556419). As amostras foram incubadas por 30 minutos na ausência de luz em temperatura ambiente. Foram adquiridos 20.000 eventos para cada amostra no citômetro de BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) com o *software* BD FACSDiva versão 6.1.2. Os resultados foram analisados no *software* Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®).

4.7 AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$)

Para avaliar o efeito dos compostos no $\Delta\Psi_m$ das células Daudi, foi utilizado o kit MitoView 633 (Biotium®, EUA). O MitoView é um corante fluorescente com capacidade de corar as mitocôndrias de células viáveis, sendo assim, ele permeia as membranas das células e se acumula na membrana da mitocôndria. Dessa forma, a fluorescência obtida produzida pelo corante é proporcional à integridade de membrana mitocondrial. Entretanto, o corante não

consegue permeabilizar as membranas com potencial mitocondrial comprometido. Assim, a fluorescência obtida é proporcional à integridade de membrana mitocondrial.

Para os experimentos, as células Daudi (5×10^5 células/poço) foram incubadas com os compostos (DSH65 e AP12) na CI_{50} de 24 horas pelo período de 12 horas, em estufa úmida a 37°C com 5% de CO_2 . Também foi preparado um controle negativo com células sem tratamento, a fim de caracterizar como encontrava-se o $\Delta\Psi_m$ das células em um estado basal. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas a 264 g por 5 minutos e lavadas com 4 mL de PBS, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300 μL da solução de MitoView 633 diluído 1:10.000, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos em geladeira na ausência de luz. Após a incubação, as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi retirado e suspenso em 300 μL de PBS. As amostras foram processadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) com o *software* BD FACSDiva versão 6.1.2, e a análise, foi realizada utilizando-se o *software* Infinicyt versão 2.0 (Cytognos[®]). Foram adquiridos 20.000 eventos e os *doublets* foram retirados com base nas características de *forward scatter* (FSC) (altura x área).

4.8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE (KI-67, BCL-2, BAX, AIF, FASR, CASPASE3 ATIVADA E SURVIVINA).

O envolvimento das proteínas pró-apoptóticas Bax, anti-apoptóticas Bcl-2, AIF, FasR, Caspase-3 ativada, survivina e Ki-67 na morte celular causada pelos compostos (DSH65 e AP12) foi realizada por citometria de fluxo. Em todos os experimentos, as células Daudi (1×10^5 células/ poço) foram incubadas com os compostos na CI_{50} de 24 horas, em estufa úmida a 37°C com 5% de CO_2 pelo período de 24 horas. Também foi preparado um controle negativo com células sem tratamento a fim de caracterizar a expressão basal das proteínas nas células. A fim de avaliar as proteínas intracelulares (Bax, Bcl-2, AIF, caspase-3 ativada, Ki-67 e survivina), foi utilizado o kit de permeabilização celular FIX&PERM[®] (Nordic-MUbio[®], Holanda). Para o FasR, foi utilizada a técnica de marcação direta, pois se tratava de uma proteína localizada na membrana celular.

Para a marcação das proteínas intracelulares, as células foram incubadas com os compostos DSH65 e AP12 por 24 horas e, após o período de incubação, as células foram centrifugadas a 264 g por 5 min e suspendidas com 4 mL de PBS, o sobrenadante foi descartado. Ao sedimento, foram adicionados 100 µL do reagente A (reagente de fixação) e a mistura foi incubada por 15 minutos ao abrigo da luz. Em seguida, foram adicionados novamente 4 mL de PBS e as células foram centrifugadas a 264 g por 5 min. Depois, o sobrenadante foi descartado e adicionados 100 µL do reagente B (reagente de permeabilização celular). Por fim, foi adicionado o volume correspondente do anticorpo de interesse e as células foram incubadas novamente por 15 minutos. Posteriormente, foram centrifugadas a 264 g por 5 min e suspendidas com 4 mL de PBS, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300 µL de PBS para adquirir as células em CF.

Para a marcação direta da proteína FasR, após incubação com os compostos (DSH65 e AP12) por 24 horas, as células foram centrifugadas a 264 g por 5 min e suspendidas com 4 mL de PBS, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso em 100 µL de PBS. Em seguida, foi adicionado o volume adequado do anticorpo, e as células foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente na ausência de luz. Após a incubação, as células foram novamente centrifugadas a 264 g por 5 min e suspendidas com 4 mL de PBS, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi suspenso com 300 µL de PBS.

Para a análise de todas as proteínas, foram adquiridos 20.000 eventos pelo citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) com o *software* BD FACSDiva versão 6.1.2. Os resultados foram analisados no *software* Infinicyt versão 2.0 (Cytognos[®]). Os *doublets* foram retirados utilizando-se as características de *forward scatter* (FSC) (altura x área). Os anticorpos usados na avaliação de proteínas envolvidas nos mecanismos de proliferação celular e apoptose estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 - Anticorpos usados na avaliação de proteínas relacionadas com a proliferação celular e apoptose.

Marcador	Clone	Fabricante	Nº Catalogo	Volume	Fluorocromo
Bax	B-9	Santa Cruz	SC-7480 PercP	5 µL	PercP
Bcl-2	Bcl-2/100	Exbio	1F-668-T100	4 µL	FITC
FasR	B-10	Santa Cruz	SC-8009 PE	5 µL	PE
AIF	E-1	Santa Cruz	SC-13116 FITC	5 µL	FITC
Caspase-3 ativada	C92-605	BD	560627	5 µL	V450
Ki-67	20 Raj1	eBioscience	11-5699-41	5 µL	FITC
Survivina	D-8	Santa Cruz	SC- 17779 PE	5 µL	PE

FITC: fluoresceína; PercP: Complexo proteína peridina-clorofila; PE: ficoeritrina; V450: *pacific blue*

4.9 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EROS

Para avaliar a produção de EROS pelos compostos, foi utilizado o kit *MitoSOX Red Molecular Probes* (ThermoFischer[®], EUA). O kit é composto por um corante fluorogênico capaz de permear a membrana das células viáveis e com afinidade pela mitocôndria. No interior das células, o reagente é oxidado pelo ânion superóxido e, assim, emite fluorescência vermelha. Para análise da produção de EROS pelos compostos, as células Daudi (1×10^5 células/ poço) foram incubadas com os compostos (DSH 65 e AP12) na CI_{50} de 24 horas, em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO_2 pelo período de 24 horas. Foi preparado um controle negativo com células sem tratamento para caracterizar a produção basal de EROS pelas células. Após 24 horas de incubação, as células foram centrifugadas a 264 g por 5 min e lavadas com 4 mL de PBS, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso em 300 µL da solução de MitoSOX 1:10.000, de acordo com as instruções do fabricante. Em

seguida, as células foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente na ausência de luz. Após a incubação, as células foram novamente centrifugadas a 264 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi suspenso com 300 μ L de PBS. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) com o *software* BD FACSDiva versão 6.1.2, e as análises dos dados pelo *software* Infinicyt versão 2,0 (Cytognos[®]). Foram adquiridos 20.000 eventos e os *doublets* foram retirados com base nas características de *forward scatter* (FSC) (altura x área).

4.10 ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados foram expressos como a média \pm erro-padrão da média (EPM) e cada experimento foi realizado, no mínimo, três vezes de forma independente. Para todas as análises, foi adotado um nível de confiança de 95%. Para os testes de citotoxicidade, os resultados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) *two way* seguida de teste *post-hoc* de *Bonferroni*. Para a avaliação dos compostos nas diferentes fases do ciclo celular, expressão dos resíduos de fosfatidilserina, das proteínas anti e pró-apoptóticas, da produção de EROS e da alteração do $\Delta\Psi_m$ foi analisada pelo teste t de *Student* não pareado, o qual compara cada grupo de tratamento ao grupo controle. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo *software* GraphPad Prism 5.

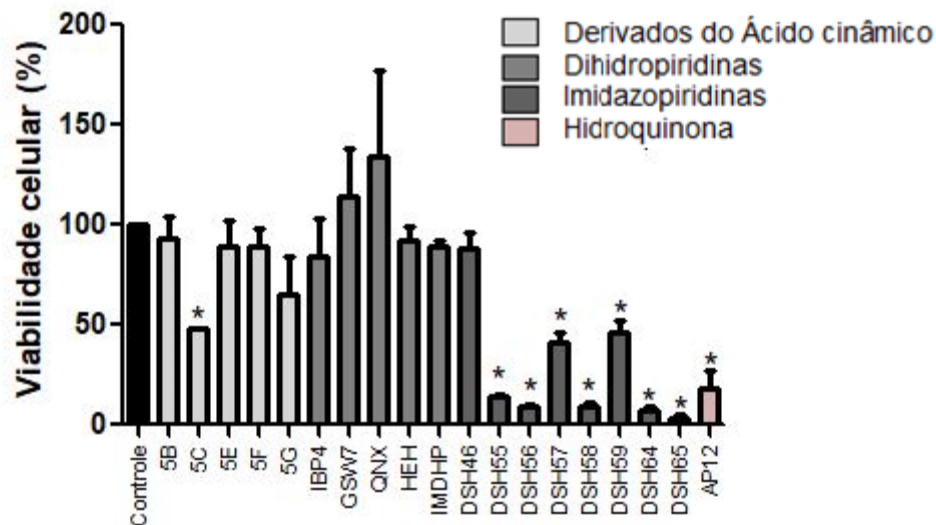
5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SINTÉTICOS E NATURAL SOBRE CÉLULAS DE LB (DAUDI)

5.1.1 Triagem de citotoxicidade dos compostos sintéticos sobre as células de linhagem de LB (Daudi)

Inicialmente, foi avaliado o efeito citotóxico de 18 compostos sintéticos (derivados do ácido cinâmico, imidazopiridinas e dihidropiridinas) sobre as células Daudi. Como pode ser observado na Figura 14, os compostos 5C, DSH55, DSH56, DSH57, DSH58, DSH59, DSH64 e DSH65 foram os que apresentaram redução significativa ($p \leq 0,05$) da viabilidade celular na concentração de 100 μM quando comparados ao grupo controle (células sem tratamento) na linhagem Daudi. Dentre os compostos sintéticos avaliados, o composto DSH65 foi o que obteve maior redução na viabilidade celular e, por isso, foi selecionado para dar continuidade ao estudo de mecanismo de ação. A investigação iniciou com a avaliação da citotoxicidade dos compostos em diferentes concentrações (1-100 μM) sobre linhagem Daudi e tempos de 24, 48 e 72h. Além disso, deu-se continuidade também com a investigação do mecanismo de ação do composto natural AP12, uma vez que um estudo anterior realizado no LOEH com uma plastoquinona (AP1), também isolada da alga *Desmarestia menziessi*, apresentou resultados promissores em células Daudi.

Figura 14 - Triagem de citotoxicidade dos compostos sintéticos derivados do ácido cinâmico, da dihidropiridinas, da imidazopiridinas e hidroquinona sobre células Daudi.

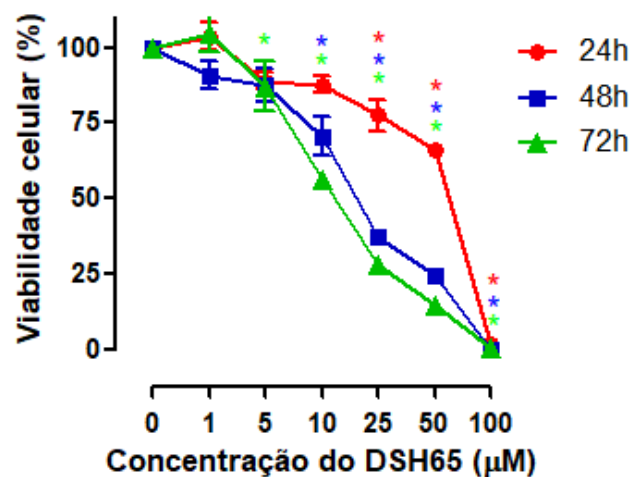


As células Daudi (1×10^5 células/poço) foram incubadas com os compostos sintéticos (derivados do ácido cinâmico, dihidropiridinas e imidazopiridinas) na concentração de $100 \mu\text{M}$ por 24 h e a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Os resultados expressam a média \pm EPM de três experimentos independentes. * Diferença significativa em relação ao grupo controle (células sem tratamento), $p \leq 0,05$. ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Tukey. Fonte: A AUTORA

5.1.2 Efeito citotóxico do composto DSH65 sobre células linhagem de LB (Daudi)

Como pode ser observado na Figura 15, o composto DSH65 diminuiu a viabilidade das células Daudi, com redução significativa ($p \leq 0,05$) da viabilidade celular a partir de $5 \mu\text{M}$ no período de 72 h e a partir de $10 \mu\text{M}$ no período de 24 e 48 h. A redução na viabilidade celular foi dependente da concentração e do tempo quando comparados os tempos de 24 h, 48 h e 72 h. A partir das curvas, foi possível calcular os valores de CI_{50} do composto DSH65 na linhagem Daudi e estão apresentados na Tabela 1.

Figura 15 - Efeito citotóxico do composto DSH65 sobre células Daudi



As células Daudi (1×10^5 células/poço - 24 h, 5×10^4 células/poço - 48 h e $2,5 \times 10^4$ células/poço - 72 h) foram incubadas com o composto DSH65 nas concentrações de 1, 5, 10, 25, 50 e 100 μM . A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa média \pm EPM de três experimentos independentes.

* $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle, ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Fonte: A AUTORA

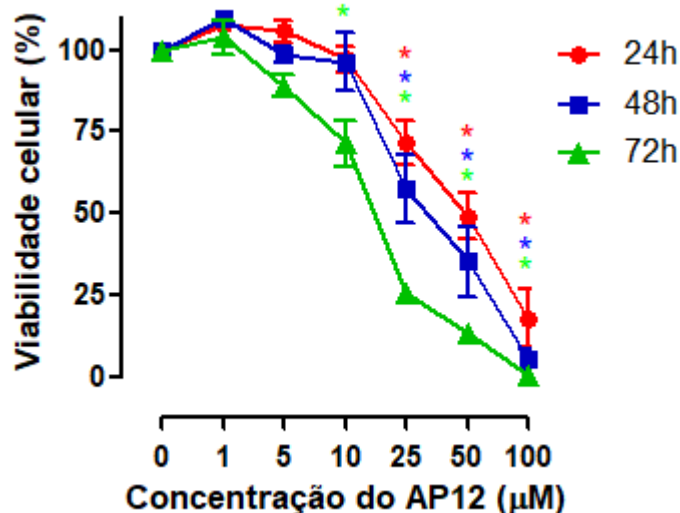
Tabela 1- Valores de CI_{50} calculados para as células Daudi após 24, 48 e 72 h de incubação com o composto DSH65.

Tempo	CI_{50} Daudi
24 h	$50,14 \pm 3,14 \mu\text{M}$
48 h	$17,62 \pm 0,87 \mu\text{M}$
72 h	$13,12 \pm 0,71 \mu\text{M}$

5.1.3 Efeito citotóxico do composto natural AP12 sobre células de linhagem de LB (Daudi)

Como pode ser observado na Figura 16, o composto AP12 diminuiu a viabilidade das células Daudi, com redução significativa ($p \leq 0,05$) da viabilidade celular a partir de 25 μM no período de 24 e 48 h e a partir de 10 μM no período de 72 h. A redução na viabilidade celular foi dependente do tempo e da concentração quando comparado os 24, 48 e 72 horas. A partir das curvas foi possível calcular os valores de CI_{50} do composto AP12 na linhagem Daudi, que estão apresentados na Tabela 2.

Figura 16 - Efeito citotóxico do composto AP12 em células Daudi



As células Daudi (1×10^5 células/poço - 24 h, 5×10^4 células/poço - 48 h e $2,5 \times 10^4$ células/poço - 72 h) foram incubadas com o composto AP12 nas concentrações de 1, 5, 10, 25, 50 e 100 μM . A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa média \pm EPM de três experimentos independentes.

* $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle, ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Fonte: A AUTORA

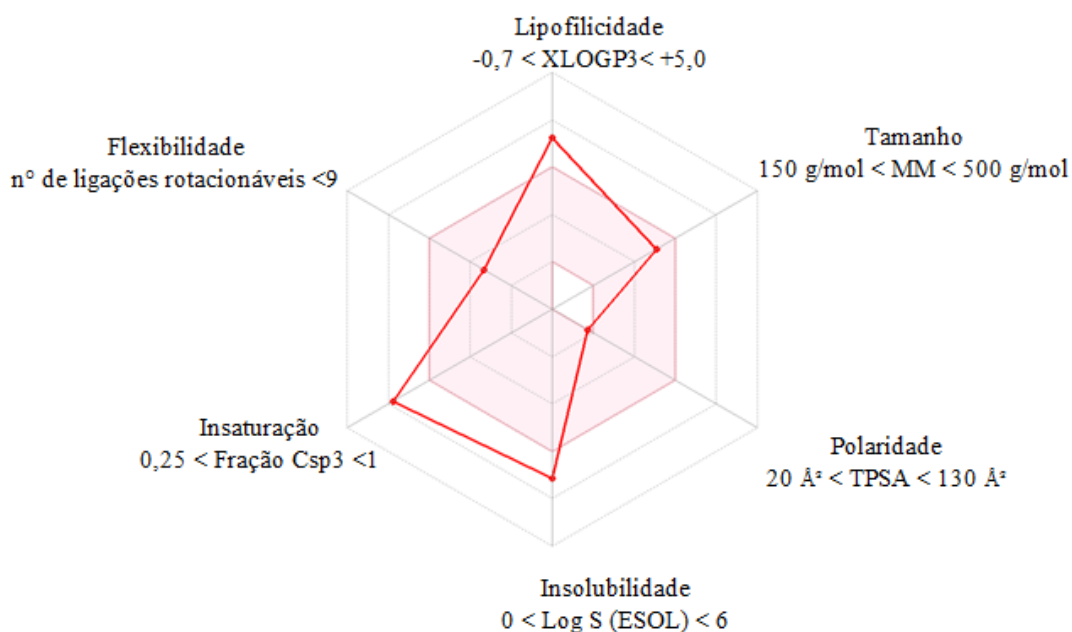
Tabela 2 Valores de CI_{50} calculados nas células Daudi após 24, 48 e 72 h de incubação com o composto AP12.

Tempo	CI_{50} Daudi
24 h	$51,86 \pm 2,22 \mu\text{M}$
48 h	$33,88 \pm 1,86 \mu\text{M}$
72 h	$15,13 \pm 0,89 \mu\text{M}$

5.2 PREDIÇÃO *IN SILICO* DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS

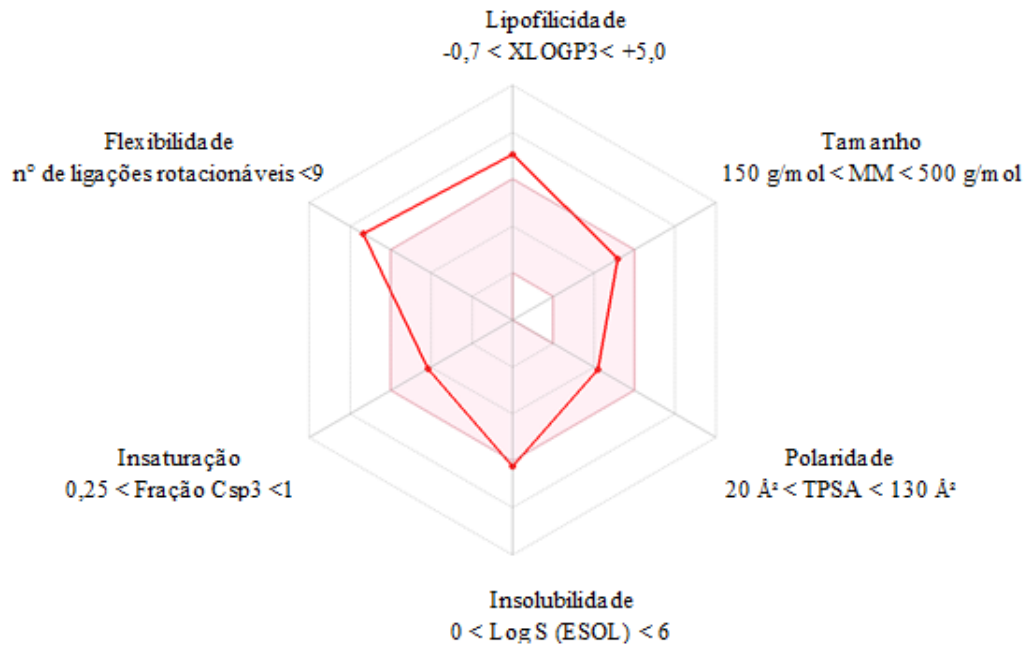
Os dados obtidos pela ferramenta de predição *in silico* SWISSADME estão apresentados na Tabela 3 e as características quanto à biodisponibilidade oral da DSH65 e do AP12 estão representadas nas Figuras 17 e 18. Também foi avaliada a acessibilidade sintética dos compostos e foi atribuído o valor de 3,15 e 4,61, respectivamente. Quando foram avaliadas as propriedades para o desenvolvimento de um novo fármaco, foram gerados dois alertas para o composto AP12 devido à presença do grupamento hidroquinona e alceno isolado, o que pode conferir uma possível toxicidade ao composto.

