



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

JOÃO VITOR STEIMBACH

**Investigação do Efeito Citotóxico das Imidazopiridinas DSH55 e
DSH56 sobre Células de Leucemia Aguda**

FLORIANÓPOLIS

2022

João Vitor Steimbach

Investigação do Efeito Citotóxico das Imidazopiridinas DSH55 e DSH56 sobre Células de Leucemia Aguda

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

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

Coorientadora: Ms. Natália Marcelli Stephanes

FLORIANÓPOLIS

2022

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

Steimbach, João Vitor

Investigação do Efeito Citotóxico das Imidazopiridinas
DSH55 e DSH56 sobre Células de Leucemia Aguda / João Vitor
Steimbach ; orientadora, Maria Cláudia Santos da Silva,
coorientadora, Natalia Marcelli Stephanes, 2022.

35 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Leucemia mielóide aguda. 3.
Imidazopiridinas. 4. Citotoxicidade. 5. Apoptose. I.
Silva, Maria Cláudia Santos da. II. Stephanes, Natalia
Marcelli. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Farmácia. IV. Título.

João Vitor Steimbach

Investigação do Efeito Citotóxico das Imidazopiridinas DSH55 e DSH56 Sobre Células de Leucemia Aguda

Este trabalho de conclusão de curso foi julgado adequado para a obtenção do Título de Bacharel em Farmácia e aprovado em sua forma final pela banca examinadora.

Florianópolis, 29 de Julho de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. ^a Dr.^a Maria Cláudia Santos da Silva - UFSC
Orientadora

Ms. Natália Marcelli Stephanes - UFSC
Coorientadora

Prof. Dr. Alfeu Zanotto-Filho - UFSC

Prof. ^a Dr.^a Izabella Thaís da Silva - UFSC

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à meus pais e irmã, **Angela, Dirceu e Ana**, que me deram todo suporte e encorajamento desde muito pequeno para que seguisse meus sonhos. Agradeço também a minha família, por acreditarem em mim e em especial ao meu avô, **Selmo**, que tanto me ensinou desde muito pequeno. Espero que esteja orgulhoso de mim onde estiver.

Agradeço à minha orientadora, professora e mestre **Maria Cláudia**, que inspira excelência e comprometimento em todos os seus orientados, nos desafiando a exceder cada vez mais nossos limites. À minha co-orientadora, quem ficou ao meu lado quando dava meus primeiros passos no fluxo laminar e citômetro do LOEH, que tanto me ensina em todos os aspectos da vida, que esteve ao meu lado em tantos projetos, e que agora posso chamar de amiga, **Natália Marcelli**.

Agradeço às demais membras do LOEH, **Lis, Laura, Ana e Amanda**, por todos os ensinamentos, risadas e cafés em nossas longas tardes de experimentos. À minhas primeiras orientadoras em cultura celular, **Carolina Amália e Jussara Maria**, pela oportunidade que deram à um aluno de outro curso e sem experiência na pesquisa, me apresentaram este universo de possibilidades pelo qual hoje sou apaixonado.

Agradeço às minhas amigas, **Bruna, Yasmim** e demais pesseguinhas, amigadas que cultivei nos últimos cinco anos e tanto me ouviram reclamar sem desistir de nossa amizade, espero poder contar com cada uma para uma boa fofoca ou desabafos mesmo que distantes.

Agradeço às instituições, CAPES, PIBIC e PIBIT, por financiarem este trabalho e outros projetos que tive o prazer de desenvolver em minha trajetória. À UFSC, que nos últimos anos foi (quase) minha casa e me acolheu desde o primeiro dia, abriu meus olhos para o mundo e as portas para o futuro.

Por fim, agradeço aos demais docentes do curso, em especial aos membros da banca, por todo conhecimento que me transmitiram em suas aulas e fora dessas, e por servirem como fonte de inspiração inesgotável, torço para que um dia tenha a honra de lecionar entre vocês.