Figura 17 - Predição *in silico* da biodisponibilidade oral do composto DSH65



A zona pintada em rosa corresponde ao espaço físico-químico adequado para uma boa biodisponibilidade oral e a linha vermelha representa os parâmetros apresentados pelo composto DSH65. Fonte: Adaptado SWISSADME, 2020.

Figura 18 - Predição *in silico* da biodisponibilidade oral do composto AP12.



Nota: A zona pintada em rosa corresponde ao espaço físico-químico adequado para uma boa biodisponibilidade oral, e a linha vermelha representa os parâmetros apresentados pelo composto AP12. Fonte: Adaptado SWISSADME, 2020.

Tabela 3 - Predição *in silico* das características físico-químicas, farmacocinéticas e farmacológicas dos compostos DSH65 e AP12.

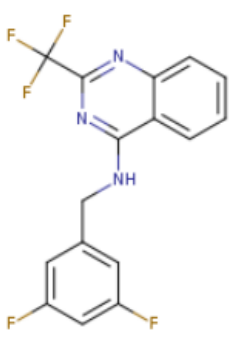
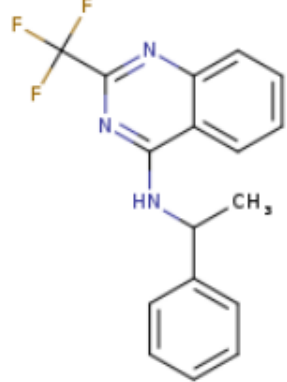
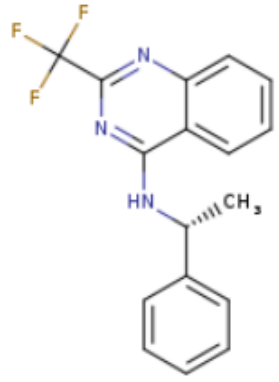
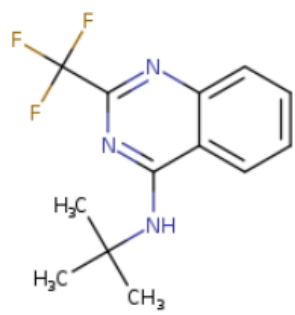
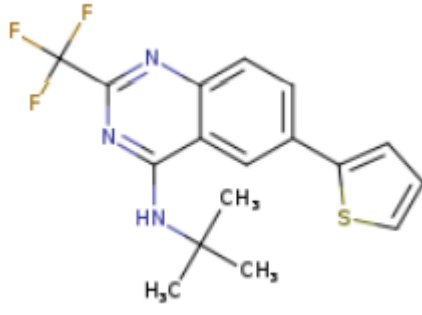
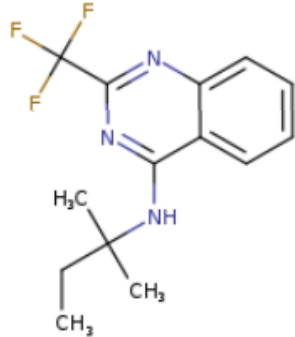
Propriedades físico-químicas		
	DSH65	AP12
Formula	C ₂₂ H ₁₁ F ₆ N ₂	C ₂₇ H ₄₀ O ₄
Peso Molecular	420,35 g / mol	428.60 g/mol
Número de Átomos Pesados	30	31
Fração Csp ³	0,14	0,48
Número de ligações rotacionáveis	5	11
Aceptores de ligações de hidrogênio	7	4
Doadores de ligações de hidrogênio	0	4
Refratividade Molar	100,08	132,18
Área de superfície polar topológica (TPSA)	17,30 Å ²	80,92Å ²
Log P o/w	3,49	4,65
Log P o/w (XLOGP3)	6,85	7,15
Solubilidade em água	Pouco solúvel	Pouco solúvel
Características farmacocinéticas		
Absorção gastrointestinal	Baixo	Alto
Permeação da barreira hematoencefálica	Não	Não
Substrato da glicoproteína-P (P-gp)	Sim	Não
Inibidor da CYP1A2	Sim	Sim
Inibidor da CYP2C19	Sim	Não
Inibidor da CYP2C9	Não	Sim
Inibidor da CYP2D6	Sim	Não
Inibidor da CYP3A4	Não	Sim
Características farmacológicas		
Lipinski	Sim (nenhuma violação)	Sim (nenhuma violação)
Ghose	Não	Não
Veber	Sim	Não
Egan	Não	Não
Muegge	Não	Não
Escore de biodisponibilidade	0,55	0,55

Fonte: Adaptado SWISSADME, 2020.

Outra ferramenta utilizada para a predição da atividade farmacológica dos compostos DSH65 e AP12 foi o *SWISStargetprediction*. A ferramenta comparou a estrutura 2D/3D dos compostos com a sua base de dados e alguns dos possíveis alvos farmacológicos apresentados para os compostos DSH65 e AP12, com maior probabilidade, foram CDK2/ciclina E (CCNE2, CDK2 e CCNE1) para o composto DSG65 (Quadros 2) e CDK2/ciclina E (CCNE2,

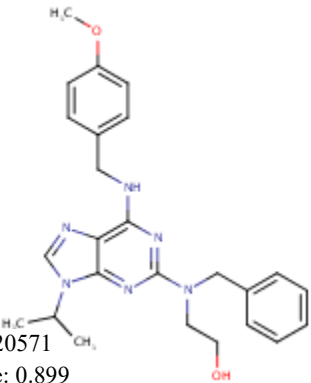
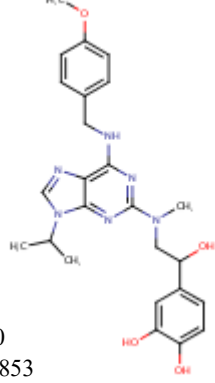
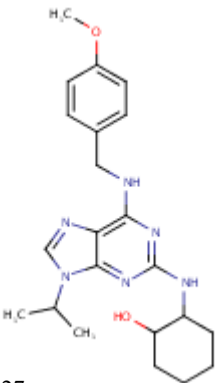
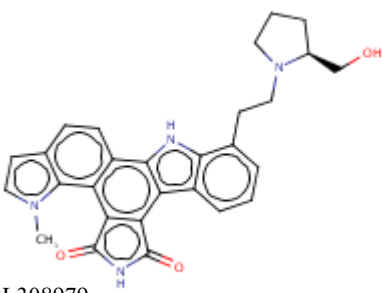
CDK2 e CCNE1), PI3K - p110-alpha/p85-alpha (PIK3CA e PIK3R1) e Glicoproteína-P (ABCB1) para o composto AP12 (Quadros 3, 4 e 5).

Quadro 2 - Resultados obtidos na predição *in silico* pelo SWISStargetprediction

Ligantes CCNE2, CDK2 e CCNE com similaridade baseada em 3D		
 <p>CHEMBL16355 Similaridade: 0.823</p>	 <p>CHEMBL16205 Similaridade: 0.803</p>	 <p>CHEMBL418173 Similaridade: 0.803</p>
 <p>CHEMBL15872 Similaridade: 0.801</p>	 <p>CHEMBL15790 Similaridade: 0.788</p>	 <p>CHEMBL16298 Similaridade: 0.784</p>

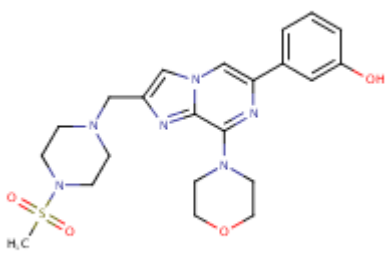
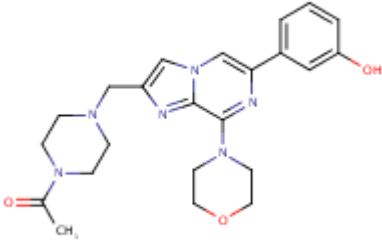
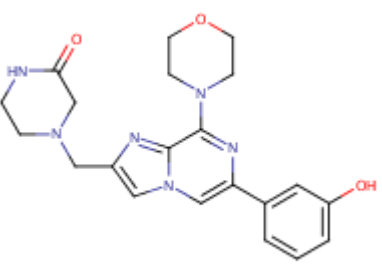
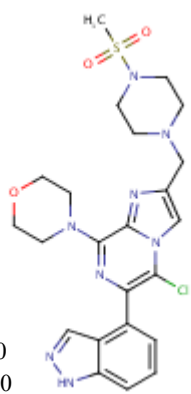
Fonte: Adaptado SWISStargetprediction.

Quadro 3 Resultados obtidos na predição *in silico* pelo SWISStargetprediction
Ligantes CCNE2, CDK2 e CCNE1 com similaridade baseada em 3D

 <p>CHEMBL420571 Similaridade: 0.899</p>	 <p>CHEMBL90300 Similaridade: 0.853</p>
 <p>CHEMBL90082 Similaridade: 0.827</p>	 <p>CHEMBL308979 Similaridade: 0.813</p>

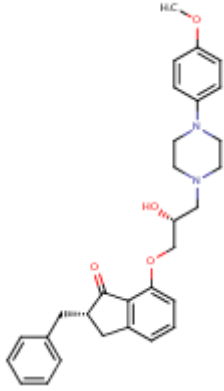
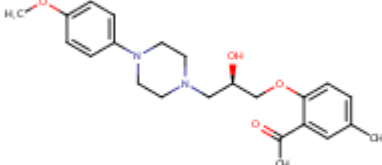
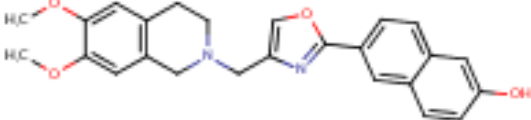
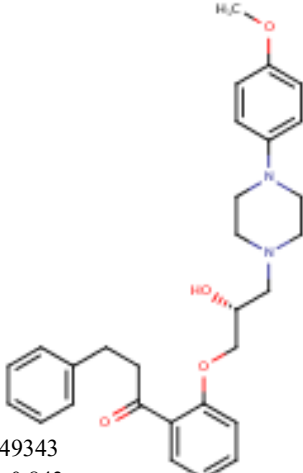
Fonte: Adaptado SWISStargetprediction.

Quadro 4 - Resultados obtidos na predição *in silico* pelo SWISStargetprediction

Ligantes PIK3CA e PIK3CA com similaridade baseada em 3D	
 <p>CHEMBL1957492 Similaridade: 0.887</p>	 <p>CHEMBL1957491 Similaridade: 0.868</p>
 <p>CHEMBL1957493 Similaridade: 0.843</p>	 <p>CHEMBL1957500 Similaridade: 0.830</p>

Fonte: Adaptado SWISStargetprediction.

Quadro 5 - Resultados obtidos na predição *in silico* pelo SWISStargetprediction

Ligante ABCB1 com similaridade baseada em 3D	
 <p>CHEMBL2449427 Similaridade: 0.897</p>	 <p>CHEMBL2449485 Similaridade: 0.854</p>
 <p>CHEMBL2338111 Similaridade: 0.847</p>	 <p>CHEMBL2449343 Similaridade: 0.843</p>

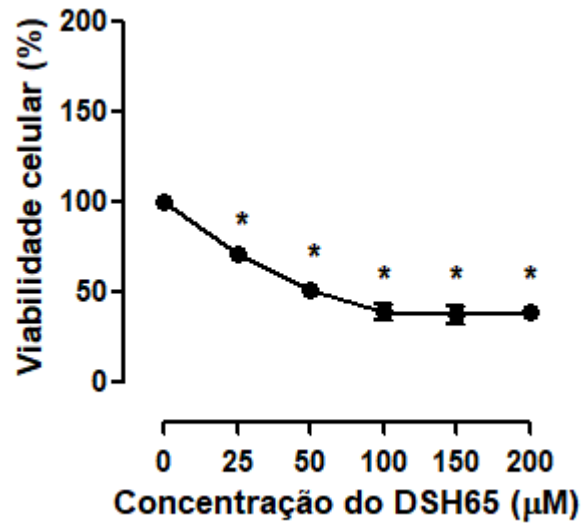
Fonte: Adaptado SWISStargetprediction.

5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS DSH65 E AP12 SOBRE CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO (SP)

5.3.1 Efeito citotóxico do composto DSH65 em células mononucleares (CM) em SP

Como é possível observar na Figura 19, o composto DSH65 foi citotóxico para CM a partir da concentração de 25 μM no período de incubação de 24 h, quando comparado ao controle (células sem tratamento). Apesar de ser citotóxico para essas células (CI_{50} de $74,08 \pm 1,62 \mu\text{M}$), o seu efeito é 1,5 vezes maior do que a encontrada após incubação com o composto em células Daudi, por 24 h.

Figura 19 - Efeito citotóxico do composto DSH65 em células mononucleares em SP.

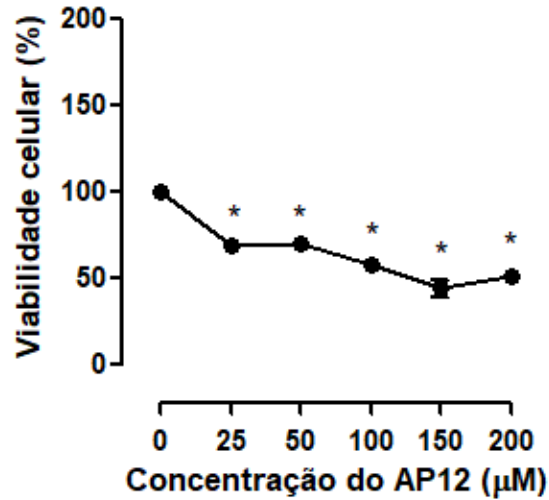


As células mononucleadas de SP (5×10^5 células/poço) foram incubadas com o composto DSH65 nas concentrações de 25 a 200 µM por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa média \pm EPM de três experimentos independentes. * $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle, ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni. Fonte: A AUTORA

5.3.2 Efeito citotóxico do composto AP12 em células mononucleares em sangue periférico (SP)

Como é possível observar na Figura 20, o composto AP12 foi citotóxico para CM a partir da concentração de 25 µM no período de incubação de 24 h com concentrações crescentes do composto (25-200 µM), quando comparado ao controle (células sem tratamento). Apesar de ser citotóxico para as células (CI_{50} de $130,9 \pm 2,95$ µM), o seu efeito é 2,5 vezes maior do que a encontrada após incubação com o composto em células Daudi, por 24 h.

Figura 20 - Efeito citotóxico do composto AP12 em células mononucleares em sangue periférico (SP).

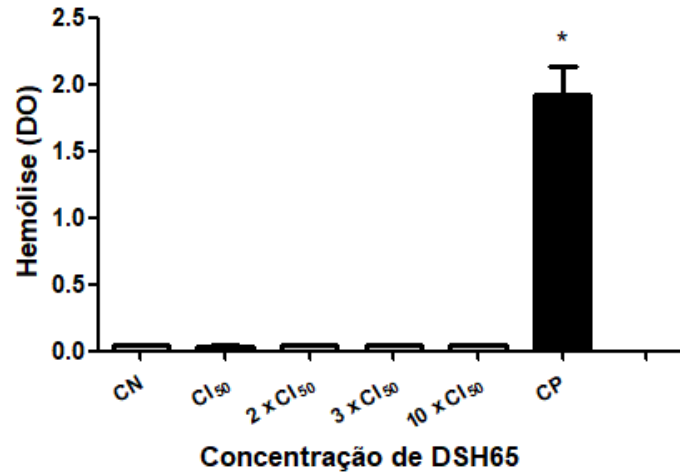


As células mononucleadas de SP (5×10^5 células/poço) foram incubadas com o composto DSH65 nas concentrações de 25 a 200 µM por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa média \pm EPM de três experimentos independentes. * $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle, ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni. Fonte: A AUTORA

5.3.3 Avaliação do efeito hemolítico induzido pelo composto DSH65 em eritrócitos humanos.

O efeito do composto DSH65 sobre os eritrócitos isolados do SP de indivíduos considerados saudáveis foi avaliado nas concentrações de 17,65 µM (CI_{50}), 35,24 µM ($2 \times CI_{50}$), 52,95 µM ($3 \times CI_{50}$) e 176,5 µM ($10 \times CI_{50}$). A Tabela 4 apresenta os valores de hemólise encontrados em cada concentração, também representados na Figura 21. Os dados apresentados demonstram que o composto DSH65 não possui efeito hemolítico significativo em eritrócitos quando comparado ao controle negativo mesmo em concentrações dez vezes superiores à sua CI_{50} de 48 horas.

Figura 21 - Efeito do composto DSH65 sobre eritrócitos de SP.



A hemólise está representada pela densidade óptica (DO) dos eritrócitos após o tratamento com o composto. As amostras de SP foram coletadas em tubo de citrato e a solução de hemácias foi preparada a partir do protocolo experimental. Os ensaios foram realizados em triplicata, com pelo menos três amostras coletadas de diferentes indivíduos. * $P \leq 0,05$ quando comparado ao controle negativo, ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Tukey Nota: CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo. Fonte: A AUTORA

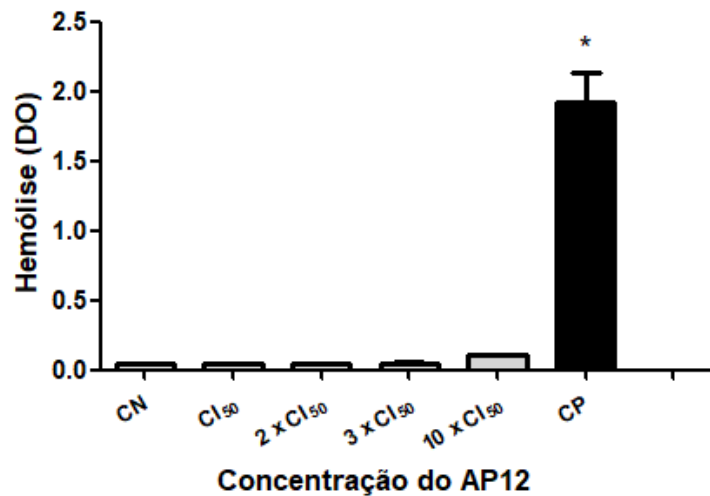
Tabela 4 - Taxa de hemólise (%) provocada pelo composto DSH65 em diferentes concentrações

DSH65	CI ₅₀	2 x CI ₅₀	3 x CI ₅₀	10 x CI ₅₀
Hemólise (%)	0	0,217 ± 0,33	0,065 ± 0,12	0,103 ± 0,11

5.3.4 Avaliação do efeito hemolítico induzido pelo composto AP12 em eritrócitos humanos

O efeito do composto AP12 em eritrócitos isolados do SP de indivíduos considerados saudáveis foi avaliado nas concentrações de 33,88 μM (CI₅₀ de 48 h), 67,76 μM (2 x CI₅₀ de 48 h), 101,64 μM (3 x CI₅₀ de 48 h) e 338,8 (10 x CI₅₀ de 48 h). Como pode ser observado na Figura 22, o composto AP12 não possui efeito hemolítico significativo em eritrócitos quando comparado ao controle negativo em concentrações dez vezes superiores à sua CI₅₀ de 48 horas (Tabela 5).

Figura 22 - Efeito do composto AP12 sobre eritrócitos de SP.



A hemólise está representada pela densidade óptica (DO) após tratamento dos eritrócitos com o composto. As amostras de SP foram coletadas em tubo de citrato e a solução de hemácias foi preparada a partir do protocolo experimental. Os ensaios foram realizados em triplicata, com pelo menos três amostras coletadas de diferentes indivíduos. * $P \leq 0,05$ quando comparado ao controle negativo, ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Tukey Nota: CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo. Fonte: A AUTORA

Tabela 5 - Taxa de hemólise (%) provocada pelo composto AP12 em diferentes concentrações.

AP12	CI ₅₀	2 x CI ₅₀	3 x CI ₅₀	10 x CI ₅₀
Hemólise (%)	0,318 ± 0,16	0,370 ± 0,17	0,572 ± 0,19	3,424 ± 0,80

5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS DSH65 e AP12 SOBRE O CICLO CELULAR

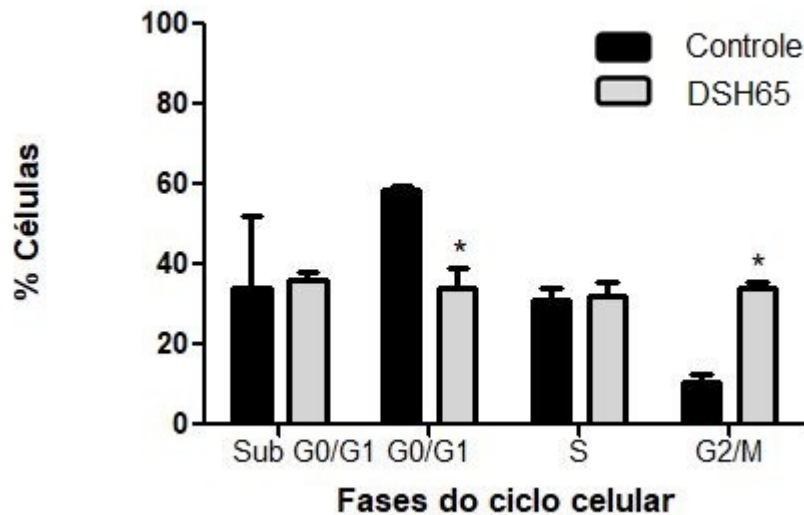
O efeito dos compostos na progressão do ciclo celular das células Daudi foi avaliado após a incubação com os compostos nas suas respectivas CI₅₀ de 24 h pelo período de 24 h. A Tabela 6 e as Figuras 23 e 24 mostram a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular. As células Daudi quando tratadas com o composto DSH65 apresentaram diferença significativa no percentual de células nas fases G0/G1 e G2/M do ciclo celular quando comparadas ao grupo controle. Já quando incubadas com o composto AP12, não houve diferença significativa no percentual de células nas fases do ciclo celular, quando comparadas ao grupo controle.

Tabela 6 - Efeito dos compostos nas diferentes fases do ciclo celular das células Daudi.

	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	Sub G0/G1 (%)
Controle	58,45 ± 1,15	31,10 ± 3,2	10,45 ± 2,05	34,15 ± 18,05
DSH65	34,10 ± 5,10*	31,95 ± 3,50	34,00 ± 1,60*	36,10 ± 1,80
AP12	54,90 ± 2,20	29,65 ± 0,15	15,55 ± 2,35	42,65 ± 3,95

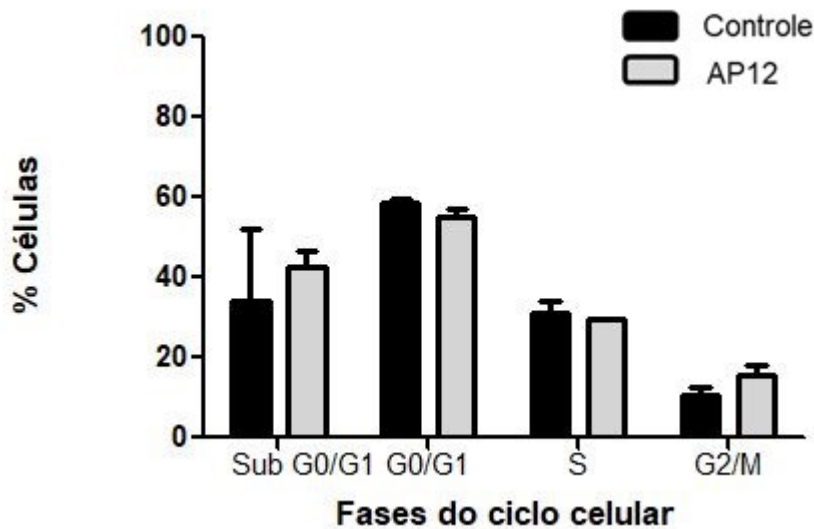
As células Daudi ($5,0 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas pelo período de 24 horas com os compostos nas suas CI_{50} de 24h, já os grupos controle são células sem nenhum tratamento. As fases do ciclo celular estão apresentadas como G0/G1, S e G2/M. As análises foram feitas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e foram avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®). Os percentuais representam a média ± EPM de pelo menos dois experimentos independentes, teste t de *Student*. Fonte: A AUTORA

Figura 23 Efeito do composto DSH65 na progressão do ciclo celular das células Daudi.



As células Daudi ($5,0 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas pelo período de 24 horas com o composto na sua CI_{50} de 24h, já o grupo controle representam células sem nenhum tratamento. As fases do ciclo celular estão representadas como G0/G1, S e G2/M. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e analisadas no *software Infinicyt* versão 2.0 (Cytognos®). Os gráficos representam a média ± EPM de pelo menos dois experimentos independentes, teste t de *Student*. Fonte: A AUTORA.

Figura 24 - Efeito do composto AP12 na progressão do ciclo celular das células Daudi



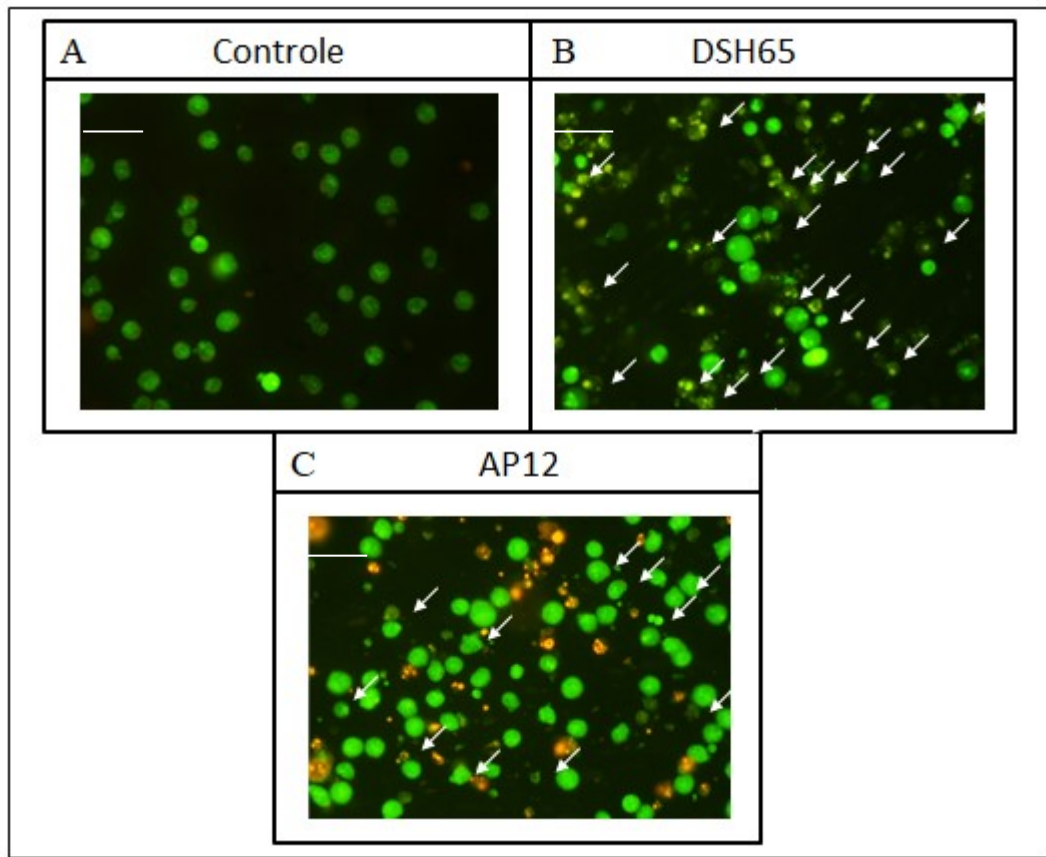
As células Daudi ($5,0 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas pelo período de 24 horas com o composto na sua CI_{50} de 24h, já o grupo controle representam células sem nenhum tratamento. As fases do ciclo celular estão representadas como G0/G1, S e G2/M. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACS Canto™ II e analisadas no *software Infinicyt* versão 2.0 (Cytognos®). Os gráficos representam a média \pm EPM de pelo menos dois experimentos independentes, teste t de *Student*. Fonte: A AUTORA

5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS DSH65 E AP12 SOBRE A APOPTOSE

5.5.1 Avaliação das alterações morfológicas por microscopia de fluorescência com BE e LA

Após a incubação das células com a CI_{50} de 24 h dos compostos DSH65 e AP12 por 24 h, foi possível observar que as células Daudi apresentaram características de apoptose inicial, as quais apresentaram membrana íntegra e condensação da cromatina, observadas nas células coradas em verde com LA (representadas pelas setas brancas na Figura 25). Também foi possível observar a presença de células em apoptose tardia, em que é observada a perda da integridade de membrana e, por isso, as células apresentam a coloração alaranjada do BE. Após a incubação do composto AP12, também foi possível observar a presença de células com característica de apoptose inicial e apoptose tardia. As células apoptóticas estão indicadas pelas setas brancas na Figura 25.

Figura 25 - Alterações morfológicas induzidas pelos compostos em células Daudi.

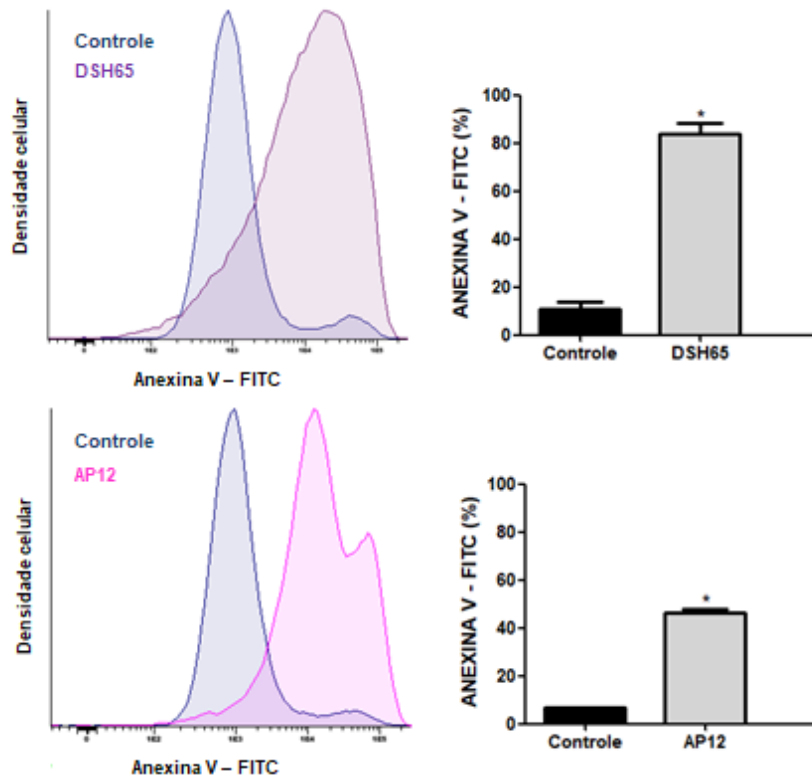


As células Daudi (1×10^6 células/poço) foram incubadas com o composto na CI_{50} de 24 h e foram coradas com solução 1:1 de BE/LA. O grupo controle esta representado por células sem tratamento (A). As células foram observadas em microscópio de fluorescência na magnitude de 200x e foram fotografados, pelo menos, dez campos. As setas indicam as células que estão em apoptose. Painel A: Controle. Painel B: composto DSH65. Painel C: composto AP12. Os resultados apresentados foram obtidos de no mínimo dois experimentos independentes. Escala: $10\mu\text{m}$. Fonte: A AUTORA

5.5.2 Detecção da externalização dos resíduos de fosfatidilserina pelo método da Anexina-V por CF

Como demonstrado na Figura 26, após a incubação das células Daudi com os compostos, houve um aumento significativo da expressão dos resíduos de fosfatidilserina nessas células de $83,75 \pm 4,55\%$ e $46,10 \pm 1,7\%$ quando incubadas com o DSH65 e AP12, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle (células sem tratamento).

Figura 26 - Efeito dos compostos na exposição dos resíduos de fosfatidilserina em células Daudi por meio do método da anexina-V

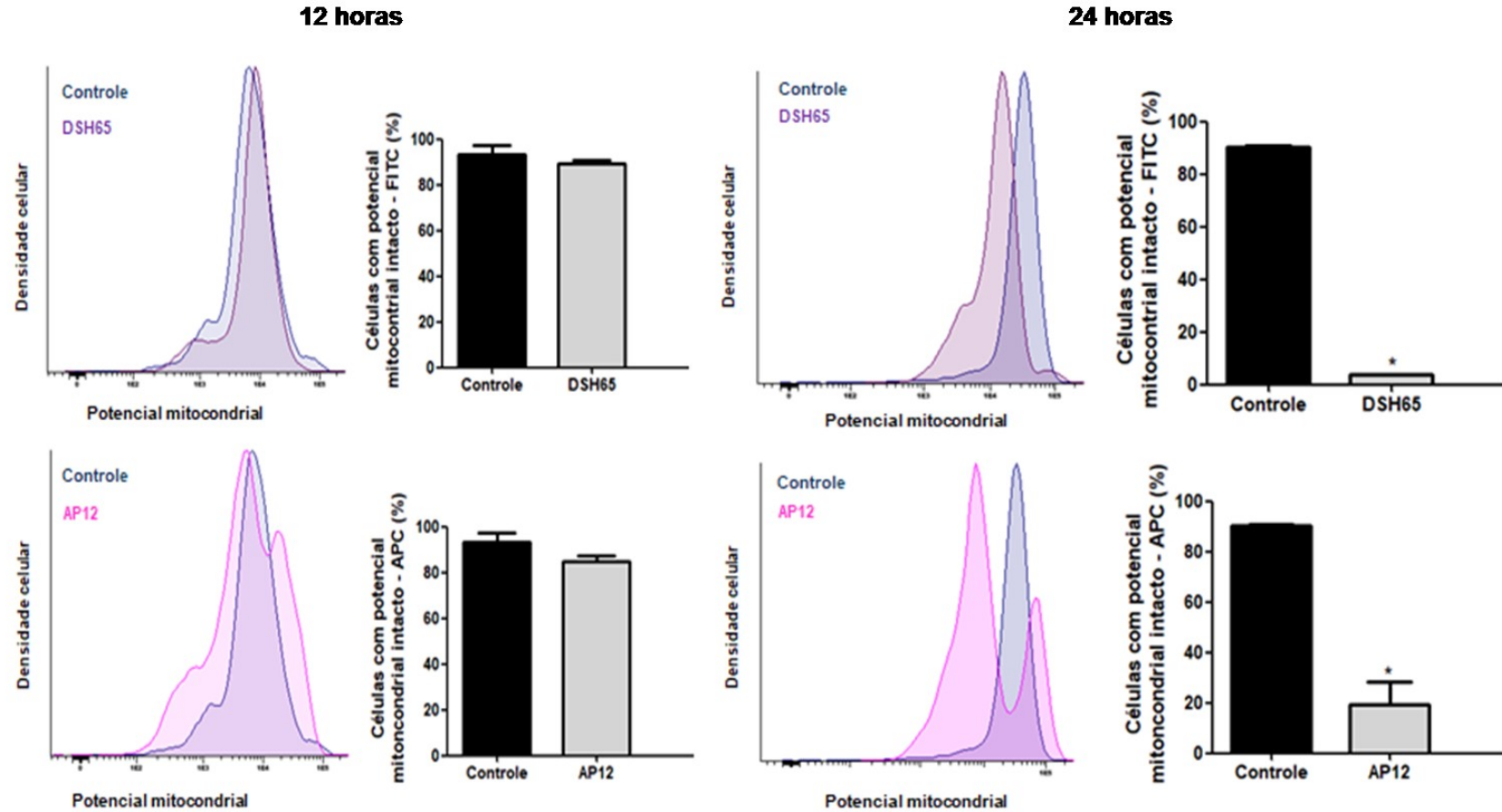


As células Daudi ($5,0 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença dos compostos na sua CI_{50} de 24 h. A porcentagem da expressão dos resíduos de fosfatidilserina foram determinadas por meio de CF após a marcação com anexina-V conjugada a FITC. As análises foram feitas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e foram avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®). Os histogramas apresentados são ilustrativos de um único experimento e os gráficos apresentam a média \pm EPM de, no mínimo, dois experimentos independentes. * $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle, teste t de *Student* para amostras independentes. Fonte: A AUTORA.

5.6 AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL

Foi avaliado o efeito dos compostos sobre o $\Delta\Psi_M$ das células Daudi após incubação com CI_{50} de 24h dos compostos por 24 h. Na Figura 27, é possível observar que houve uma redução significativa ($p \leq 0,05$) de $96,35 \pm 0,35\%$ do $\Delta\Psi_M$ das células Daudi quando incubadas com o DSH65 e de $80,85 \pm 9,15\%$ das células quando incubadas com o composto AP12. Além disso, visto que os compostos DSH65 e AP12 causaram perda $\Delta\Psi_M$ após incubação com a CI_{50} de 24 h por 24 h, também foi avaliado o efeito dos compostos sobre o $\Delta\Psi_M$ após incubação de 12 h em células Daudi. Assim, foi possível observar na Figura 10 que não houve redução significativa para ambos os compostos, pois, quando incubado com DSH65 houve uma redução de $10,9 \pm 1,8\%$ do $\Delta\Psi_M$ e de $15,4 \pm 2,6\%$ quando incubada com o composto AP12.

Figura 27 - Efeito dos compostos no $\Delta\Psi_m$ de células Daudi após 12 h e 24 h de incubação



As células Daudi ($5,0 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença dos compostos na sua CI_{50} de 24 h. A porcentagem de células com $\Delta\Psi_m$ intacto foram determinadas por meio de CF após a marcação com o kit MitoView 633. As análises foram feitas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e foram avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®). Os histogramas apresentados são ilustrativos de um único experimento e os gráficos apresentam a média \pm EPM de, no mínimo, dois experimentos independentes. * $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle, teste t de *Student* para amostras independentes. Fonte: A AUTORA.

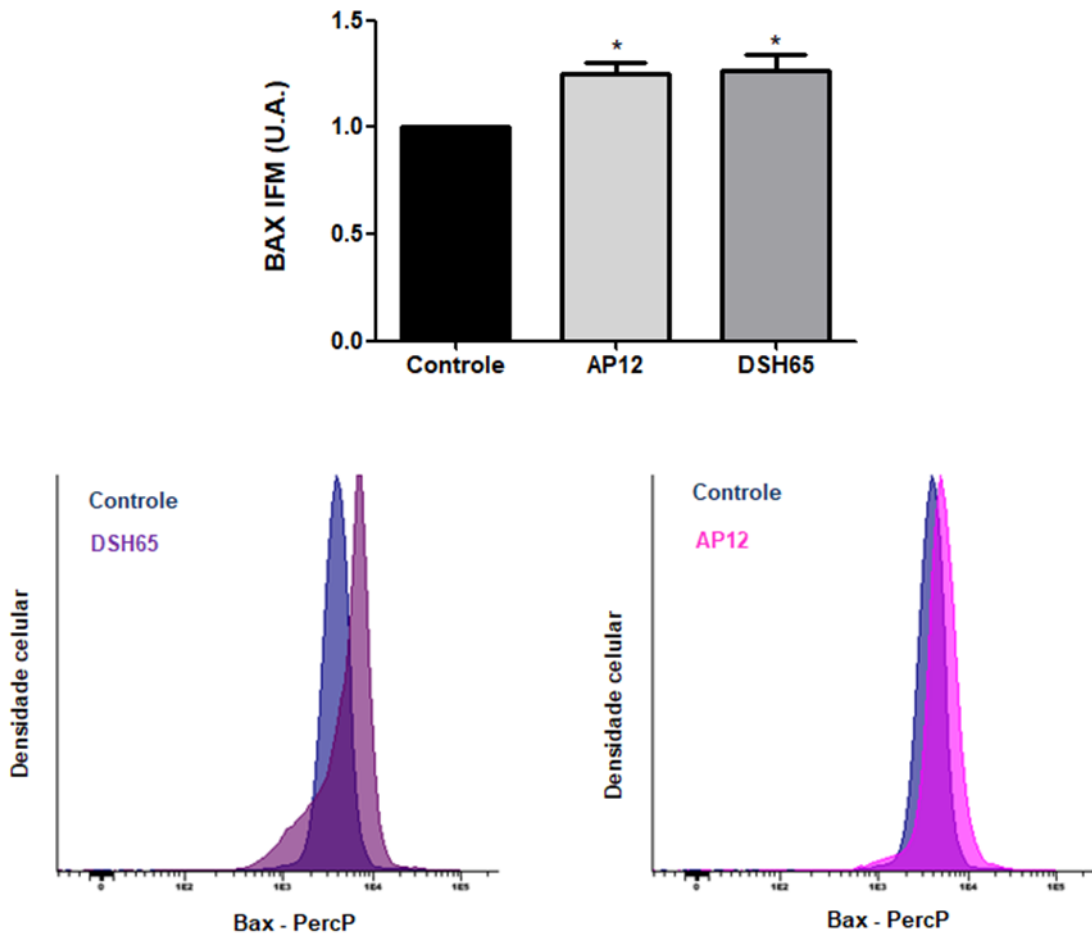
5.7 AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE (KI-67, BCL-2, BAX, AIF, FasR, CASPASE3 ATIVADA E SURVIVINA).