“Não é fácil..., nem difícil! É só um jeitinho.”
(Selmo Jonas Steimbach)

RESUMO

Entre as neoplasias hematológicas as leucemias mielóides agudas (LMA) se caracterizam por um bloqueio de maturação e proliferação descontrolada de progenitores mielóides na medula óssea, os quais podem infiltrar o sangue periférico e/ou outros tecidos. Essas doenças se destacam pela elevada prevalência no Brasil e no mundo, e, apesar dos avanços no tratamento, a quimioterapia ainda é a forma de terapia mais utilizada. No entanto, está associada a elevada citotoxicidade e efeitos adversos que levam a altas taxas de morbidade e mortalidade. Sendo assim, a busca por novos compostos para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento LMA é de grande interesse para a indústria farmacêutica. Nessa perspectiva, e tendo em vista as diversas atividades biológicas já descritas sobre compostos da classe das imidazopiridinas, incluindo atividade antineoplásica, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade citotóxica das imidazopiridinas DSH55 e da DSH56, sobre células de linhagem de LMA (K562). O efeito citotóxico dos compostos sobre a K562 foi analisado pelo método de MTT. Os resultados mostram que ambos os compostos diminuíram significativamente a viabilidade celular de forma tempo e concentração dependentes. Além disso, para avaliar a capacidade dos compostos causar hemólise, eritrócitos de indivíduos saudáveis foram incubados a concentrações crescentes, até cinco vezes maior que a CI_{50} de cada composto, e, foi observado que, quando comparado ao controle negativo, não houve diferença significativa na liberação de hemoglobina. Além disso, por meio da análise da morfologia das células coradas com brometo de etídio e laranja de acridina e detecção da exposição de resíduos de fosfatidilserina por citometria de fluxo, foi observado que o mecanismo de morte celular induzido pelas imidazopiridinas DSH55 e DSH56 envolve apoptose. Em conjunto, os resultados obtidos permitem sugerir que as imidazopiridinas DSH55 e da DSH56 causam apoptose na células nas células K562, no entanto, para um avanço no desenvolvimento dessas moléculas como possíveis protótipos de novos fármacos, será necessário a avaliação de outras proteínas envolvidas no mecanismo de ação da apoptose.

Palavras-chave: Leucemia mielóide aguda; imidazopiridinas; citotoxicidade; apoptose.

ABSTRACT

Among all hematologic neoplasms, acute myeloid leukemias (AML) are characterized by a blockage in maturation and uncontrolled proliferation of myeloid progenitors located in the bone marrow; these can escape the bone marrow towards peripheral tissues such as the blood. These diseases are known for their significant prevalence in Brazil and around the world, nevertheless, even with some advancements in treatments, chemotherapy is still the most often used treatment. However, it's frequently associated with high toxicity and side-effects that lead to morbidity and mortality. With that in mind, research for new compounds aiming in the development of drugs for the treatment of AML is of high interest for the pharmaceutical industry. From this point of view, and minding all biological activities reported for other imidazopyridines, including antineoplastic, the aim of this paper was to evaluate the cytotoxicity of DSH55 and DSH56, two imidazopyridines, over a AML cell line (K562). Cytotoxicity was assessed using MTT. Results have shown that both compounds have significantly diminished cell viability in a time-dose dependent manner. Furthermore, in order to test for hemolysis potential, healthy erythrocytes were incubated with a gradient of concentrations, up to five-fold each compound's IC_{50} , and, compared to an untreated control, there were no significant differences in hemoglobin liberation. Beyond that, using ethidium bromide and acridine orange the morphology was evaluated as well as the exposition of phosphatidylserine residues by flow cytometry. Combined, these results allow us to suggest that the cell death mechanism induced by DHS55 and DSH56 in K562 cells involves apoptosis, nevertheless, in order to strengthen this claim other proteins involved with apoptosis should be evaluated.

Key-words: Acute myeloid leukemia; cytotoxicity; imidazopyridines; apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de análises para o diagnóstico de neoplasias hematológicas.....	15
Figura 2 - Análise em três etapas para o diagnóstico de LMA.....	16
Figura 3 - Estrutura química das imidazopiridinas testadas.....	19
Figura 4 - Curva de concentração e tempo-resposta das imidazopiridinas DSH55 e DSH56 sobre células de LMA.....	23
Figura 5 - Avaliação do potencial hemolítico.....	25
Figura 6 - Avaliação morfológica de células de LMA tratadas com DSH55 e DSH56.....	27
Figura 7 - Efeito das imidazopiridinas DSH55 e DSH56 sobre a exposição de resíduos de fosfatidilserina marcados com Anexina V.....	28

LISTA DE ABREVIações

ANOVA	Análise de variância
CI₅₀	Concentração Inibitória 50%
CEPSH	Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LA	Leucemia aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
MTT	Brometo de 3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução de tampão fosfato
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro fetal bovino