Para avaliar se apoptose causada pelos compostos estava relacionada à apoptose intrínseca e/ou extrínseca, foram avaliadas diferentes proteínas que estão envolvidas nessas duas vias de morte celular. Em todas as análises, as células Daudi foram incubadas com a CI_{50} de 24 h dos compostos pelo período de 24 h.

5.7.1 Investigação do efeito dos compostos sobre as proteínas da família Bcl-2 (Bax e Bcl-2)

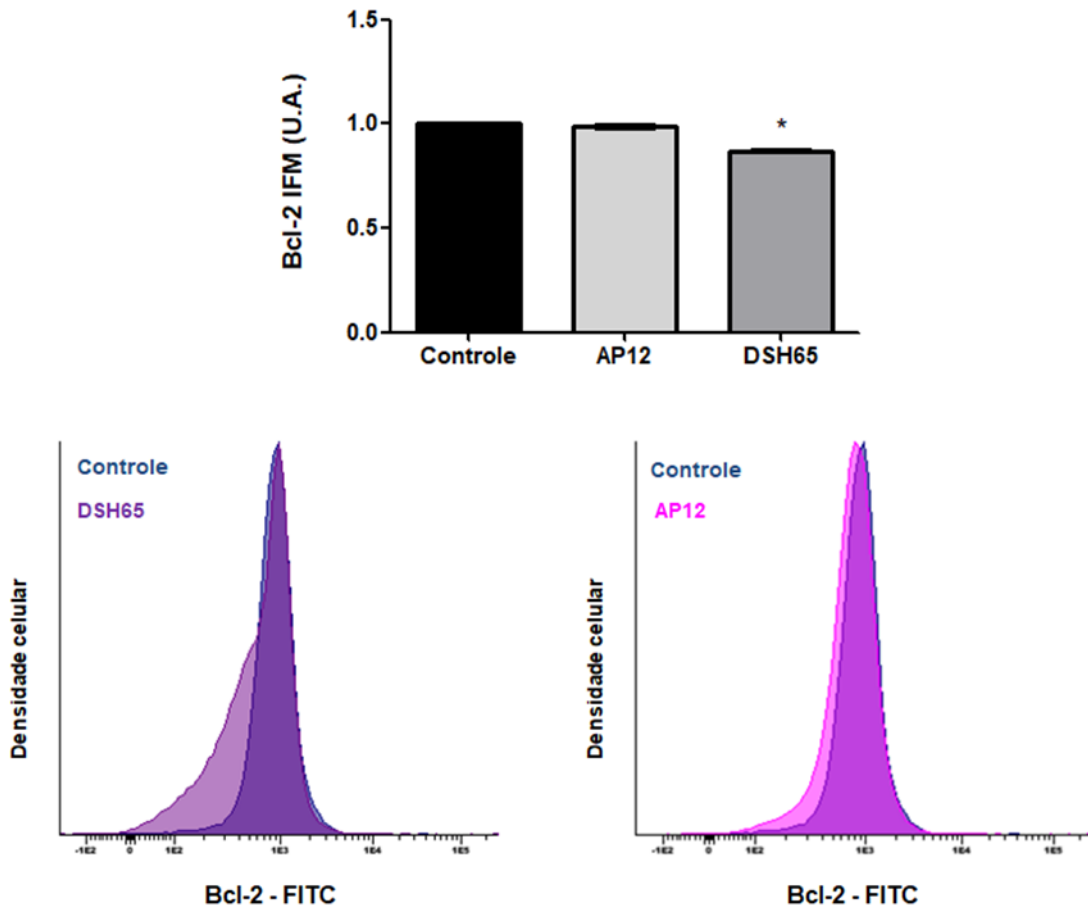
Como pode ser observado na Figura 28, o tratamento das células Daudi com os compostos DSH65 e AP12 por 24 h causou um aumento de $1,26 \pm 0,08$ vezes e de $1,25 \pm 0,05$ vezes na expressão de Bax, respectivamente, em relação ao controle (células sem tratamento). Como apresentado na Figura 29, houve uma diminuição significativa da expressão de Bcl-2 de $0,86 \pm 0,01$ vezes, em comparação ao grupo controle (células sem tratamento), após incubação de 24 h com o composto DSH65. Entretanto, em relação ao composto AP12, não houve diferença significativa. Também é possível observar que a relação Bax/Bcl-2 nas células tratadas com o composto DSH65 e AP12 foram de 1,46 e de 1,28, respectivamente, o que mostra o estímulo pró-apoptótico de ambos compostos.

Figura 28 - Efeito dos compostos na expressão das proteínas Bax em células Daudi.



As células Daudi ($5,0 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença dos compostos na sua CI_{50} de 24 h. O IFM foi determinada por meio de CF após a marcação com os anticorpos anti-Bax conjugado a PercP e anti-Bcl-2 conjugado a FITC. As análises foram feitas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e foram avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®). Os histogramas apresentados são ilustrativos de um único experimento e os gráficos apresentam a média \pm EPM de, no mínimo, dois experimentos independentes. * $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle, teste t de *Student*. Fonte: A AUTORA. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias

Figura 29 - Efeito dos compostos na expressão das proteínas Bcl-2 em células Daudi.

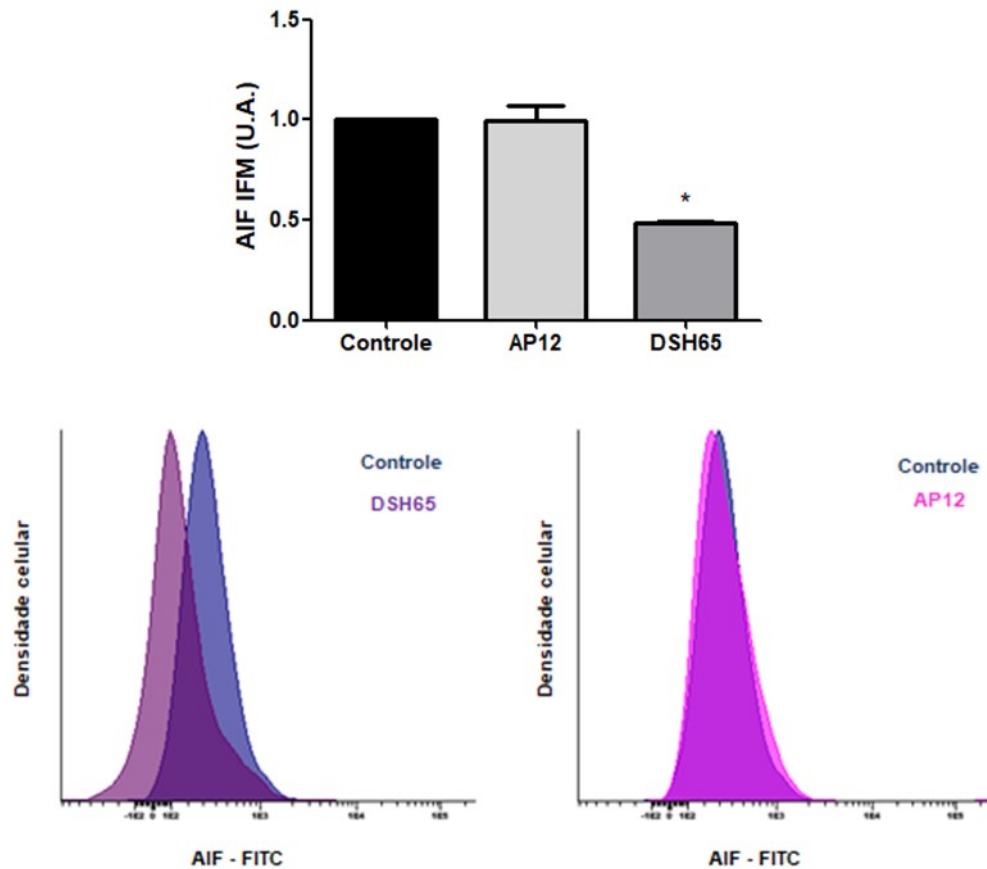


As células Daudi ($5,0 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença dos compostos na sua CI_{50} de 24 h. O IFM foi determinada por meio de CF após a marcação com os anticorpos anti Bax conjugado a PercP e anti Bcl-2 conjugado a FITC. As análises foram feitas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e foram avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®). Os histogramas apresentados são ilustrativos de um único experimento e os gráficos apresentam a média \pm EPM de, no mínimo, dois experimentos independentes. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle, teste t de *Student*. Fonte: A AUTORA. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias

5.7.2 Investigação do efeito dos compostos sobre o fator indutor de apoptose (AIF)

Com base na Figura 30, é possível observar que houve uma diminuição da expressão de AIF, quando incubado com o composto DSH65, visto que houve uma diminuição de $0,48 \pm 0,01$ vezes, quando comparado com o controle (células sem tratamento), já com relação ao composto AP12, é possível observar que não houve diferença significativa.

Figura 30 - Efeito dos compostos na expressão da proteína AIF em células Daudi.

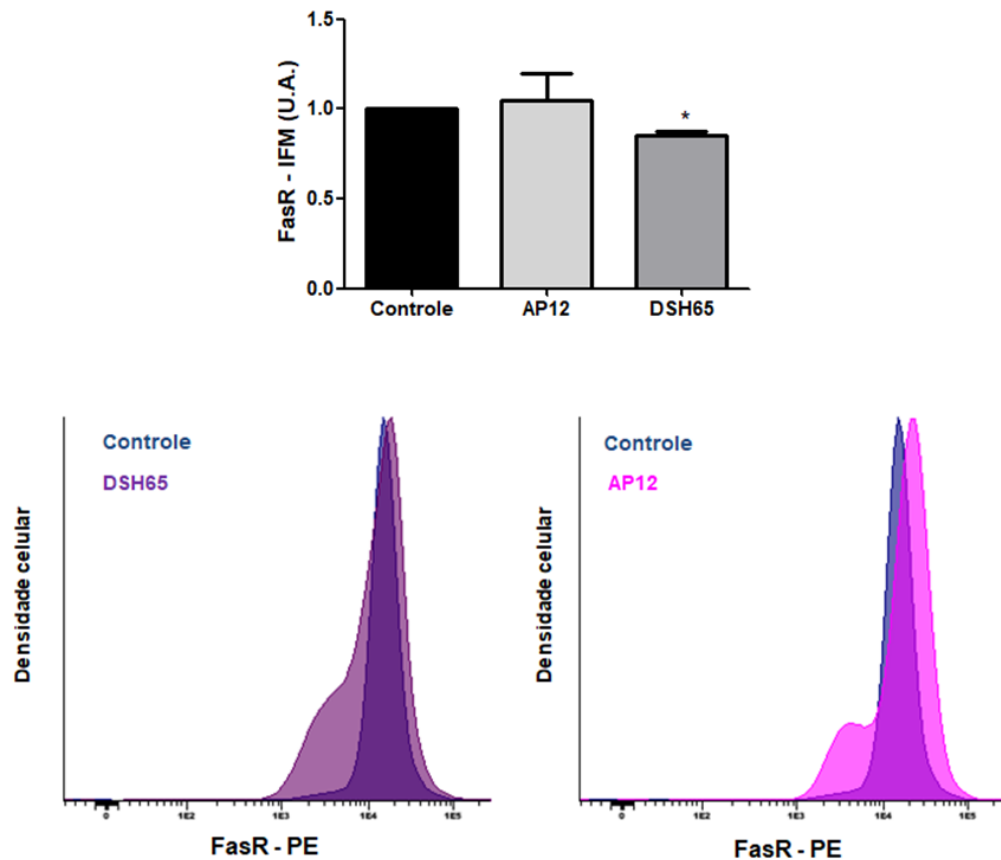


As células Daudi ($5,0 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença dos compostos na sua CI_{50} de 24 h. O IFM foi determinada por meio de CF após a marcação com os anticorpos anti-AIFconjugado a FITC. As análises foram feitas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e foram avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®). Os histogramas apresentados são ilustrativos de um único experimento e os gráficos apresentam a média \pm EPM de, no mínimo, dois experimentos independentes. $*p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle, teste t de *Student*. Fonte: A AUTORA. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias.

5.7.3 Investigação do efeito dos compostos no receptor fas (FasR)

Com o objetivo de avaliar o envolvimento dos compostos na apoptose extrínseca, foi avaliado o efeito dos mesmos sobre a expressão do receptor Fas. A partir dos resultados demonstrados na Figura 31, é possível observar que, após incubação com o composto DSH65, houve uma diminuição de $0,85 \pm 0,02$ vezes na expressão de FasR quando comparados com o grupo controle (células sem tratamento). Já com relação ao composto AP12, é possível observar que não houve diferença significativa, quando comparada com o controle.

Figura 31 - Efeito dos compostos na expressão de FasR.

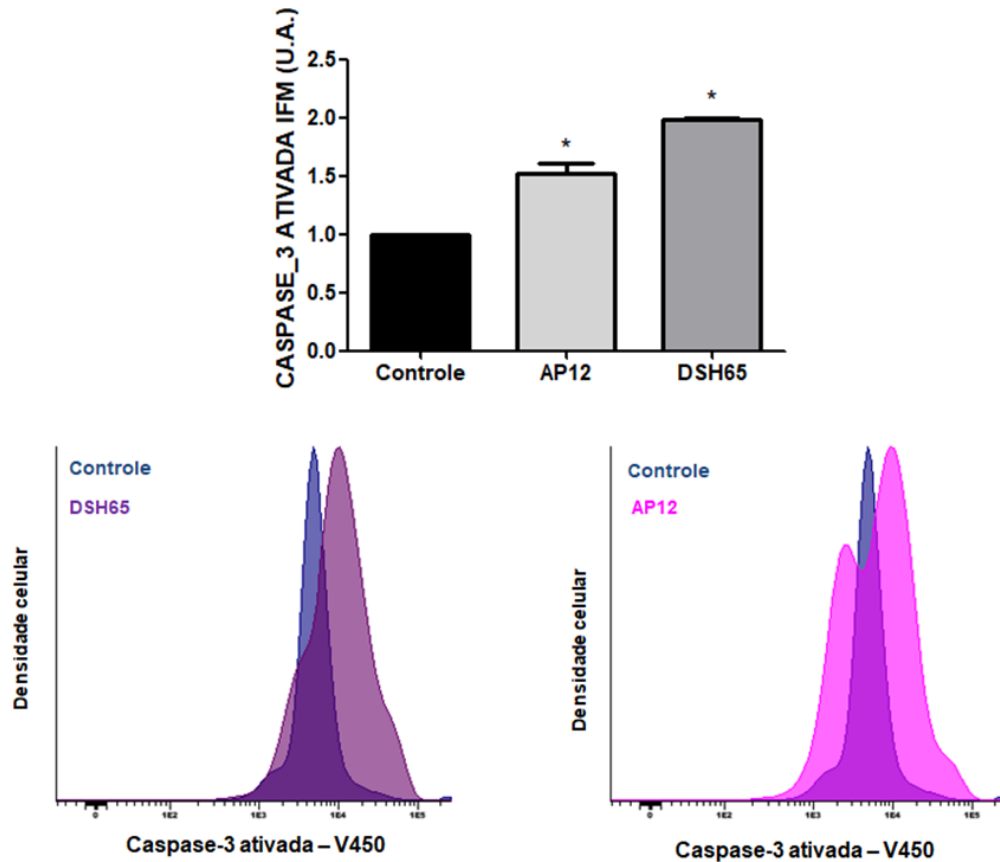


As células Daudi ($5,0 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença dos compostos na sua CI_{50} de 24 h. O IFM foi determinada por meio de CF após a marcação com o anticorpo anti-FasR conjugado a PE. As análises foram feitas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e foram avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®). Os histogramas apresentados são ilustrativos de um único experimento e os gráficos apresentam a média \pm EPM de, no mínimo, dois experimentos independentes. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle, teste t de *Student*. Fonte: A AUTORA. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias.

5.7.4 Investigação do efeito dos compostos sobre a caspase-3 ativada.

Como mostra a Figura 32, após tratamento e incubação das células Daudi com os compostos DSH65 e AP12 (CI_{50} de 24 h), houve um aumento de $1,98 \pm 0,01$ vezes e $1,52 \pm 0,10$ vezes, respectivamente, da expressão da caspase-3 ativada.

Figura 32 - Efeito dos compostos na expressão da caspase-3 ativada.

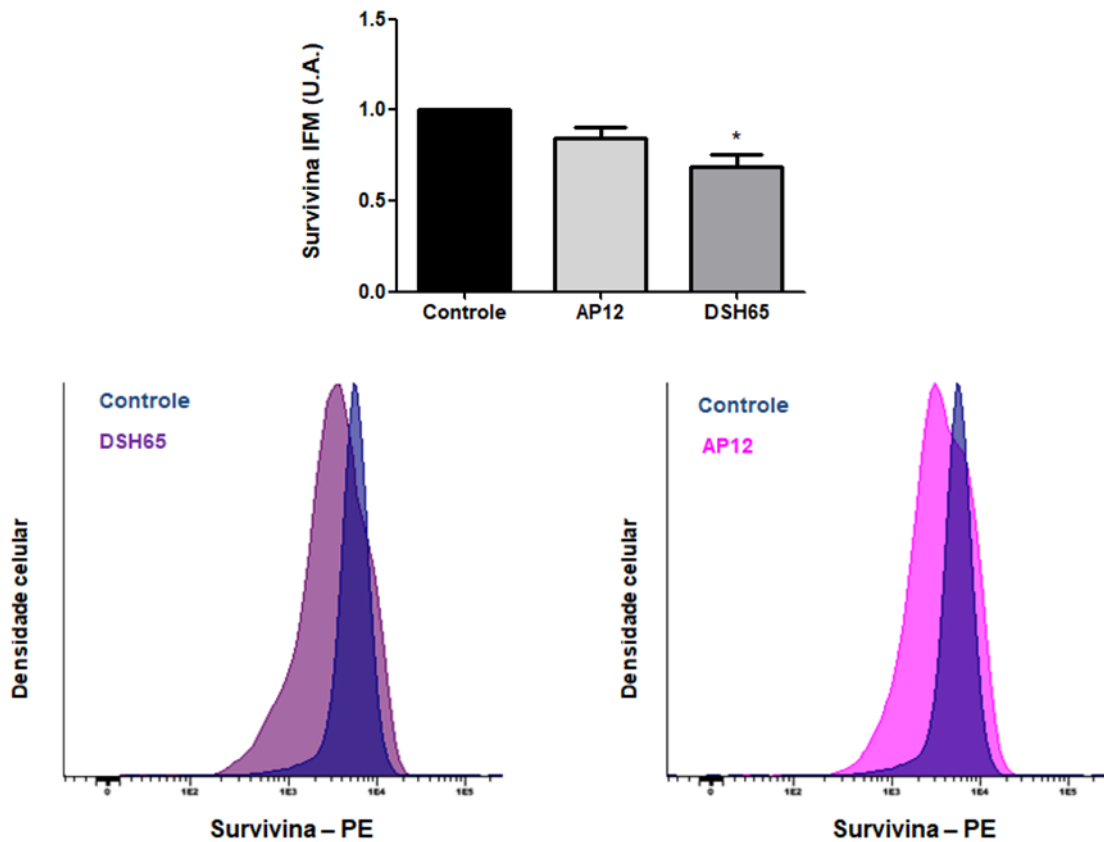


As células Daudi ($5,0 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença dos compostos na sua CI_{50} de 24 h. O IFM foi determinada por meio de CF após a marcação com o anticorpo anti-caspase-3 conjugado a V450. As análises foram feitas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e foram avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®). Os histogramas apresentados são ilustrativos de um único experimento e os gráficos apresentam a média \pm EPM de, no mínimo, dois experimentos independentes. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle, teste t de *Student*. Fonte: A AUTORA. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias.

5.7.5 Efeito dos compostos DSH65 e AP12 sobre a proteína antiapoptótica survivina

Como demonstrado na Figura 33, após incubação das células Daudi com o composto DSH65, houve uma diminuição de $0,83 \pm 0,08$ vezes na expressão da proteína antiapoptótica survivina, quando comparada com o controle (células sem tratamento). Já, após incubação com o composto AP12, não foi possível observar redução na expressão dessa proteína.

Figura 33 - Efeito dos compostos na expressão da proteína survivina em células Daudi.