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER	13
2.2 LEUCEMIAS AGUDAS	13
2.3 MORTE CELULAR E APOPTOSE	15
2.4 IMIDAZOPIRIDINAS	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 LINHAGENS CELULARES E CULTIVO CELULAR	18
4.2 ORIGEM DOS COMPOSTOS.	18
4.3 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM AS IMIDAZOPIRIDINAS SINTÉTICAS E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DO MTT.	19
4.4 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA COM BROMETO DE ETÍDIO E LARANJA DE ACRIDINA.	20
4.5 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DOS RESÍDUOS DE FOSFATIDILSERINA POR CITOMETRIA DE FLUXO.	21
4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS IMIDAZOPIRIDINAS SOBRE CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO.	21
4.6.1 Avaliação Do Potencial Hemolítico.	22
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 EFEITO CITOTÓXICO DE IMIDAZOPIRIDINAS SOBRE CÉLULAS DE LMA.	23
5.2 EFEITO DAS IMIDAZOPIRIDINAS DSH55 E DSH56 SOBRE ERITRÓCITOS SAUDÁVEIS	24
5.3 EFEITO DAS IMIDAZOPIRIDINAS DSH55 E DSH56 NA INDUÇÃO DA APOPTOSE	25
6. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as neoplasias malignas estão entre as principais causas de morbidades e mortalidade no mundo, afetando milhões de indivíduos de ambos os sexos e de todas as faixas etárias. Em 2020, uma estimativa global apontou a ocorrência de 19,3 milhões de casos incidentes e 9,9 milhões de mortes relacionadas a essa condição clínica (GLOBOCAN, 2022). Em relação ao Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que tenham ocorrido aproximadamente 626 mil novos casos de neoplasias malignas em 2020, e aproximadamente 226 mil óbitos relacionados ao câncer em 2020 (INCA, 2021). Até o ano de 2040, a OMS prevê um aumento mundial de 56% no número de casos incidentes e de 64% no número de mortes causadas, ou em decorrência, dessas neoplasias (IARC, 2022).

Ainda, segundo a OMS, 62% dos diagnósticos de câncer ocorrem em países em desenvolvimento, como o Brasil. Nas regiões como África, Ásia e América latina concentram-se 72% do total de mortes em decorrência dessas neoplasias malignas. Isso se deve, em parte, às dificuldades de acesso a um diagnóstico rápido e a tratamentos de alto custo, os quais, muitas vezes, não estão disponíveis para grande parte desta população (THE CANCER ATLAS, 2022).

Tendo em vista o aumento global na incidência de neoplasias malignas, incluindo as leucemias agudas (LA), sobretudo em países em desenvolvimento como o Brasil, aliado a altas taxas de recidivas, ao alto custo dos tratamentos disponíveis, e à citotoxicidade não seletiva dos agentes antineoplásicos usados nos esquemas terapêuticos, atualmente propostos pelo Ministério da Saúde, é evidente a necessidade da busca por novos tratamentos custo-efetivos que apresentem poucos ou nenhum efeitos adversos para os pacientes, no entanto, esse ainda é um desafio para os pesquisadores na área da oncologia.

Nesse contexto, as imidazopiridinas destacam-se como uma classe de compostos cuja estrutura química fundamental apresenta grande potencial como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos (SHARMA et al., 2021). Na literatura, vários trabalhos demonstram diferentes atividades biológicas de derivados estruturais de imidazopiridinas, tais quais antituberculosa (TETALI et al., 2020),

antimalárica (PENZO et al., 2019) e antineoplásica (BACCON-SOLLIER et al., 2020; DAMGHANI et al., 2021; GÜÇLÜ et al., 2018; SHARMA et al., 2021); .

Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar a atividade citotóxica das imidazopiridinas DSH55 e da DSH56, sobre células de linhagem de LMA (K562), bem como investigar os possíveis mecanismos de morte celular envolvidos na citotoxicidade do composto mais efetivo. Com isso, o presente estudo busca contribuir com esforço mundial na investigação de novas opções terapêuticas para o tratamento das neoplasias hematológicas, apresentando um novo protótipo para o desenvolvimento de fármacos antileucêmicos seletivos para as células neoplásicas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER

Câncer, também denominado de neoplasia maligna, é um termo utilizado para definir um grupo heterogêneo de doenças que apresentam como principais características a desregulação da proliferação celular, a capacidade de invadir tecidos adjacentes ou órgãos distantes e de evadir a vigilância do sistema imunológico (HANAHAN *et al.*, 2022; GLOBOCAN, 2020). O desenvolvimento das neoplasias está ligado à mutações espontâneas ou causadas por fatores ambientais, tais como o tabagismo, exposição à radiação ionizante entre outros fatores agressivos à homeostasia.

Atualmente, estão disponíveis na clínica quatro principais modalidades de tratamentos para as neoplasias, a ressecção cirúrgica, a radioterapia, a imunoterapia e quimioterapia, as quais podem ser utilizadas de forma isolada ou combinada (MILLER *et al.*, 2019). As cirurgias são determinantes em tumores sólidos, sem sinais de metástase, contudo não é opção para as neoplasias hematológicas. A radioterapia e a imunoterapia são indicadas em conjunto com as cirurgias, como forma de erradicar células marginais restantes da ressecção. Já a quimioterapia, por ter seu efeito sistêmico, pode ser utilizada de forma independente de outros tratamentos, tanto em tumores sólidos quanto em neoplasias hematológicas. Contudo, o principal fator limitante para o uso dos quimioterápicos continua sendo a citotoxicidade não específica, o que resulta em severos efeitos adversos (SCHIRRMACHER, 2019).

2.2 LEUCEMIAS AGUDAS

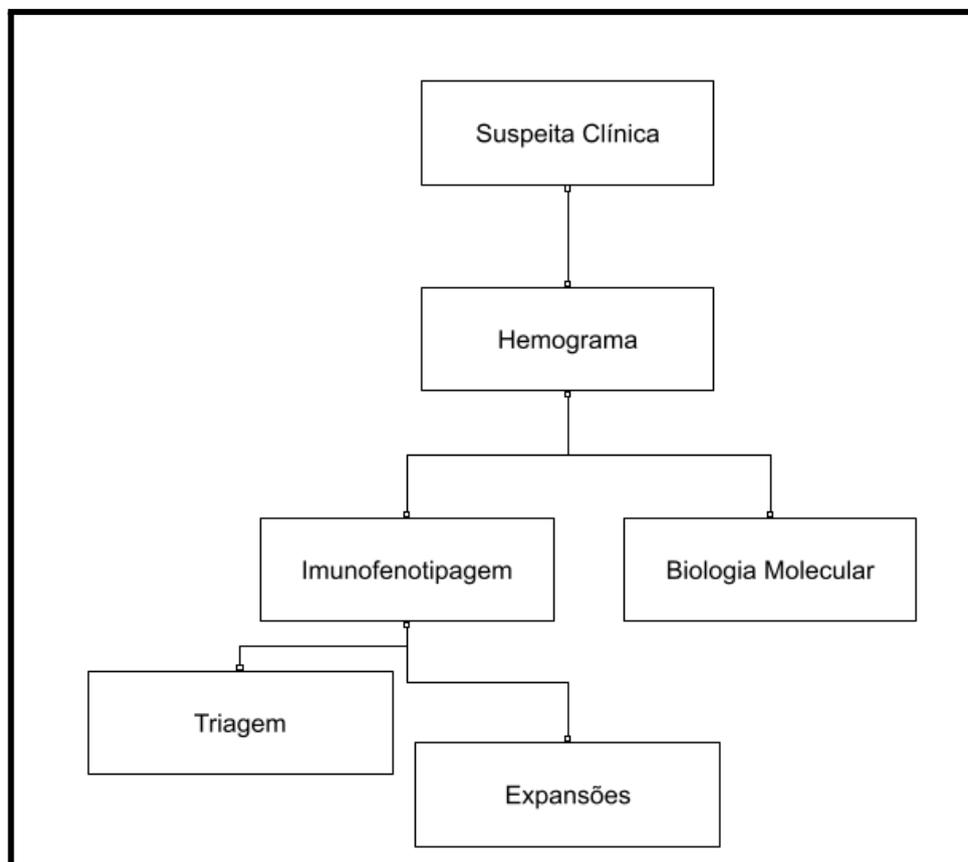
As leucemias agudas são neoplasias hematológicas caracterizadas pela parada da diferenciação normal das células hematopoiéticas e pela proliferação clonal exacerbada de uma célula progenitora mielóide ou linfóide, que resulta no acúmulo de células imaturas na medula óssea e/ou sangue periférico (SWERDLOW *et al.*, 2017). Esse grupo de neoplasias está listado no *ranking* dos dez tipos de

neoplasias malignas mais frequentes no Brasil. Para o triênio de 2020-2022 estão previstos 10.810 novos casos de leucemias, 5.920 em homens e 4.890 em mulheres. Essas doenças hematológicas acometem indivíduos de todas as faixas etárias e, por isso, causam um impacto negativo tanto na expectativa de vida do país, quanto na qualidade de vida dos pacientes e na longevidade da população idosa (INCA, 2022).