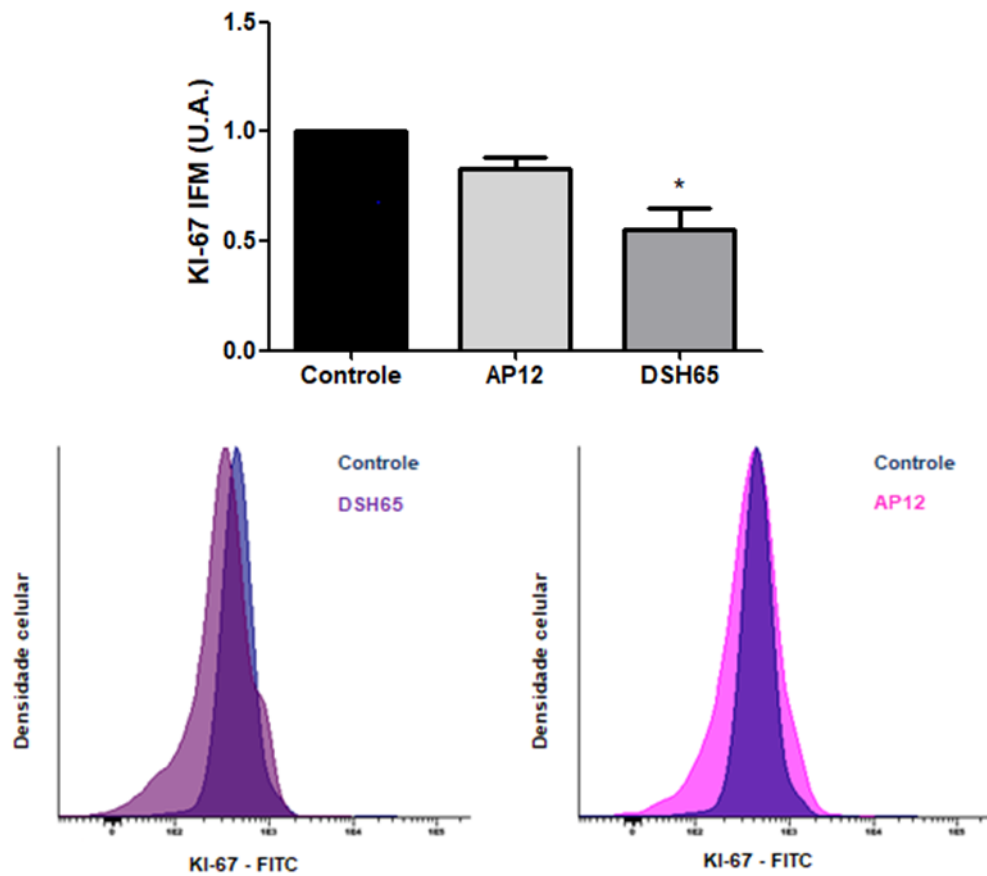


As células Daudi ($5,0 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença dos compostos na sua CI_{50} de 24 h. O IFM foi determinada por meio de CF após a marcação com o anticorpo anti-survivina conjugado a PE. As análises foram feitas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e foram avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®). Os histogramas apresentados são ilustrativos de um único experimento e os gráficos apresentam a média \pm EPM de, no mínimo, dois experimentos independentes. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle, teste t de *Student*. Fonte: A AUTORA. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias

5.7.6 Efeito dos compostos sobre a proteína Ki-67

Os resultados apresentados na Figura 34 mostram que o composto DSH65 causou uma diminuição significativa ($p \leq 0,05$) de $0,55 \pm 0,09$ vezes na expressão da proteína Ki-67 em células Daudi quando comparados ao grupo controle (células sem tratamento). Entretanto, o mesmo efeito não foi observado com o AP12.

Figura 34 - Efeito dos compostos na expressão da proteína Ki-67 em células Daudi.

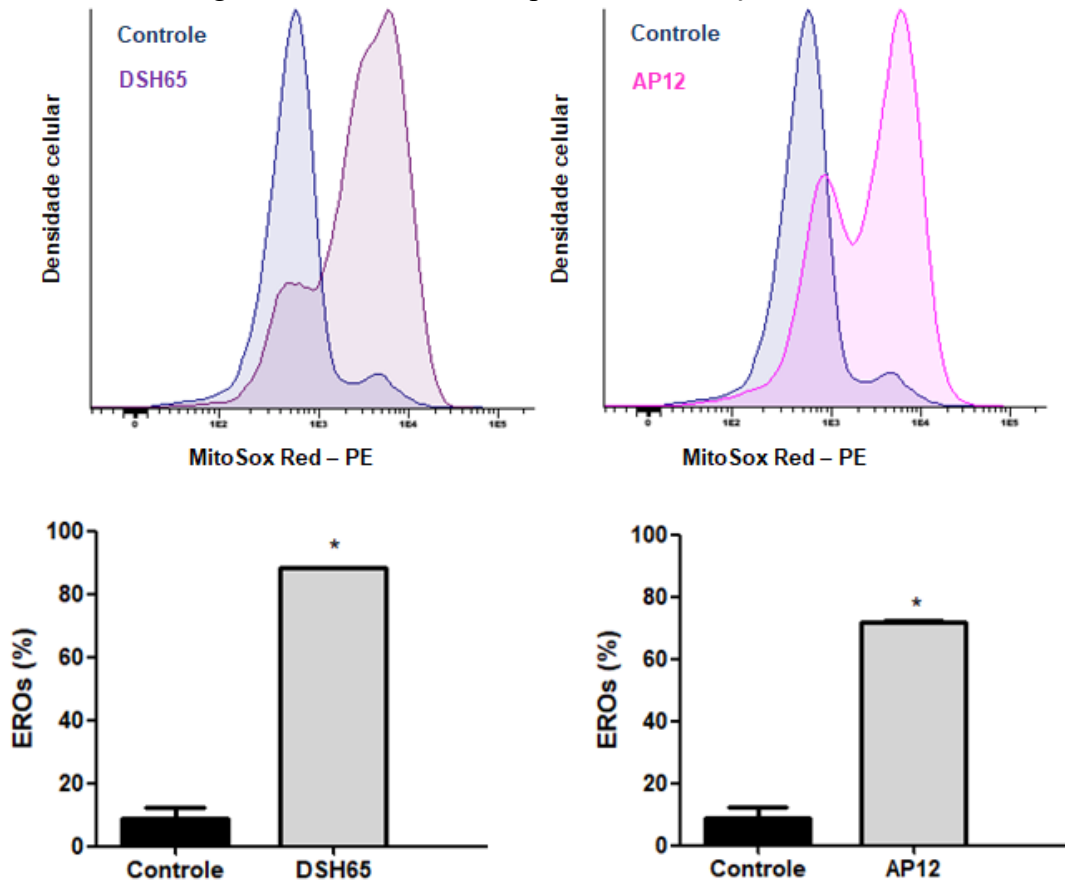


As células Daudi ($5,0 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença dos compostos na sua CI_{50} de 24 h. O IFM foi determinada por meio de CF após a marcação com o anticorpo anti-Ki-67 conjugado a FITC. As análises foram feitas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e foram avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®). Os histogramas apresentados são ilustrativos de um único experimento e os gráficos apresentam a média \pm EPM de, no mínimo, dois experimentos independentes. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle, teste t de *Student*. Fonte: A AUTORA. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias.

5.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS DSH65 e AP12 NA FORMAÇÃO DE EROs

Como é possível observar na Figura 35, houve um aumento significativo ($p \leq 0,05$) de $88,25 \pm 0,05\%$ e $71,85 \pm 0,25\%$ na concentração de EROs nas células Daudi após a incubação com os compostos DSH65 e AP12, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle.

Figura 35 - Efeito dos compostos na formação de EROs



As células Daudi ($5,0 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença dos compostos na sua CI_{50} de 24 h. A porcentagem da expressão de EROs foi determinada por meio de CF após marcação com corante MitoSox Red. As análises foram feitas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e foram avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®). Os histogramas apresentados são ilustrativos de um único experimento e os gráficos apresentam a média \pm EPM de, no mínimo, dois experimentos independentes. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle, teste t de Student. Fonte: A AUTORA. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, houve um avanço das pesquisas para o desenvolvimento de novas terapias para diferentes neoplasias. Dentre elas, diferentes linfomas foram contemplados com novas combinações de fármacos para o tratamento. Entretanto, o tratamento do LB continua um desafio, visto que, após a terapia de indução, apesar de alguns pacientes apresentarem remissão inicial, muitos apresentam recidivas, principalmente entre idosos e imunossuprimidos, acredita-se que muitos dos casos de recidivam estejam relacionados ao desenvolvimento de resistência à quimioterapia. Em outros casos, os pacientes nunca entram em remissão, são considerados refratários ao tratamento. Nesses casos, existem poucas opções como terapia de resgate e, assim, podem vir a óbito por progressão da doença ou por complicações relacionadas à terapia (RICHTER-LARREA et al., 2010; TAKEDA et al., 2020).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito citotóxico de oito imidazopiridinas, cinco derivados do ácido cinâmico, cinco dihidropiridinas e um composto natural isolado da alga parda *Desmarestia menziesii* sobre células de LB e investigar seus possíveis mecanismos envolvidos na morte celular.

Inicialmente, foram avaliadas a citotoxicidade *in vitro* dos 18 compostos sintéticos e do composto natural, em linhagens de LB humanas (Daudi). Como apresentado na Figura 14, do total de 19 compostos analisados, oito apresentaram diminuição significativa da viabilidade celular, um pertencente ao grupo dos derivados do ácido cinâmico, seis deles pertencentes ao grupo das imidazopiridinas e o composto natural AP12. Assim, foram escolhidos dois compostos para dar continuidade aos estudos, o DSH65, por ser a imidazopiridina que causou a maior redução na viabilidade celular em células Daudi, e o composto AP12 (hidroquinona), devido a estudos anteriores de outros alunos do grupo LOEH relataram um efeito citotóxico em células Daudi de outra plastoquinona (AP1) derivada da mesma alga.

Como pode ser observado na Figura 15 e Tabela 1, o composto DSH65 diminuiu a viabilidade celular de forma dependente da concentração e do tempo. Outros estudos avaliaram o efeito citotóxico de compostos pertencentes a classe das imidazopiridinas em linhagens de tumores sólidos e obtiveram CI_{50} na faixa de $1,65 \pm 0,3$ e $1,80 \pm 0,8 \mu\text{M}$ após incubação de 48 h em células de carcinoma de pulmão (A549) (SUNKARI et al., 2019). Os anéis heterocíclicos com a presença do anel imidazol são de grande importância para a química medicinal, visto que a presença desse grupamento confere atividades como

antimicobacteriano, antileishmania, antivirais, antimicrobianas e antineoplásica para compostos (DEEP et al., 2017; DEVI; JANA; SINGH, 2018; SAWYER et al., 1975). Além disso, o composto DSH65 apresenta um grupamento fluor, o qual garante a esse composto, maior eletronegatividade, pois o flúor tem capacidade de realizar ligações covalentes e maior atração de elétrons. Sayeed e colaboradores (2018) também encontraram resultados semelhantes ao avaliar diferentes imidazopiridinas em neoplasias sólidas (câncer de pulmão – A549; próstata – DU145; cólon – HCT116 e mama – MDA-MB-231), onde obtiveram CI_{50} de $0,63 \mu\text{M}$ para câncer de pulmão e CI_{50} de $1,11 \mu\text{M}$ para câncer de próstata. Ao avaliar a relação estrutura atividade das imidazopiridinas apresentadas acima, os autores observaram que a potência dos compostos era maior quando apresentavam um anel não substituído, seguido da presença de um halogênio (SAYEED, et al., 2018). Isso compactua com os resultados apresentados para o composto DSH65, que apresenta um halogênio (fluor) e a presença de um anel não substituído.

Em relação ao composto AP12 (Figura 16 e Tabela 2), o mesmo diminuiu a viabilidade celular de forma dependente do tempo e da concentração do composto, quando comparados os tempos de 24 h e 72 h, e 48 e 72 h, e não houve diferença significativa entre os tempos de 24 h e 48 h. Esses dados corroboram outros estudos presentes na literatura que avaliaram os efeitos das quinonas em linhagens de neoplasias hematológicas, em que foi avaliado o efeito da primina em células de mieloma múltiplo (MM1.S) e apresentou CI_{50} de $5,31 \pm 0,28 \mu\text{M}$ no período de 24 h, CI_{50} de $5,11 \pm 0,36 \mu\text{M}$ em 48 horas e CI_{50} de $1,36 \pm 0,36 \mu\text{M}$ em 72 h (BIGOLIN, 2016). Também foi avaliado o efeito do acetato de miconidina em células MM.1S e apresentou valores de CI_{50} de $5,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$, $4,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$ e $1,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$ em 24 h, 48 h, 72 h, respectivamente (MAIORAL, 2018). Um terceiro estudo em células MM1.S avaliou o efeito da Stypoldiona, que pertence a classe das quinonas, e obteve CI_{50} de $5,38 \pm 0,38 \mu\text{M}$, $2,49 \pm 0,44 \mu\text{M}$ e $2,55 \pm 0,53 \mu\text{M}$ em 24, 48 e 72 h, respectivamente. Contudo, a quantidade de células utilizadas nesses estudos foi de pelo menos a metade da densidade celular utilizada no presente estudo ($5,0 \times 10^4$ células/poço para 24h, $2,5 \times 10^4$ células/poço para 48 h e $12,5 \times 10^3$ células/poço para 72 h). Em outro trabalho do nosso grupo, foi avaliado o efeito da quinona 9-hidroxisargaquinona (AP1) em linhagens de LB e os resultados demonstram valores de CI_{50} de $17,5 \pm 0,8 \mu\text{M}$, $4,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$ e $3,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$ para 24 h, 48 h e 72 h, respectivamente (SANTOS-PIRATH, 2020). Dessa forma, é possível observar que as quinonas são citotóxicas para diferentes neoplasias hematológicas.

As quinonas apresentam como característica a capacidade de gerar EROs e de induzir danos irreversíveis ao DNA. Como citado anteriormente, as hidroquinonas podem ser

convertidas a quinonas e, assim, produzir EROs que podem interagir com diferentes proteínas, lipídios e causar danos ao DNA da célula (BOLTON; DUNLAP, 2017). Esse é o caso das antraciclina doxorubicina e daunorrubicina, usadas na clínica para o tratamento de LB e LMA, entre outras neoplasias (BONNET, et al., 2015; HEUSER, et al., 2020). Resultados dos EROS.

Assim, foi avaliado o efeito dos compostos DSH65 e AP12 na produção de EROs. Como é possível observar na Figura 35, houve um aumento significativo de $88,25 \pm 0,05\%$ na concentração de EROs nas células Daudi após incubação com o composto DSH65 e de $71,85 \pm 0,25\%$ após incubação com o composto AP12, quando comparadas ao grupo controle (células sem tratamento). Como relatado anteriormente, a produção excessiva de EROs por uma célula não neoplásica pode ser prejudicial e pode ocasionar o desenvolvimento de uma neoplasia. No LB a produção de EROs pode juntamente com a superexpressão de oncogenes *Myc* e *Ras*, desregular a proliferação celular e assim causar danos ao DNA e progressão maligna (TEFANI et al., 2016). Nas células neoplásicas, se essa produção for muito elevada, pode levar a morte celular (MOLONEY; COTTER, 2017). Assim, muitos estudos mostram que a produção de EROs desencadeada por novas entidades químicas pode ser uma nova abordagem para o desenvolvimento de novos fármacos.

O presente estudo investigou a produção de EROs pelos compostos DSH65 e AP12 e ambos aumentaram significativamente após incubação com CI_{50} de 24 h de ambos os compostos. O aumento do estresse oxidativo pode desencadear danos irreversíveis às proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, membranas e organelas. Assim, podem gerar danos às mitocôndrias e desencadear processos de morte celular (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016). O aumento de EROs nas células neoplásicas, podem desencadear danos irreparáveis a essas células e pode levar a processos de morte celular por apoptose. Dessa forma, o excesso de EROs pode levar ao aumento da proteína p53, que regula a expressão de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2) e aumento das proteínas pró-apoptóticas (Bax e Bak). Essa proteína também pode diminuir a expressão de IAPs e survivina, induzir a MOMP, com liberação de fatores pró-apoptóticos e por fim, induzir a apoptose (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016). Assim, sugere-se o envolvimento das EROs na apoptose intrínseca causada por ambos os compostos.

Como se sabe, o desenvolvimento de um novo fármaco percorre um longo caminho de pelo menos 20 anos, desde a busca por possíveis alvos moleculares e por compostos em bancos de dados até a chegada do medicamento às prateleiras para o consumo final. Sendo assim, primeiramente, na pesquisa básica, as moléculas precisam apresentar baixa toxicidade

para células sem doença e alta atividade biológica. Outro fator a ser considerado é a farmacocinética do composto de interesse, visto que é importante saber como o composto se comportara até chegar a sua ação final. Assim, estimar parâmetros ADME em fases iniciais da pesquisa evita que o composto chegue às fases clínicas com falhas que podem ser evitadas quando prevemos essas características (DAIANA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Nesse contexto, os primeiros parâmetros avaliados foram as propriedades físico-químicas dos compostos DSH65 e AP12 (Tabela 3). A partir deles, foram gerados os radares de biodisponibilidade oral (Figura 17 e 18). O composto DSH65 permaneceu dentro de três características para uma boa biodisponibilidade oral: tamanho, polaridade e flexibilidade, entretanto, apresentou os parâmetros lipofilicidade, insolubilidade e insaturação além do que é considerado para uma biodisponibilidade oral adequada. O composto AP12 também apresentou algumas características além do recomendado como lipofilicidade, flexibilidade e insolubilidade, e se manteve dentro da faixa adequada para os parâmetros tamanho, polaridade e insaturação. Apesar dessas características serem importantes para uma boa administração oral de fármacos, atualmente, já existem estratégias para a administração oral de fármacos com propriedades que não são adequadas para essa via como, por exemplo, o uso de nanotecnologias para aumentar a solubilidade em água, que pode ser empregado o uso na forma de micelas, lipossomas, e outros carreadores que visem aumentar a solubilidade (YETISGIN et al., 2020). Outro carreador que pode ser utilizado é a ciclodextrina (LOFTSSON et al., 2016; MURA, 2014; TIAN; HUA; LIU, 2020).

Segundo Barreiro e Fraga (2015), apesar dessas regras servirem para uma estimativa de que o composto se adeque as características físico-químicas, elas devem ser empregadas com cuidado, já que na clínica há vários medicamentos comercializados que violam uma ou mais regras (BARREIRO; FRAGA, 2015). O composto DSH65 permaneceu dentro de duas regras aplicadas, Lipinski e Veber, e o composto AP12 permaneceu dentro da regra de Lipinski. Já com relação ao escore de biodisponibilidade, ou seja, probabilidade do fármaco em apresentar mais de 10% de biodisponibilidade oral, ambos os compostos apresentaram um score de 0,55. Em relação à solubilidade em água, ambos os compostos (DSH65 e AP12) apresentaram baixa solubilidade. Segundo Kotta e colaboradores (2012), mais de 40% das entidades químicas descobertas apresentam baixa biodisponibilidade oral ou são pouco solúveis em água. A solubilidade em água é importante visto que após a ingestão do medicamento, o mesmo deve ser solúvel em meio aquoso do intestino para que possa permear a parede intestinal e, assim, atingir o efeito terapêutico desejável. Dessa forma, busca-se medicamentos com uma boa solubilidade em água (CLARYSSE, et al., 2011; CRUZ-

MORENO, et al., 2017; MCPHERSON et al., 2020). Entretanto, há maneiras para contornar essa limitação e os compostos não devem ser excluídos por causa dessa probabilidade teórica, já que os mesmos podem ser desenvolvidos em formas farmacêuticas que busquem contornar essa baixa solubilidade, como o uso de transportadores lipossomas (NGUYEN, et al., 2016; PATIL; JADHAV, 2014), nanopartículas lipídicas (KOTTA, et al., 2012), controle do pH e modificações estruturais (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Em relação aos parâmetros farmacocinéticos, o composto DSH65 apresentou baixa capacidade de absorção gastrointestinal. Entretanto, nas fases de desenvolvimento dos medicamentos, podem ser empregadas técnicas que visem aumentar a absorção do composto no TGI, como por exemplo, a adição de um sal, ou mudança de pH do composto, também podem ser empregadas outras formas farmacêuticas, como por via injetável e via sublingual, pois, desta forma, não necessitaria passar pelas barreiras gastrointestinais. (AULTON; TAYLOR, 2013). Por outro lado, o composto não deve ser excluído apenas por não se encaixar em um dos parâmetros, visto que, com o avanço tecnológico na área farmacêutica, já se encontram maneiras que busquem contornar tais dificuldades. Além de que a predição *in silico* é apenas uma previsão e mais testes devem ser realizados a fim confirmar tais parâmetros.

Já o composto AP12 apresentou alta absorção gastrointestinal. Assim pode-se sugerir que se na possibilidade de desenvolvimento de um fármaco, a partir desse composto, o mesmo será um bom candidato a formulação por via oral. Visto que para apresentar seus efeitos no organismo, o fármaco precisa passar pela barreira gastrointestinal, e assim ser absorvido (STILLHART, et al., 2020). Ambos os compostos não permeiam a barreira hematoencefálica (BHE), o que sugere uma menor chance de apresentar toxicidade ao SNC.