Segundo a OMS, as LAs são doenças heterogêneas divididas em três subtipos principais: leucemia mielóide aguda (LMA), quando há comprometimento da linhagem mielóide, leucemia linfoblástica aguda quando apenas progenitores linfóides estão envolvidos e LA de linhagem ambígua quando há o envolvimento de ambas as linhagens hematológicas (SWERDLOW et al., 2017).

De acordo com os critérios da OMS, o diagnóstico das LAs baseia-se na análise morfológica das células leucêmicas observadas no sangue periférico, hemograma, e/ou na medula óssea; na análise imunofenotípica por citometria de fluxo e na avaliação das alterações genéticas por citogenética e/ou biologia molecular (Figura 1), estas análises são realizadas de forma paralela e seus resultados contribuem para o diagnóstico diferencial das neoplasias hematológicas, conforme pode ser observado no exemplo apresentado na Figura 2 (CONITEC, 2014; SWERDLOW et al, 2017). Assim, pela classificação da OMS, para a LMA, foco deste estudo, foram estabelecidas sete subcategorias, como segue: LMA associada a anormalidades genéticas recorrentes, LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia, neoplasias mielóides associadas ao tratamento, LMA não categorizada nos itens anteriores, sarcoma mielóide, proliferação mielóide relacionada com síndrome de Down e neoplasia de células blásticas dendríticas plasmocitoides (SWERDLOW et al., 2017).

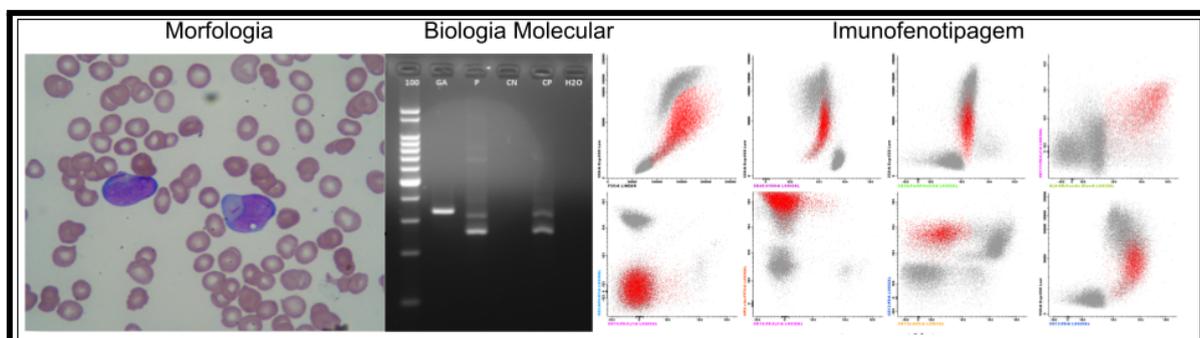
Figura 1 - Fluxograma de análises para o diagnóstico de neoplasias hematológicas.



Fonte: O autor.

O tratamento de escolha depende do diagnóstico e varia de acordo com o subtipo de LMA e com o prognóstico do paciente, porém, de forma geral consiste de uma terapia de indução, na qual é utilizado uma combinação de antraciclina e citarabina, seguida de uma terapia de consolidação, que varia de acordo com o prognóstico do paciente (ESTEY *et al.*, 2018). Esse esquema terapêutico segue, em sua maior parte, inalterado nos últimos quarenta anos e utiliza medicamentos com citotoxicidade pouco específica, o que resulta em efeitos adversos, como náusea, vômito, alopecia, imunossupressão, fadiga, neuropatia periférica e perda de peso (HOCHHAUS *et al.*, 2020). Esses efeitos prejudicam a qualidade de vida dos pacientes e podem levar ao abandono do tratamento, o que contribui com as baixas taxas de sobrevivência em cinco anos, de apenas 30% - 35% dos pacientes jovens (KANTARJIAN *et al.*, 2021).

Figura 2 - Análise em três etapas para o diagnóstico de LMA.



Fonte: O autor.

Por esses motivos, nas últimas duas décadas, o objetivo dos pesquisadores na área da oncologia experimental consiste na descoberta de compostos que tenham maior seletividade e eficiência na indução de células neoplásicas à morte, com poucos efeitos adversos sistêmicos e que sejam de baixo custo (FENG et al. 2016; OLIVEIRA, 2015).

2.3 MORTE CELULAR E APOPTOSE

De acordo com o descrito na literatura, existem diversos mecanismos de morte celular, os quais ocorrem por diferentes vias de sinalização intracelular e/ou extracelular em resposta a estímulos distintos. Nas neoplasias, é comum que haja supressão de uma ou mais vias de sinalização, ao contrário do observado na homeostase celular. Após sofrer danos irreversíveis ou sob estresse fisiológico, as células neoplásicas muitas vezes são resilientes a estímulos de morte celular programada, devido a mutações que levam a uma expressão proteica aberrante, essa resistência à morte celular é considerada uma das bases da carcinogênese (PAVLOVA et al., 2016).

Os processos de morte celular são classificados de acordo com suas características bioquímicas, fenotípicas e morfológicas. Na morte celular não regulada ocorre lise da membrana celular e liberação do conteúdo citoplasmático no espaço extracelular, o que resulta em intensa resposta inflamatória. Já na morte celular regulada, como a apoptose, não há liberação desse conteúdo, o que contribui para manutenção da homeostase. Nessa perspectiva, a apoptose é um tipo de morte

celular regulada, com vias de sinalização bem definidas, por isso, é desejada para o desenvolvimento de novos quimioterápicos, pois causam mínima resposta inflamatória e pouco dano ao tecido adjacente (D'ARCY, 2019).

De acordo com a última atualização do Comitê de Nomenclaturas em Morte Celular, a apoptose foi dividida em apoptose intrínseca e extrínseca, duas modalidades de morte celular regulada que, em linhas gerais, convergem na ativação da cascata das caspases e culminam em alterações morfológicas e bioquímicas características de cada uma das formas de morte celular (GALLUZZI et al., 2018). Portanto, esse processo de morte celular pode ser reconhecido pela avaliação de características morfológicas, como a redução do volume celular, condensação da cromatina, formação de prolongamentos da membrana, externalização dos resíduos de fosfatidilserina, permeabilidade de membrana e formação de corpos apoptóticos, bem como características imunofenotípicas, como a expressão de fatores pró e anti-apoptóticos, e moleculares, como a fragmentação do DNA (D'ARCY, 2019).

2.4 IMIDAZOPIRIDINAS

As imidazopiridinas são compostos sintéticos, obtidos a partir da fusão dos heterociclos imidazol e piridina por diferentes rotas de síntese. Esses compostos compõem uma classe de fármacos já utilizados na clínica, entre eles o zolpidem, um hipnótico não-benzodiazepínico modulador GABAérgico. Contudo, além dessa, outras atividades foram descritas para a classe. Na literatura, foram avaliados diversos derivados estruturais que demonstraram atividades tais como: antituberculosa (TETALI et al., 2020), antimalárica (PENZO et al., 2019), antidiabética, antiviral, agonista do sistema nervoso central, anti-inflamatória (KHATUN et al., 2021) e antineoplásica (BACCON-SOLLIER et al., 2020; DAMGHANI et al., 2021; GÜÇLÜ et al., 2018; SHARMA et al., 2021;). No entanto, até o momento poucos trabalhos avaliam a atividade citotóxica da classe sobre células de leucemias agudas (GARNAR-WORTZEL et al., 2021; PATEL et al., 2022; BAO et al., 2009), especialmente em células de LMA (MARTÍNEZ-URBINA et al., 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito citotóxico das imidazopiridinas sintéticas DSH55 e DSH56 sobre células de linhagem de LMA (K562) e avaliar o mecanismo de morte celular envolvido na citotoxicidade desses compostos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito citotóxico *in vitro* de das imidazopiridinas sintéticas DSH55 e DSH56 sobre as células K562 e determinar suas respectivas concentrações inibitórias 50% (CI₅₀)
- Determinar o potencial hemolítico de ambas as imidazopiridinas sobre eritrócitos de doadores saudáveis.
- Investigar o mecanismo de morte celular induzido pelas imidazopiridinas DSH55 e DSH56 através de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS CELULARES E CULTIVO CELULAR

No presente trabalho foram utilizadas células de linhagem de LMA (K562) de origem humana, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Alberto Orfao, do *Cientro de Investigación del Cancer* da Universidade de Salamanca da Espanha.