Os dados também sugerem que o composto DSH65 pode ser substrato da P-gp. A P-gp é uma das principais bombas de efluxo responsável por desencadear resistência a múltiplos fármacos (MDR) e está superexpressa em muitas neoplasias. Contudo, na clínica, há diversos medicamentos que são substratos da P-gp como doxorubicina, vincristina e etoposídeo, usados para o tratamento do LB, e alguns medicamentos são capazes de aumentar a expressão dessas proteínas, como a dexametasona (RANG et al., 2008; WAGHRAY; ZHANG, 2018). Sendo assim, essa propriedade do DSH65 não anula a continuidade da investigação do seu efeito citotóxico. Já o composto AP12 não é substrato da P-gp, o que pode diminuir as chances de resistência com o uso deste composto. Vale ressaltar que, para a certificação do envolvimento da P-gp no transporte desses compostos, deve-se viabilizar experimentos que avaliem a atividade e expressão dessa proteína nas células neoplásicas de interesse.

Além disso, a ferramenta preditiva SWISStargetprediction também mostrou que o composto AP12 apresentou similaridade de até 0,86 com inibidores da P-gp. Como relatado anteriormente a P-gp é uma glicoproteína de permeabilidade que é muito estudada pela sua associação com a MDR. Em muitas neoplasias, ocorre a diminuição intracelular dos fármacos e a concentração do fármaco fica abaixo do limiar terapêutico e assim ocorre a resistência a um amplo espectro de quimioterápicos (MOLLAZADEH et al., 2018). Dessa forma, a busca por novos fármacos que não apresentem essa resistência ou que inibem a P-gp se faz necessária, a fim de bloquear o efluxo por meio da P-gp (WAGHRAY; ZHANG, 2018).

Também foi avaliado o efeito do composto DSH65 sobre as enzimas responsáveis pela metabolização dos xenobióticos, denominadas CYP450. Essa família de enzimas é responsável pela biotransformação de produtos químicos, a fim de facilitar a excreção de substâncias do organismo (GUENGERICH; WATERMAN; EGLI, 2016). Contudo, é importante salientar que os fármacos podem interagir com essas enzimas e inibi-las e, dessa forma, gerar interações medicamentosas que podem impedir a excreção de outro medicamento administrado concomitantemente ou reduzir a sua efetividade. Assim, a inibição dessa enzima pode aumentar as concentrações plasmáticas de certos medicamentos e levar a toxicidade (ALMAZROO; MIAH; VENKATARAMANAN, 2017; TORNIO; BACKMAN, 2018). Na Tabela 3, é possível observar que o composto DSH65 é um possível inibidor de três das principais CYP avaliadas, a CYP1A2, CYP2C19 e CYP2D. Por isso, é importante priorizar a administração do DSH65 com fármacos que não sejam metabolizados por essas isoenzimas. Como é o caso da ciclofosfamida, que é metabolizada pela CYP2B6 e a doxorrubicina que é metabolizada pela CYP3A4, ambas isoenzimas que o composto não inibe (TORNIO; BACKMAN, 2018).

Em relação ao composto AP12, é possível que ele possa inibir três isoenzimas, CYP1A2, CYP2C9 e CYP3A4 (Tabela 3). Dessa forma, deve-se evitar o uso de medicamentos que sejam metabolizados por essas vias, a fim de evitar possíveis toxicidades. Sugere-se que não sejam usados vincristina e dexametasona juntamente com o composto AP12. Por outro lado, o fármaco ciclofosfamita seria um bom candidato a ser usado em conjunto com o composto AP12, visto que o mesmo é metabolizado por outra isoenzima, a CYP2B6 (TORNIO; BACKMAN, 2018).

Foram gerados dois alertas estruturais para o composto AP12 que levaram em consideração os PAINS, do inglês *Pan Assay Interference Compound* e os alertas estruturais de Brenk. Esses alertas foram gerados devido à presença de um alceno isolado e por se tratar de uma hidroquinona. Como já mencionado anteriormente, as quinonas podem reagir com

nucleófilos celulares ou gerar espécies reativas, por meio do ciclo redox (BOLTON; DUNLAP, 2017). O composto AP12, por ser uma hidroquinona, pode ser convertido a quinona e assim gerar EROs (JUNIOR et al., 2019). Dessa forma, as hidroquinonas podem participar do ciclo redox por meio da redução das quinonas em um ou mais elétrons. A redução desse elétron é catalisada por NADPH e isoenzimas. Assim, podem gerar radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxila e acarretar na quebra de fitas simples e/ou oxidação de bases de DNA (BOLTON; DUNLAP, 2017). As quinonas também são aceitadoras de Michael e, dessa forma, realizam ligações covalentes com nucléolos celulares como, por exemplo, ligações com a glutatona (GSH) e/ou alquilação de proteínas (BOLTON et al., 2000).

Além das investigações *in silico* acima mencionadas, também foi utilizada a ferramenta preditiva SWISStargetprediction, a qual apresentou os possíveis alvos terapêuticos dos compostos DSH65 e AP12 (Quadro 2, 3, 4 e 5). O composto DSH65 apresentou como possíveis alvos terapêuticos as proteases CCNE2 (ciclina E2), CDK2 e CCNE1 (ciclina E1). A similaridade do composto com os inibidores dessas proteases foi de 0,80. Utilizando-se essa ferramenta para o composto AP12, foi possível sinalizar como possíveis alvos farmacológicos as CCNE2 (ciclina E2), CDK2 e CCNE1 (ciclina E1). A similaridade do composto com os inibidores da Ciclina E/Ck2 foi de aproximadamente 0,85. A ciclina E se liga a Cdk2 e, depois de fosforilar seus substratos, inicia uma cascata de eventos que controla a passagem da fase G1 para fase S do ciclo celular. Essa proteína costuma estar desregulada em diferentes tipos de neoplasias, dentre elas, no câncer de mama, nos linfomas e nas leucemias e, dessa forma, pode estar relacionada com um prognóstico desfavorável. A superexpressão da ciclina E pode desregular a entrada da célula nas fases G1/S e G2/M, pois acelera a entrada da célula na fase S (CHEN, et al., 2018; MÖRÖY; GEISEN, 2004).

Sabe-se que no desenvolvimento de uma neoplasia, frequentemente, ocorre proliferação descontrolada das células, seguida de falha na progressão do ciclo celular, bem como inibição da reparação do DNA e bloqueio da morte celular programada (WENZEL; SINGH, 2018). Estudos demonstram que no LB pode ocorrer a desregulação do ciclo celular mediante alterações na ciclina D3 (ZAYAC; OLSZEWSKI, 2020). Dessa forma, o bloqueio do ciclo celular continua sendo objeto de estudo para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para o tratamento dessa neoplasia. Diante disso, o presente trabalho avaliou o efeito dos compostos DSH65 e AP12 sobre o ciclo celular e, conforme observado na Tabela 6, houve diferença significativa no percentual de células presentes nas fases do ciclo celular, para o composto DSH65, quando comparado ao grupo controle (células sem tratamento), para

o composto AP12 não houve diferença significativa. (Figuras 23 e 24). Alguns trabalhos demonstram que as imidazopiridinas podem ter ação sobre a fase G2/M em células de câncer de pulmão e de próstata, após 48h de incubação com 1 uM do composto (SAYEED et al., 2018). Sunkari e colaboradores (2019) avaliaram o efeito de híbridos bisindol-imidazopiridina sobre células de carcinoma de pulmão e observaram um bloqueio do ciclo celular após incubação com 1,5 uM e 3 uM dos compostos por 24 h na fase G2/M. Esses resultados corroboram os observados neste trabalho, que observou um bloqueio nas fases G0/G1 e G2/M quando incubados com o composto DSH65.

Os resultados apresentados para o composto AP12 corroboram outro estudo, no qual não foi observado bloqueio do ciclo celular em células de LB após o tratamento com uma quinona (plastoquinona) (SANTOS-PIRATH, 2020). Em outro estudo, que avaliou o efeito de uma quinona (stypoldiona) sobre células MM.1S, também foi observado a ausência de bloqueio do ciclo celular (WALTER, 2019). Esses resultados indicam que o composto AP12 causa morte celular por um mecanismo diferente do bloqueio celular.

O composto AP12 apresentou similaridade de até 0,86 com inibidores da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, a qual desempenha várias funções importantes em células normais, tais como, diferenciação, proliferação, sobrevivência celular, angiogênese e metabolismo da glicose (AOKI; FUJISHITA, 2017; KARAR; MAITY, 2011; PORTA; PAGLINO; MOSCA, 2014). A superexpressão das proteínas dessa via pode resultar em uma desregulação nas funções normais da célula, o que pode levar ao desenvolvimento de células malignas, pois pode ocorrer mutação genética no gene PI3K ou em outros componentes da via, ou ainda pela amplificação de PI3K (XI et al., 2019). A proliferação dessas células pode ocorrer pela interrupção da sinalização normal no interior da célula, causada por mutações ou por sinalização externa aberrante (ASATI, MAHAPATRA, BHARTI, 2016; NEPSTAD et al., 2020). Alguns estudos sugerem que a ativação simultânea das vias PI3K/ Akt/ mTOR e c-Myc contribui para o desenvolvimento do LB e que também pode ser ativada pelo vírus Epstein-Barr (BHATTI et al., 2018; GRANATO et al., 2016). Dessa forma, a inibição dessa via pode representar uma estratégia para o desenvolvimento de novos quimioterápicos.

Quando se pensa no desenvolvimento de um novo quimioterápico, deseja-se que o mesmo seja seletivo para as células neoplásicas e que não seja citotóxico para células não neoplásicas para, dessa forma, ter menores chances de causar efeitos adversos aos pacientes (KNEZEVIC; CLARKE, 2020; LIVSHITS; RAO; SMITH, 2014). A maioria dos fármacos utilizados para o tratamento dos diferentes tipos de neoplasias tem como finalidade a destruição das células com alta proliferação e, assim, causam morte em células não

neoplásicas. Nesse sentido, após avaliar a citotoxicidade dos compostos DSH65 e AP12 em células Daudi, foram avaliados os efeitos dos compostos sobre células mononucleadas, as quais foram isoladas do sangue periférico de indivíduos clinicamente saudáveis. O composto DSH65 apresentou efeito citotóxico sobre CM a partir de 25 μ M no período de incubação de 24 h (Figura 19). Entretanto, a CI_{50} nas CM foi 1,5 vezes maior do que a CI_{50} observada para as células Daudi. O composto AP12 também apresentou efeito citotóxico para células mononucleares a partir da concentração de 25 μ M no período de incubação de 24 h com o composto (Figura 20). Entretanto, a CI_{50} de 24 h para as CM, foi 2,5 vezes maior do que a com as células Daudi. Assim, apesar dos compostos causarem morte das CM, a progressão dos experimentos não deve ser inviabilizada, pois alguns quimioterápicos utilizados no tratamento de neoplasias hematológicas também apresentam toxicidade para células não neoplásicas, como, por exemplo, a doxorrubicina, que apresenta como efeito adverso a cardiotoxicidade (SONGBO et al., 2019) e a vincristina e bortezomibe que podem apresentar neuropatias (GEISLER, 2021). Assim, é recomendado utilizar em fases posteriores o uso de ferramentas que busquem diminuir a toxicidade em células não neoplásicas, tal qual o uso de carreadores de fármacos, como lipossomas e nanocapsulas (SENAPATI et al., 2018).

Para avaliar o potencial hemolítico dos compostos DSH65 e AP12, foi realizado o teste de hemólise com hemácias de indivíduos clinicamente saudáveis. A quantificação da lise de eritrócitos *in vitro* é importante durante o desenvolvimento de um fármaco, a fim de prever se o composto é capaz de lisar as células saudáveis, principalmente se o composto vir a ser utilizado por via oral ou por via endovenosa. Como apresentado nas Figuras 21 e 22, e nas Tabelas 4 e 5, os compostos não apresentaram efeito hemolítico quando comparados ao grupo controle, mesmo em concentrações 10 vezes superiores da CI_{50} dos compostos. Esses resultados sugerem que ambos os compostos, se forem utilizados como fármacos, poderão ser administrados com segurança por via oral ou parenteral, pois são biocompatíveis com os eritrócitos (PODSIEDLIK; MARKOWICZ-PIASECKA; SIKORA, 2020).

O Ki-67 é um marcador de proliferação celular que está expresso em todas as fases do ciclo celular, com exceção da fase G0 (células quiescentes), e que pode ser encontrado em condições fisiológicas. Por outro lado, alguns estudos indicam que o Ki-67 pode prever a progressão do câncer, pois este marcador é altamente expresso em células malignas (LI et al., 2014; YANG et al., 2017). No câncer de mama, o aumento de Ki-67 pode representar um prognóstico desfavorável (CHEANG, et al., 2009; HASHMI, et al., 2019). Neste estudo, após a incubação das células Daudi com a CI_{50} de 24 h do composto DSH65, pode-se observar uma diminuição significativa de $0,55 \pm 0,10$ vezes na expressão da proteína Ki-67 quando

comparadas ao controle (células sem tratamento) (Figura 34), o que mostra a possibilidade de efeitos citostáticos sobre o LB. Já com relação ao composto AP12, não houve diferença significativa quando comparado com o controle (células sem tratamento). Esses resultados são diferentes daqueles observados por Santos-Pirath (2020) que, ao avaliar o efeito de uma plastoquinona, observou a diminuição de Ki-67. Vale ressaltar que, apesar da plastoquinona ser uma quinona, ela apresenta diferenças na estrutura química em relação ao composto AP12, que é um composto inédito e, por isso, os resultados obtidos com esse composto não possuem parâmetros de comparação.

Além do bloqueio do ciclo celular, uma das formas de resistência das células neoplásicas é o bloqueio da reparação celular após um erro na replicação do DNA e da ativação dos mecanismos de morte celular. Assim, a ativação de vias que resultem em apoptose são necessários quando se tem como objetivo a investigação de compostos que possam ser utilizados para o desenvolvimento de quimioterápicos. Isso se deve ao fato de que, quando uma célula morre por apoptose, não há ativação de resposta imunológica e, conseqüentemente, não ocorrem danos nos tecidos adjacentes ao processo neoplásico (GALLUZI et al., 2018), o que diminui os efeitos adversos causados pelo tratamento.

Para avaliar se os compostos causavam morte por apoptose, foram utilizados dois métodos, a avaliação das alterações morfológicas por microscopia de fluorescência com BE e LA, e a detecção da externalização dos resíduos de fosfatidilserina pela Anexina-V. Como pode ser observado na Figura 25, ambos os compostos avaliados causaram alterações morfológicas características de células em apoptose inicial e tardia, quando comparadas ao grupo controle (células sem tratamento) (Figura 25).

Após o tratamento e a incubação (24h) das células Daudi com os compostos nas suas CI_{50} de 24 h, foi possível observar um aumento significativo na expressão dos resíduos de fosfatidilserina de $83,75 \pm 4,55\%$ das células tratadas com DSH65 e de $46,10 \pm 1,70\%$ das células incubadas com o AP12, quando comparadas com o grupo controle (células sem tratamento) (Figura 26). Os resultados demonstram que ambos os compostos causam morte celular por apoptose nas células Daudi. Os resultados para a imidazopiridina corroboram estudos de El-Awady e colaboradores (2016) que avaliaram o efeito de uma imidazopiridina em células de carcinoma de pulmão, em que foi encontrado um aumento de 10% da externalização dos resíduos de fosfatidilserina quando incubadas com 2,4 μ M de IAZP. Da mesma forma, os resultados obtidos no presente trabalho para o composto AP12 corroboram os de Santos-Pirath (2020), que avaliou o efeito de uma plastoquinona sobre células Daudi, e encontrou um aumento de 30,8% na exposição dos resíduos de fosfatidilserina. Entretanto,

outras formas de morte celular não devem ser descartadas. O passo seguinte deste estudo foi avaliar as proteínas envolvidas nos processos de morte celular por apoptose.

A apoptose pode ser dividida em apoptose intrínseca e extrínseca, e em ambas as vias se encontram proteínas importantes que, por meio da identificação da expressão das mesmas, é possível observar por qual via ocorre a morte celular. A apoptose intrínseca tem início após perturbações na parte externa da membrana mitocondrial das células e se inicia quando a mesma detecta esses danos por meios de sensores intracelulares (D'ARCY, 2019). Nesse sentido, após perceber esses estímulos, ocorrem mudanças na membrana mitocondrial da célula em que, por meio de um desequilíbrio entre as proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas, resulta na abertura de poros e liberação componentes intracelulares como o citocromo c, o SMAC/Diablo e o AIF, que darão início a ativação da apoptose (KALKAVAN; GREEN, 2018).

Neste estudo, para avaliar se a morte celular ocasionada pelos compostos (DSH65 e AP12) envolveu danos mitocondriais, foi avaliado o efeito dos compostos sobre o $\Delta\Psi$ das células Daudi. Na Figura 27, é possível observar que houve uma redução significativa de aproximadamente 96% e 81% do $\Delta\Psi$ das células Daudi após incubação de 24h com o compostos DSH65 e AP12, respectivamente. Como os compostos DSH65 e AP12 causaram perda intensa do $\Delta\Psi$ após incubação com a CI_{50} de 24 h por 24 h, também foi avaliado o efeito dos compostos sobre o $\Delta\Psi$ após incubação de 12 h em células Daudi. No entanto, nesse tempo não houve redução significativa para ambos os compostos (Figura 27).

Além disso, como pode ser observado na Figura 28, houve um aumento significativo de $1,26 \pm 0,08$ vezes na expressão de Bax nas células Daudi, quando incubadas com o composto DSH65, em relação ao controle (células sem tratamento). Esse efeito foi semelhante para com o composto AP12 ($1,25 \pm 0,049$ vezes). Por outro lado, houve uma diminuição na expressão de Bcl-2 de $0,86 \pm 0,008$ vezes após incubação com o composto DSH65 (Figura 29). Os resultados demonstram que a reação Bax/Bcl-2 nas células Daudi incubadas com o composto DSH65 foi de 1,46, o que favorece o estímulo pró-apoptótico. Esses resultados sugerem que o composto DSH65 pode causar permeabilização da membrana mitocondrial, com liberação de proteínas para o citoplasma da célula e causar apoptose em células Daudi. O desequilíbrio resultante do aumento da proteína pró-apoptótica Bax e diminuição da proteína anti-apoptótica Bcl-2, indica que a morte celular causada pelo composto DSH65 envolve a apoptose intrínseca.

Já para o composto AP12, não houve diferença significativa na expressão de Bcl-2 quando comparada ao grupo controle (células sem tratamento) (Figura 29). Entretanto, os

resultados demonstram que a relação Bax/Bcl-2 nas células tratadas com o composto AP12 foi de 1,28 e isso mostra que o estímulo pró-apoptótico foi favorecido. Esses resultados também sugerem o envolvimento da apoptose intrínseca na morte das células Daudi causados pelo composto AP12.

Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que os compostos são capazes de desencadear perturbações no $\Delta\Psi_m$ e, dessa forma, aumentar a permeabilidade mitocondrial e induzir as células à apoptose intrínseca. Os resultados apresentados com o composto AP12 corroboram os resultados de outros estudos que também avaliaram a perda do $\Delta\Psi_m$ após incubação com quinonas (BIGOLIN, 2016; MAIORAL, 2018; SANTOS-PIRATH, 2020; WALTER, 2019).

O presente trabalho também avaliou a expressão de AIF após incubação com os compostos (DSH65 e AP12). O AIF, mediante estímulos, possui a capacidade de migrar para o núcleo das células e induzir a condensação da cromatina e fragmentação do DNA e, assim, estimular a morte celular (BANO; PREHN, 2018; LO et al., 2020; HERRMANN; RIEMER, 2020; SEVRIUKOVA, 2011). Com base na Figura 30, foi possível observar que houve uma diminuição de $0,48 \pm 0,01$ vezes da expressão de AIF em células Daudi, quando incubadas com o composto DSH65 e comparado ao grupo controle (células sem tratamento). Entretanto, com o composto AP12, não houve alteração significativa. Esses resultados sugerem que os compostos induzem apoptose intrínseca via ativação de caspases, independente da liberação de AIF.

Além da avaliação dos compostos sobre a apoptose intrínseca, também foi avaliado o efeito dos compostos sobre o FasR. O FasR é um dos receptores presentes na apoptose extrínseca que, juntamente com o receptor TRAIL, cliva a pró-caspase-8 e a caspase-10 e, assim, formam o complexo indutor da morte (DISC) que, por sua vez, é responsável por clivar a caspase-3 e desencadear a degradação do DNA e formação de corpos apoptóticos (GALLUZZI et al., 2018). A partir dos resultados demonstrados na Figura 31, é possível observar que após incubação com o composto DSH65 houve uma diminuição de $0,85 \pm 0,02$ vezes na expressão de FasR quando comparado com o grupo controle (células sem tratamento). Já com relação ao composto AP12, foi possível observar que não houve diferença significativa quando comparado ao controle. Esse resultado diverge do relatado por Santos-Pirath (2020), que avaliou o efeito de uma plastoquinona sobre células Daudi e relatou um aumento de $39,5\% \pm 7,1\%$ na expressão de FasR. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar o possível envolvimento dos compostos na apoptose extrínseca, pois, como

relatado anteriormente, há outros receptores envolvidos na apoptose extrínseca e que não foram avaliados neste trabalho.

Sabe-se que a ativação das caspases efetoras é essencial para desencadear a apoptose. Esse evento é comum tanto à apoptose intrínseca quanto à apoptose extrínseca. Assim, após ativação das caspases efetoras, ocorrem transformações na membrana plasmática da célula, como a formação de *blebbing*, fragmentação de DNA e a liberação de resíduos de fosfatidilserina, os quais serão fagocitados e degradados em fagolisossomas (GALLUZZI et al. 2018).

Dando seguimento ao estudo dos mecanismos envolvidos na apoptose causada pelos compostos DSH65 e AP12, foi avaliada a expressão da caspase-3 ativada em células Daudi após incubação com os mesmos. Como pode ser observado na Figura 32, os compostos DSH65 e AP12 causaram um aumento significativo na expressão da caspase-3 ativada, de $1,98 \pm 0,001$ e $1,52 \pm 0,094$ vezes, respectivamente. Esses resultados confirmam o envolvimento da ativação da caspase-3 na apoptose intrínseca causada pelos compostos nas células Daudi.

O bloqueio da apoptose pode estar relacionado a superexpressão de proteínas que inibem a ativação das caspases. Considerando o exposto acima, neste trabalho também foi avaliado o efeito dos compostos DSH65 e AP12 sobre a proteína antiapoptótica survivina. Desta forma, a diminuição da expressão de survivina pode contribuir para a amplificação da apoptose. A partir da Figura 33, é possível observar que após incubação com o composto DSH65 (CI_{50} de 24h) houve uma diminuição de $0,829 \pm 0,077$ vezes na expressão da proteína antiapoptótica survivina, quando comparada com o controle (células sem tratamento). O LB apresenta superexpressão dessa proteína e a sua inibição poderia diminuir a resistência à apoptose (CONGMIN et al., 2006). Entretanto, no caso do AP12, apesar de não inibir a expressão da survivina (Fig 33), esse fator não impediu o efeito do mesmo sobre o mecanismo de apoptose intrínseca.

7 CONCLUSÃO

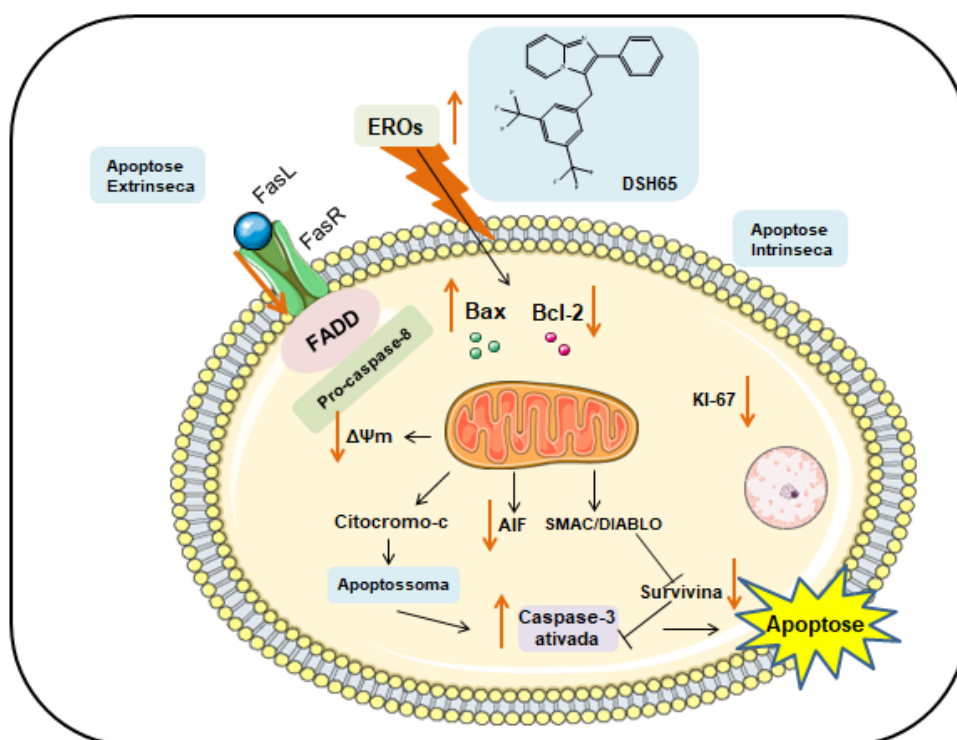
Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- Entre os compostos sintéticos, o composto DSH65 foi o que apresentou menor viabilidade celular em 100 μ M.
- Os compostos DSH65 e AP12 foram citotóxicos para as células Daudi de forma dependente da concentração e do tempo de incubação, com valores de CI_{50} de 24 h inferiores a 52 μ M e de 48 e 72 h inferiores a 35 μ M.
- O DSH65 foi 4,2 vezes mais citotóxico para as células de Daudi em comparação às CM isoladas de indivíduos saudáveis. Já o composto AP12 foi 3,86 vezes mais citotóxico para as células Daudi em comparação com às CM. Ambos os compostos não causaram hemólise, mesmo em concentração 10 vezes superior à CI_{50} de 48 h da linhagem Daudi.
- O composto DSH65 causou bloqueio significativo nas fases G0/G1 e G2/M do ciclo celular das células Daudi, já o composto AP12 não causou bloqueio significativo nas fases do ciclo celular das células Daudi.
- A morte celular causada pelos compostos DSH65 e AP12 foi sugestiva de apoptose, pois apresentou alterações morfológicas sugestivas de apoptose por microscopia de fluorescência e houve aumento da externalização dos resíduos de fosfatidilserina.
- Os compostos DSH65 e AP12 levaram à ativação da apoptose intrínseca, com produção de EROs, aumento de Bax e redução de Bcl-2, redução do $\Delta\psi_m$ e aumento de caspase-3 ativada.
- O composto DSH65 também causou diminuição da expressão da proteína antiapoptótica survivina e do marcador de proliferação celular Ki-67.

Assim, o presente estudo permite sugerir que o mecanismo de ação do composto DSH65 em células Daudi envolva a produção de EROs e a ativação da apoptose intrínseca, com aumento de Bax e a inversão dos membros pró-apoptóticos (Bcl-2) e antiapoptóticos (Bax) da família Bcl-2, o que leva à redução do $\Delta\psi_m$, aumento de caspase-3 ativada (Figura 36). Em relação ao composto AP12, os resultados permitem sugerir que o mecanismo de ação do composto em células Daudi envolva a produção de EROs e a ativação da apoptose intrínseca, com aumento de Bax e diminuição da proteína anti-apoptótica Bcl-2, o que leva à redução do $\Delta\psi_m$, aumento de caspase-3 ativada (Figura 37). A partir do conjunto de

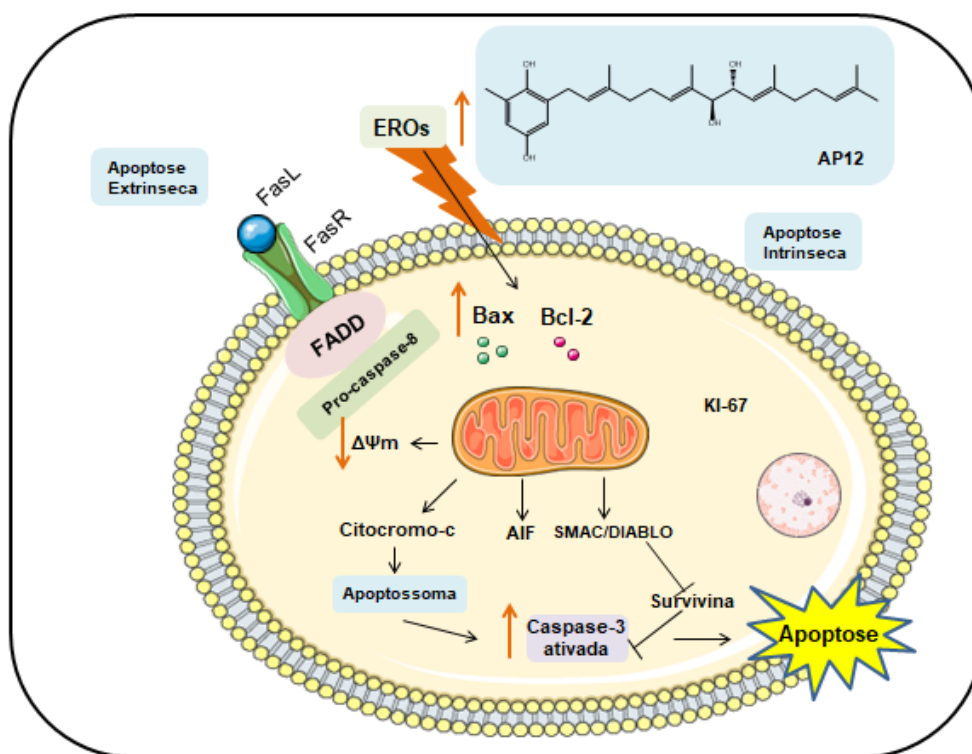
resultados apresentados, sugere-se que ambos os compostos são bons candidatos para desenvolvimento de novos fármacos para o LB.

Figura 36 - Esquema ilustrativo do mecanismo de ação do composto DSH65 em células Daudi.



Fonte: A AUTORA

Figura 37 - Esquema ilustrativo do mecanismo de ação do composto AP12 em células Daudi.



Fonte: A AUTORA

8 PERSPECTIVAS

- Avaliar o sinergismo dos compostos com fármacos utilizados para o LB, como doxorubicina e vincristina;
- Avaliar o efeito dos compostos selecionados sobre a expressão de proteínas das vias PI3K/Akt/mTOR (Akt e pAk) e MAPK/ERK (MAP quinase/ERK2) por Western Blot (WB);
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos selecionados em células neoplásicas de SP e medula óssea (MO) de pacientes portadores de neoplasias linfoides;
- Investigar a relação estrutura e atividade dos compostos DSH65 e AP12;
- Avaliar a permeabilidade dos compostos em cultura de células de adenocarcinoma colorretal humanas (CACO-2);
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos DSH65 e AP12 sobre células mononucleadas após nanoencapsulação.

REFERENCIAS

ABBAS A.; LICHTMAN A.; PILLAI S. Cellular and Molecular Immunology. 5ª edição. EUA. Elsevier. 2016.

AGGARWAL, V. *et al.* Role of reactive oxygen species in cancer progression: Molecular mechanisms and recent advancements. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, 2019.

ALMAZROO, O. A.; MIAH, M. K.; VENKATARAMANAN, R. Drug Metabolism in the Liver. **Clinics in Liver Disease**, v. 21, n. 1, p. 1–20, 2017.

ALSHARIF, R.; DUNLEAVY, K. Burkitt Lymphoma and Other High-Grade B-Cell Lymphomas with or without MYC, BCL2, and/or BCL6 Rearrangements. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 33, n. 4, p. 587–596, 1 ago. 2019.

ALBERTS. *et al.* Replicação, Reparo e Recombinação do DNA. In: Biologia Molecular da Célula. 5ª ed. Artmed, São Paulo, 2010. Cap. 5, p. 285.

AULTON, M.E.; TAYLOR, K.M.G. Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines. 4ª edition. Elsevier. UK. 2013.

ANSELL, S. M. Non-Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 8, p. 1152–1163, 2015.

AOKI, M.; FUJISHITA, T. Individuality in music performance. **Assessment & Evaluation in Higher Education**, v. 37, n. October, p. 435, 2012.

ASATI, V.; MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 109, p. 314–341, 2016.

ASSI, M. The differential role of reactive oxygen species in early and late stages of cancer. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 313, n. 6, p. R646–R653, 2017.

BANO, D.; PREHN, J. H. M. Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. **EBioMedicine**, v. 30, n. 2017, p. 29–37, 2018.

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

BHATTI, M. *et al.* Pre-clinical activity of targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in Burkitt lymphoma. **Oncotarget**, v. 9, n. 31, p. 21820–21830, 2018.

- BIGOLIN, A. Investigação do mecanismo de morte celular induzido por compostos em células de linhagens de neoplasias hematológicas. 2016. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- BLAIR, H. A. Daunorubicin/Cytarabine Liposome: A Review in Acute Myeloid Leukaemia. **Drugs** **2018** **78:18**, v. 78, n. 18, p. 1903–1910, 3 dez. 2018.
- BOLTON, J. L. *et al.* Role of quinones in toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, n. 3, p. 135–160, 2000.
- BOLTON, J. L.; DUNLAP, T. Formation and biological targets of quinones: Cytotoxic versus cytoprotective effects. **Chemical Research in Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 13–37, 2017.
- BONNET, C. *et al.* Practice Guidelines BHS Guidelines for the treatment of Burkitt's lymphoma. **Belgian Journal of Hematology**, v. 6, n. 2, 2015a.
- BONNET, C. *et al.* BHS Guidelines for the treatment of Burkitt ' s lymphoma. v. 6, n. 2, p. 61–69, 2015b.
- BRENK, R. *et al.* Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. **ChemMedChem**, v. 3, n. 3, p. 435–444, 2008.
- CAGLAR, H. O.; CIGIR, C.; AVCI, B. Alterations of cell cycle genes in cancer : unmasking the role of cancer stem cells. **Molecular Biology Reports**, n. 0123456789, 2020.
- CASULO, C.; FRIEDBERG, J. Burkitt lymphoma- a rare but challenging lymphoma. **Best practice & research. Clinical haematology**, v. 31, n. 3, p. 279–284, 1 set. 2018.
- CHASON, B.D. *et al.* Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification. **J Clin Oncol.** p. 32, n. 27, p. 3059-3067. 2014.
- CHEANG, M. C. U. *et al.* Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736–750, 2009.
- CHEN, X. *et al.* Cyclin E overexpression sensitizes triple-negative breast cancer to Wee1 kinase inhibition. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 24, p. 6594–6610, 2018.
- CHESON, B. D. *et al.* Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of hodgkin and non-hodgkin lymphoma: The lugano classification. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 27, p. 3059–3067, 2014.
- CLARYSSE, S. *et al.* Intestinal drug solubility estimation based on simulated intestinal fluids: Comparison with solubility in human intestinal fluids. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, p. 260–269, 2011.
- CONGMIN, G. *et al.* Survivin - An attractive target for RNAi in non-Hodgkin's lymphoma, Daudi cell line as a model. **Leukemia and Lymphoma**, v. 47, n. 9, p. 1941–1948, 2006.

CRUZ-MORENO, M. P. *et al.* Exploring drug solubility in fasted human intestinal fluid aspirates: Impact of inter-individual variability, sampling site and dilution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 528, n. 1–2, p. 471–484, 2017.

D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, v. 43, n. 6, p. 582–592, 2019.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 1–13, 2017.

DAINA, A.; ZOETE, V. Application of the SwissDrugDesign Online Resources in Virtual Screening. 2019.

DALLA-FAVERA, R. *et al.* Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 24, p. 7824–7827, 1982.

DANG, C. *et al.* Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. **Experimental cell research**, v. 253, n. 1, p. 63–77, 25 nov. 1999.

DAVYT, D. *et al.* New chromenols from the brown alga *Desmarestia menziesii*. **Natural Products Letters**, v.9, n. 4, p. 305- 312, 1997.

DEEP, A. *et al.* Imidazo[1,2-a]pyridine Scaffold as Prospective Therapeutic Agents. **Curr Top Med Chem**. v.17, n. 2, p. 238-250. 2017.

DE SALLES, H. D. *et al.* Imidazo[1,2-a]pyridine A3-Coupling Catalyzed by a Cu/SiO₂ Material. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 9, p. 1825–1833, 2019.

DEVI, N.; JANA, A. K.; SINGH, V. Assessment of novel pyrazolopyridinone fused imidazopyridines as potential antimicrobial agents. **Karbala International Journal of Modern Science**, v. 4, n. 1, p. 164–170, 2018.

DIVINÉ, M. *et al.* Burkitt lymphoma in adults: A prospective study of 72 patients treated with an adapted pediatric LMB protocol. **Annals of Oncology**, v. 16, n. 12, p. 1928–1935, 2005.

DUNLEAVY, K. *et al.* Low-Intensity Therapy in Adults with Burkitt's Lymphoma. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 20, p. 1915–1925, 2013.

DUNLEAVY K.; LITTLE, R.F.; WILSON, W.H. Update on Burkitt Lymphoma. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 30, n. 6, p. 1333–1343, 1 dez. 2016.

DUNLEAVY, K. Approach to the Diagnosis and Treatment of Adult Burkitt's Lymphoma. **Journal of oncology practice**, v. 14, n. 11, p.665-671, Nov 2018.

EGAN, W. J.; MERZ, K. M.; BALDWIN, J. J. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. **J Med Chem**. v. 43, n. 21, p. 3867–3877, 2000.

- EL-AWADY, R.A. *et al.* Modulation of DNA damage response and induction of apoptosis mediates synergism between doxorubicin and a new imidazopyridine derivative in breast and lung cancer cells. **DNA Repair (Amst)**. v. 37, p. 1-11. 2016.
- EVANS, B. C. *et al.* Ex Vivo Red Blood Cell Hemolysis Assay for the Evaluation of pH-responsive Endosomolytic Agents for Cytosolic Delivery of Biomacromolecular Drugs. **J Vis Exp**. n. 73 , p. 6–10, 2013.
- GALADARI, S. *et al.* Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 104, n. August 2016, p. 144–164, 2017.
- GALLUZZI, L. *et al.* Autophagy in malignant transformation and cancer progression. **EMBO J**. v. 34, n. 7, p. 856-80, 2015.
- GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Necroptosis: A Specialized Pathway of Programmed Necrosis. **Cell**, v. 135, n. 7, p. 1161–1163, 2008.
- GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death : recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death Differ**. v. 25, n.3, p. 486–541, 2018.
- GASTWIRT, J. P.; ROSCHEWSKI, M. Management of adults with burkitt lymphoma. **Clinical Advances in Hematology and Oncology**, v. 16, n. 12, p. 812–822, 2018.
- GHOSE, A. K.; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery . 1 . A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. **J Comb Chem**. v.1, n. 1, p. 55–68, 1999.
- GIDDING, CE. *et al.* Vincristine revisited. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 29, n. 3, p. 267–287, 1999.
- GLOBOCAN. Global Cancer Observatory. International Agency for Reserch on Cancer . 2020. Disponivel em:<<https://gco.iarc.fr/>> Acesso em: 28 Aug. 2021.
- GRANATO, M. *et al.* Concomitant reduction of c-Myc expression and PI3K/AKT/mTOR signaling by quercetin induces a strong cytotoxic effect against Burkitt's lymphoma. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 79, p. 393–400, 2016.
- GUENGERICH, F. P.; WATERMAN, M. R.; EGLI, M. Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 37, n. 8, p. 625–640, 2016.
- HAQUE, A. *et al.* Next Generation Antineoplastic Agents: A Review on Structurally Modified Vinblastine (VBL) Analogues. **Current medicinal chemistry**, v. 25, n. 14, p. 1650–1662, 7 maio 2018.
- HASHMI, A. A. *et al.* Ki67 index in intrinsic breast cancer subtypes and its association with prognostic parameters. **BMC Research Notes**, v. 12, n. 1, 2019.

HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, R. *et al.* Association of immunosuppression and HIV viraemia with non-Hodgkin lymphoma risk overall and by subtype in people living with HIV in Canada and the USA: a multicentre cohort study. **The lancet. HIV**, v. 6, n. 4, p. e240–e249, 1 abr. 2019.

HERRMANN, J. M.; RIEMER, J. Apoptosis inducing factor and mitochondrial NADH dehydrogenases: Redox-controlled gear boxes to switch between mitochondrial biogenesis and cell death. **Biological Chemistry**, v. 402, n. 3, p. 289–297, 2021.

HESLOP, H. E. Biology and treatment of Epstein-Barr virus-associated non-Hodgkin lymphomas. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, p. 260–266, 2005.

HEUSER, M. *et al.* Acute myeloid leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. **Annals of Oncology**, v. 31, n. 6, p. 697–712, 2020.

HRYCAY, E. G.; BANDIERA, S. M. **Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. v. 74

HOFFBRAND, A.V.; MOSS, P.A.H. Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand. 7ª edição. Brasil. Artmed, 2017.

HU, Y. *et al.* Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. **Marine Drugs**, v. 13, n. 1, p. 202–221, 2015.

HUSBY, S.; GRØNBÆK, K. Mature lymphoid malignancies: origin, stem cells, and chronicity. **Blood Advances**, v. 1, n. 25, p. 2444–2455, 28 nov. 2017.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 07/05/20.

ISHIZAWA, K. JSH practical guidelines for hematological malignancies, 2018: II. Lymphoma-6. Burkitt lymphoma (BL). **International journal of hematology**, v. 110, n. 3, p. 265–271, 20 set. 2019.

ISHITSUKA, M. *et al.* New geranylgeranylbenzoquinone derivatives from Sargassum tortile. **Chemical Society of Japan**, v. 8, p. 1269-1272, 1979.

JONES, D. S. *et al.* Pharmacokinetics of cyclodextrins and drugs after oral and parenteral administration of drug/cyclodextrin complexes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 5, p. 544–555, 2016.

KALISZ, K. *et al.* An update on Burkitt lymphoma: a review of pathogenesis and multimodality imaging assessment of disease presentation, treatment response, and recurrence. **Insights into Imaging**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2019.

KALKAVAN, H.; GREEN, D. R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. **Cell Death and Differentiation**, v. 25, n. 1, p. 46–55, 2018.

KARAR, J.; MAITY, A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 4, n. December, p. 1–8, 2011.

KLOPČIČ, I.; DOLENC, M. S. Chemicals and Drugs Forming Reactive Quinone and Quinone Imine Metabolites. **Chemical Research in Toxicology**, v. 32, n. 1, p. 1–34, 2019.

KNEZEVIC, C. E.; CLARKE, W. Cancer Chemotherapy: The Case for Therapeutic Drug Monitoring. **Ther Drug Monit.** v. 42, n. 1, p. 6-19. 2020.

KOTTA, S. *et al.* Exploring oral nanoemulsions for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 5, p. 585–598, 2012.

KUMAR, A.; JAITAK, V. European Journal of Medicinal Chemistry Natural products as multidrug resistance modulators in cancer. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 176, p. 268–291, 2019a.

KUMAR, A.; JAITAK, V. Natural products as multidrug resistance modulators in cancer. **European journal of medicinal chemistry**, v. 176, p. 268–291, 15 ago. 2019b.

L.S. KISHBAUGH, T. Pyridines and Imidazopyridines with Medicinal Significance. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 28, p. 3274–3302, 8 jun. 2016.

LEVINE, B.; KLIONSKY, D. J. Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine : Breakthroughs in baker ' s yeast fuel advances in biomedical research. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 114, n. 2, p. 10–14, 2016.

LEVINE, B.; KLIONSKY, D. J.; ARBOR, A. Development by Self-Digestion : Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy Review. **Dev Cell.** v. 6, n. 4, p. 463–477, 2004.

LI, D.; HU, C.; LI, H. Survivin as a novel target protein for reducing the proliferation of cancer cells (review). **Biomedical Reports**, v. 8, n. 5, p. 399–406, 2018.

LI, F. *et al.* Expert Opinion on Drug Discovery Are we seeing a resurgence in the use of natural products for new drug discovery ? **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 05, p. 1–4, 2019.

LI, L. T. *et al.* Predic Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 3, p. 1566–1572, 2015.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Ver.** v. 46, p. 3–26, 2001.

LIU, L. *et al.* The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. **Nature Cell Biology**, v. 21, n. 9, p. 1060-1067. 2019.

LIVSHITS, Z.; RAO, R. B.; SMITH, S. W. An approach to chemotherapy-associated toxicity. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 32, n. 1, p. 167–203, 2014.

LO, S. M. *et al.* Oxidation of apoptosis-inducing factor (AIF) to disulfide-linked conjugates. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 692, p. 108515, 2020.

MAGRATH, I. *et al.* Adults and children with small non-cleaved-cell lymphoma have a similar excellent outcome when treated with the same chemotherapy regimen. **Journal of Clinical Oncology**, v. 14, n. 3, p. 925–934, 1996.

MAIORAL, M. F. *et al.* MICONIDINE acetate, a new selective and cytotoxic compound with synergic potential, induces cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells. **Invest New Drugs**, v. 37, n. 5, p. 912-922. 2018.

MAJOLO, F. *et al.* Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: Important advances for drug discovery. **Phytochemical Society of Europe**, v. 31, n. 6, p. 196-207. 2019.

MCPHERSON, S. *et al.* Small scale design of experiment investigation of equilibrium solubility in simulated fasted and fed intestinal fluid. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 150, p. 14–23, 2020.

MELCHERS, F. Checkpoints that control B cell development. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 6, p. 2203, 1 jun. 2015.

MINARD-COLIN, V. *et al.* Rituximab for High-Risk, Mature B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma in Children. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 23, p. 2207–2219, 2020.

MOLLAZADEH, S. *et al.* Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors. **Life Sciences**, v. 214, p. 118–123, 2018.

MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 80, p. 50–64, 2018.

MOLYNEUX, E. *et al.* Burkitt's lymphoma. **Lancet (London, England)**, v. 379, n. 9822, p. 1234–1244, 2012.

MÖRÖY, T.; GEISEN, C. Cyclin E. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, n. 8, p. 1424–1439, 2004.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J Immunol Methods**. v. 65, p. 55–63, 1983.

MUEGGE, I.; HEALD, S. L.; BRITTELLI, D. Simple Selection Criteria for Drug-like Chemical Matter. **J Med Chem**. v. 44, n. 12, p. 1841-6, 2001.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 238–250, 2014.

NASTRUCCI, C.; CESARIO, A.; RUSSO, P. Anticancer drug discovery from the marine environment. **Recent patents on anti-cancer drug discovery**, v. 7, n. 2, p. 218–232, 2012.

NARANG, V.S. *et al.* Dexamethasone increases expression and activity of multidrug resistance transporters at the rat blood-brain barrier. **Am J Physiol Cell Physiol**. v. 295, n. 2, p. C440-50, 2008.

NEPSTAD, I. *et al.* The PI3K-AKT-MTOR signaling pathway in human acute myeloid leukemia (AML) cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 25 mar. 2016.

NGUYEN, L.; PAPENHAUSEN, P.; SHAO, H. The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. **Genes**, v. 8, n. 4, p. 2–22, 2017.

NGUYEN, T. X. *et al.* Recent advances in liposome surface modification for oral drug delivery. **Nanomedicine**, v. 11, n. 9, p. 1169–1185, 2016.

NICOLAOU, K. C. Catalyst: Synthetic Organic Chemistry as a Force for Good. **Chem**, v. 1, n. 3, p. 331–334, 2016.

O, B.; JG, C. Germinal centers: programmed for affinity maturation and antibody diversification. **Current opinion in immunology**, v. 45, p. 21–30, 1 abr. 2017.

PATIL, Y. P.; JADHAV, S. Novel methods for liposome preparation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 177, p. 8–18, 2014.

PHILIPPUS, A.C. Investigação química e biológica de extratos da macroalga da Antártica *Desmarestia menziesii*. 2020. Tese (Doutorado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PISTRITTO, G. *et al.* Apoptosis as anticancer mechanism : function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Aging (Albany NY)**. v. 8, n. 4, p. 603–619, 2016.

PODSIEDLIK, M.; MARKOWICZ-PIASECKA, M.; SIKORA, J. Erythrocytes as model cells for biocompatibility assessment, cytotoxicity screening of xenobiotics and drug delivery. **Chemico-Biological Interactions**, v. 332, p. 109305, 2020.

POON, R. Y. C. Cell Cycle Control : A System of Interlinking Oscillators. **Methods Mol Biol**. v. 1342, p. 3–19, 2016.

PORTA, C.; PAGLINO, C.; MOSCA, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. **Front Oncol.**, v. 4, n. 64. 2014.

PRASAD, S.; GUPTA, S. C.; TYAGI, A. K. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. **Cancer Letters**, v. 387, p. 95–105, 2017.

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977–2992, 2016.

RENVOIZÉ, C. *et al.* Apoptosis: Identification of dying cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 14, n. 2, p. 111–120, 1998.

REZATABAR, S. *et al.* RAS/MAPK signaling functions in oxidative stress, DNA damage response and cancer progression. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 9, p. 14951–14965, 2019.

RICHTER-LARREA, J. A. *et al.* Reversion of epigenetically mediated BIM silencing overcomes chemoresistance in Burkitt lymphoma. **Blood**, v. 116, n. 14, p. 2531–2542, 2010.

RIEGER, M. A.; SCHROEDER, T. Hematopoiesis. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 12, dez. 2012.

ROCHFORD, R.; CANNON, M.; MOORMANN, A. M. Endemic Burkitt's lymphoma: a polymicrobial disease? **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 182–187, fev. 2005.

RORA, A. G. L. DI; IACOBUCCI, I.; MARTINELLI, G. The cell cycle checkpoint inhibitors in the treatment of leukemias. **J Hematol Oncol.** v. 10, n. 1, p. 77, 2017.

SALEH, K. *et al.* Burkitt and Burkitt-Like Lymphomas: a Systematic Review. **Current Oncology Reports**, v. 22, n. 4, 2020.

SANTOS-PIRATH, I. M. *et al.* Apoptotic events induced by a natural plastoquinone from the marine alga *Desmarestia menziesii* in lymphoid neoplasms. **Experimental Hematology**, v. 86, p. 67- 77.e2, 2020.

SATYANARAYANA, A.; KALDIS, P. Mammalian cell-cycle regulation : several Cdks , numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. **Oncogene.** v. 28, n. 33. p. 2925–2939, 2009.

SAYEED, I. BIN *et al.* Imidazopyridine linked triazoles as tubulin inhibitors, effectively triggering apoptosis in lung cancer cell line. **Bioorganic Chemistry**, v. 80, n. July, p. 714–720, 2018.

SAWYER, P.R. *et al.* Miconazole: a review of its antifungal activity and therapeutic efficacy. **Drugs.** v. 9, n. 6, p. 406-23. 1975.

SCHAFER, K. A. The Cell Cycle: A Review. **Veterinary Pathology Online.** v. 35, n. 6. 1998.

SCHMITZ, R. *et al.* Oncogenic mechanisms in Burkitt lymphoma. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 3, p. 1–14, 2014.

SENAPATI, S. *et al.* Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 3, n. 1, p. 1–19, 2018.

SEVRIOUKOVA, I. F. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. **Antioxid Redox Signal**. v. 14, n. 12, p. 2545-79. 2011.

SHIMIZU, N. *et al.* Isolation of Epstein-Barr virus (EBV)-negative cell clones from the EBV-positive Burkitt's lymphoma (BL) line Akata: malignant phenotypes of BL cells are dependent on EBV. **Journal of Virology**, v. 68, n. 9, p. 6069, set. 1994.

SIGVARDSSON, M. Molecular Regulation of Differentiation in Early B-Lymphocyte Development. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 7, 1 jul. 2018.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* Farmacognosia do Protudo Natural ao Medicamento. 1ª edição. Brasil. Artmed. 2017.

SONGBO, M. *et al.* Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 307, n. February, p. 41–48, 2019.

SOEST, R.W.M. *et al.* World Porifera database: World Register of Marine Species. Disponível em: .
<<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=170927>>. Acesso em: 20 Aug. 2021.

STILLHART, C. *et al.* Impact of gastrointestinal physiology on drug absorption in special populations—An UNGAP review. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 147, p. 105280, 2020.

SUNKARI, S. *et al.* Synthesis and biological evaluation of new bisindole-imidazopyridine hybrids as apoptosis inducers. **Bioorganic Chemistry**, v. 87, p. 484-494, 2019.

SWERDLOW, S. H. *et al.* Introduction and overview of the classification of lymphoid neoplasms. In: The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. Lyon: IARC; 2017.

TAFANI, M. *et al.* The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

TAICHMAN, R. S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. **Blood**, v. 105, n. 7, p. 2631-2639, Apr 2005.

TAKEDA, T. *et al.* Cd49d and cd49e induce cell adhesion-mediated drug resistance through the nuclear factor- κ B pathway in burkitt lymphoma. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 71, n. 4, p. 1–12, 2020.

THOMAS, D. A. *et al.* Hyper-CVAD Program in Burkitt's - Type Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. **J Clin Oncol**. v. 17, n. 8, p. 2461–2470, 2019.

TIAN, B.; HUA, S.; LIU, J. Cyclodextrin-based delivery systems for chemotherapeutic anticancer drugs: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 232, p. 115805, 2020.

TOMSKA, K. *et al.* Drug-based perturbation screen uncovers synergistic drug combinations in Burkitt lymphoma. **Scientific Reports** **2018 8:1**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 13 ago. 2018.

TORNIO, A.; BACKMAN, J. T. Cytochrome P450 in Pharmacogenetics: An Update. **Adv Pharmacol.** v. 83, p. 3-32. 2018.

VOSS, A. K.; STRASSER, A. The essentials of developmental apoptosis. **F1000Res.** v. 9, p., 2020.

WAGHRAY, D.; ZHANG, Q. Inhibit or Evade Multidrug Resistance P-Glycoprotein in Cancer Treatment. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 12, p. 5108–5121, 2018.

WALI, A. *et al.* Natural products against cancer: Review on phytochemicals from marine sources in preventing cancer. **Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society**, v. 27, n. 6, p. 767–777, 1 set. 2019.

WALTER, L.O. Avaliação do efeito citotóxico de uma orto-quinona isolada da alga parda *Styopodium zonale* sobre células de linhagem de mieloma múltiplo. 2019. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

WÄSTERLID, T. *et al.* Impact of chemotherapy regimen and rituximab in adult Burkitt lymphoma: A retrospective population-based study from the Nordic Lymphoma Group. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 7, p. 1879–1886, 2013.

WENZEL, E. S.; SINGH, A. T. K. Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer. **In vivo.** v. 32, p. 1–5, 2018.

World Health Organization. Global Health Observatory. Geneva: World Health Organization; 2018. who.int/gho/database/en/. Accessed June 21, 2020.

YANG, C. *et al.* Ki67 targeted strategies for cancer therapy. **Clinical and Translational Oncology**, v. 20, n. 5, p. 570–575, 2018a.

YANG, C.; HORWITZ, S. Taxol ® : The First Microtubule Stabilizing Agent. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1733, 2017.

YANG, H. *et al.* The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 1, p. 1–10, 2018b.

YETISGIN A.A. *et al.* Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. **Molecules.** v. 25, n. 9, p. 2193. 2020.

ZAIDIEH, T. *et al.* ROS as a novel indicator to predict anticancer drug efficacy. **BMC**

Cancer, v. 19, n. 1, p. 1–14, 2019.

ZAYAC, A. S.; OLSZEWSKI, A. J. Burkitt lymphoma: bridging the gap between advances in molecular biology and therapy. **Leukemia and Lymphoma**, v. 61, n. 8, p. 1784–1796, 2020.

ZECH, L. *et al.* Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. **International journal of cancer**, v. 17, n. 1, p. 47–56, 1976.

ZENG, R. *et al.* STAT3 mediates multidrug resistance of Burkitt lymphoma cells by promoting antioxidant feedback. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 488, n. 1, p. 182–188, 2017.

ZHANG, L. *et al.* Application of 2016 WHO classification in the diagnosis of paediatric high-grade MYC-negative mature B-cell lymphoma with Burkitt-like morphological features. **J Clin Pathol**. v. 73, p. 536-570, 2020.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA EM SERES HUMANOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de mecanismos de citotoxicidade e morte celular em amostras de pacientes portadores de neoplasias hematológicas e não hematológicas e em amostras de indivíduos saudáveis.

Pesquisador: Maria Cláudia Santos da Silva

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 80430317.0.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.838.107

Apresentação do Projeto:

"Avaliação de mecanismos de citotoxicidade e morte celular em amostras de pacientes portadores de neoplasias hematológicas e não hematológicas e em amostras de indivíduos saudáveis. Projeto de pesquisa que tem como objetivo investigar o efeito citotóxico de compostos de origem natural e sintética em amostras de SP e MO de pacientes portadores de neoplasias hematológicas atendidos no HU da UFSC e também em amostras de SP de indivíduos saudáveis, utilizados como modelos de células não neoplásicas (controle não neoplásico). As informações resultantes deste estudo serão de grande importância na compreensão da atividade desses compostos, o que poderá ser utilizado para o desenvolvimento de novos fármacos visando o tratamento de pacientes portadores de neoplasias malignas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar o efeito citotóxico de compostos de origem natural e sintética com potencial antitumoral em células obtidas de amostras de SP e MO de pacientes portadores de neoplasias hematológicas atendidos no HU da UFSC no momento do diagnóstico (antes do primeiro tratamento).

Objetivo Secundário:

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 2.838.107

Investigar o efeito citotóxico de compostos de origem natural e sintética com potencial antitumoral em células obtidas de amostras de SP de voluntários saudáveis, utilizadas como modelo de células não neoplásicas para fins comparativos

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**Riscos:**

O estudo não apresenta riscos para os pacientes participantes, uma vez que serão utilizadas nos experimentos apenas suas amostras de SP e MO e os mesmos não terão contato direto com os compostos que serão investigados. As amostras serão coletadas no HU/UFSC no momento do diagnóstico, ou seja, os pacientes não serão submetidos a novos procedimentos invasivos ou desconfortos adicionais. Não haverá duas coletas, pois será aproveitado o mesmo material coletado para os exames laboratoriais. Os voluntários saudáveis incluídos neste trabalho cederão apenas uma amostra de SP coletada por punção venosa por profissionais qualificados do Laboratório de Análises Clínicas da UFSC, portanto também não estão sujeitos a quaisquer riscos caso aceitem participar da pesquisa.

Benefícios:

É possível perceber a necessidade de se investigar novas estratégias de tratamento para pacientes portadores de câncer, não apenas para melhorar sua sobrevivência, mas também sua qualidade de vida durante o tratamento. As informações resultantes deste estudo provavelmente não trarão benefícios diretos aos pacientes e voluntários incluídos no mesmo, uma vez que existe um longo caminho entre a investigação de novos compostos *in vitro* e sua aprovação para ensaios clínicos. No entanto, a proposta da presente pesquisa de investigar o efeito de novos compostos promissores em amostras de pacientes portadores de neoplasias malignas poderá ser de grande importância na compreensão e no desenvolvimento futuro de novos fármacos contra neoplasias hematológicas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata o presente de um projeto de pesquisa coordenado pela Prof^a. Dr^a. Maria Cláudia Santos da Silva do Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas da UFSC, cuja finalidade é investigar o efeito citotóxico de compostos de origem natural e sintética em amostras de SP e MO de pacientes portadores de neoplasias hematológicas atendidos no HU da UFSC e também em

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 2.838.107

amostras de SP de indivíduos saudáveis, utilizados como modelos de células não neoplásicas (controle não neoplásico). Os participantes da presente pesquisa serão selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão determinados no projeto. As amostras de pacientes utilizadas para a pesquisa serão sangue periférico (SP) ou medula óssea (MO), as quais serão coletadas no momento do diagnóstico (antes do primeiro tratamento) no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As amostras de voluntários utilizadas como controle de modelo não neoplásico serão de sangue periférico, coletado por punção venosa no Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC. As amostras acondicionadas serão transportadas até o Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) do HU/UFSC, onde serão processadas para isolamento das células neoplásicas e células mononucleadas. As células serão então incubadas com compostos de origem natural e sintética previamente selecionados em linhagens celulares e a viabilidade celular será determinada pelo método do MTT. O estudo tem relevância científica, a documentação está completa e o TCLE apresentado atende a todas as exigências da Resolução CNS nº466/12 e suas complementares. Assim, recomendamos a sua aprovação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes documentos obrigatórios:

- Informações básicas do projeto - formulário PB;
- Folha de rosto;
- Declaração do pesquisador;
- Declaração da Instituição - HU;
- TCLE;
- Projeto de pesquisa;
- Cronograma.

O TCLE apresentado atende na íntegra a Resolução CNS 466/12.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram detectadas pendências ou inadequações neste projeto.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC**



Continuação do Parecer: 2.838.107

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1004163.pdf	13/08/2018 11:52:19		Aceito
Outros	carta_resposta_agosto.docx	13/08/2018 11:43:45	Mariana Franzoni Maioral	Aceito
Cronograma	cronograma_modificado_agosto.docx	13/08/2018 11:42:56	Mariana Franzoni Maioral	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado_agosto.docx	13/08/2018 11:42:47	Mariana Franzoni Maioral	Aceito
Folha de Rosto	folha.pdf	27/11/2017 15:16:51	Mariana Franzoni Maioral	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_maclau.pdf	06/11/2017 14:46:37	Mariana Franzoni Maioral	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_hu.pdf	06/11/2017 14:45:24	Mariana Franzoni Maioral	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	pesquisa_PB.doc	07/10/2017 14:27:16	Mariana Franzoni Maioral	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 22 de Agosto de 2018

**Assinado por:
Maria Luiza Bazzo
(Coordenador)**

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br