As células foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI, Gibco®) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB, Gibco®), 10.000 U/mL de penicilina (Gibco®), 10.000 µg/mL de estreptomicina (Gibco®) e 10 mM de tampão HEPES (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'[2-etanosulfônico], (Gibco®), em pH 7,4 e mantidas em estufa úmida, a uma temperatura de 37°C, com 5% de CO₂.

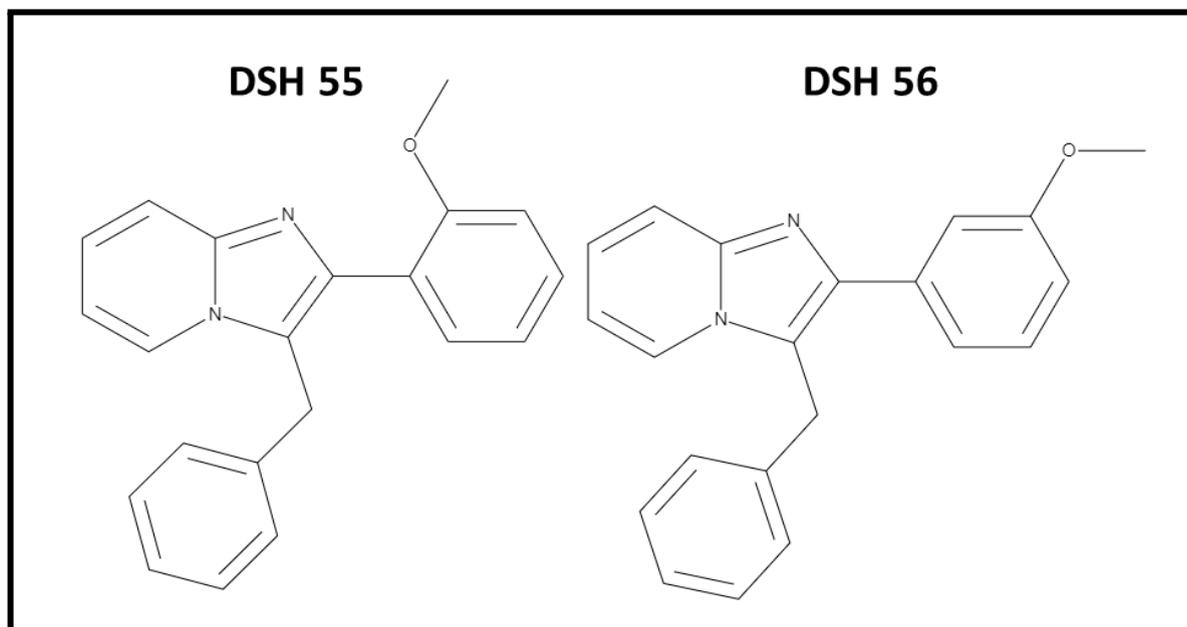
A viabilidade das suspensões celulares foi avaliada pelo método de exclusão com o corante Azul de Trypan 0,4% (Sigma-Aldrich®) antes de cada experimento (TENNANT et al., 1964). Os protocolos experimentais foram conduzidos apenas quando mais de 95% das células foram consideradas viáveis. A densidade celular utilizada, bem como o tempo de incubação com os compostos, foram definidos de acordo com cada protocolo experimental.

4.2 ORIGEM DOS COMPOSTOS.

As imidazopiridinas DSH55 e DSH56 (Figura 3), utilizadas neste trabalho, foram sintetizadas no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais da (LACFI) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), conforme descrito por Salles et al. (2019), sob a orientação do professor Dr. Ricardo Ferreira Affeldt.

Para caracterização dos compostos foram utilizadas técnicas de ressonância magnética nuclear, cromatografia de camada fina e espectrometria de massas de alta resolução.

Figura 3 - Estrutura química das imidazopiridinas testadas.



Fonte: O autor.

4.3 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM AS IMIDAZOPIRIDINAS SINTÉTICAS E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DO MTT.

O MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) é um sal tetrazólico de coloração amarela, que é reduzido à cristais formazan, de cor azulada, no interior das mitocôndrias de células viáveis (VAN DE LOOSDRECHT et al., 1991). Dessa forma, o ensaio funciona como um indicador da função mitocondrial, e, conseqüentemente, da viabilidade celular (MOSMANN et al., 1983).

Antes dos experimentos, ambas as imidazopiridinas sintéticas foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck Millipore®) na concentração de 10 mM e armazenadas a 4 °C, e, no momento do tratamento, essa solução foi diluída em meio RPMI suplementado.

As células K562 foram cultivadas em placas de 96 poços na densidade de 5×10^4 células/poço; $2,5 \times 10^4$ células/poço e $1,25 \times 10^4$ células/poço por 24 h, 48 h e 72 h, respectivamente, e incubadas com os compostos em concentrações crescentes (1, 5, 10, 25, 50 e 100 μ M). Foram utilizados dois controles, um de células sem

tratamento e outro acrescido de 2% do veículo de dissolução (DMSO) ao meio de cultura.

Após o tempo de incubação de cada experimento, o sobrenadante foi removido, e, uma solução de MTT (Sigma-Aldrich®) diluído em meio de cultura na proporção de 1:10, foi adicionado às placas, as quais foram incubadas por um período de 3 h à 37 °C. Na sequência, o sobrenadante foi removido, e os precipitados formados em cada poço foram dissolvidos utilizando-se uma solução de álcool isopropílico (Proc9®) + HCl (0,04N) (Sigma-Aldrich®), centrifugados e transferidos para uma nova placa, onde foi realizada a leitura das absorbâncias no comprimento de onda 540 nm em um espectrofotômetro (Heales, MB-580®). A absorbância do grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como 100 % de viabilidade celular e a concentração inibitória 50 % (CI₅₀) foi obtida a partir da regressão linear das curvas concentração e tempo-resposta, utilizando-se o *software* GraphPad Prism 9.

4.4 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA COM BROMETO DE ETÍDIO E LARANJA DE ACRIDINA.

Para a avaliação do efeito das imidazopiridinas sobre células de LMA foi utilizada microscopia de fluorescência em conjunto com os corantes fluorescentes laranja de acridina e brometo de etídio. O laranja de acridina é um corante permeável à membrana citoplasmática intacta que interage com o DNA emitindo fluorescência verde às células quando observadas em microscópio de fluorescência. Já, o brometo de etídio permeia apenas a membrana citoplasmática de células que tiveram o controle de permeabilidade comprometido. Dessa forma, é possível diferenciar células morfologicamente normais de células em apoptose (membrana íntegra, núcleos picnóticos, cromatina nuclear condensada e a formação de corpos apoptóticos) e de células que apresentam permeabilidade de membrana aumentada (células em apoptose tardia e células em necrose, as quais emitem fluorescência laranja quando o brometo de etídio intercala-se ao DNA) (RENVOIZÉ et al., 1998).

Para a realização do ensaio, as células K562 ($1,0 \times 10^6$ células/ 4 mL) foram tratadas com as imidazopiridinas na CI₅₀ de 24 h. Após 18 h de incubação, as células

foram lavadas com PBS (Laborclin®) e o sedimento celular foi ressuspenso em uma solução constituída de brometo de etídio (5 µg/mL) (Sigma-Aldrich®) e laranja de acridina (10 µg/mL) (Sigma-Aldrich®) na proporção 1:1. As células foram observadas em lâmina de vidro recoberta por lamínula em um microscópio de fluorescência (Olympus BX41®). A morfologia das células foi observada e, pelo menos, dez campos representativos foram fotografados.

4.5 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DOS RESÍDUOS DE FOSFATIDILSERINA POR CITOMETRIA DE FLUXO.

Este método é fundamentado na capacidade de ligação da anexina-V aos resíduos de fosfatidilserina, os quais são externalizados durante o processo inicial de apoptose (ZHANG et al., 1997). Assim, a intensidade de fluorescência média do fluorocromo FITC, conjugado à anexina-V, é captada pelo citômetro de fluxo e transformada em dados computáveis.

Para a realização do protocolo experimental, as células K562 (1×10^6 células/poço) foram incubadas com ambos os compostos em suas respectivas CI_{50} de 24 h por 18 h, a 37°C, em atmosfera com 5% de CO_2 . Após a incubação, as células foram marcadas com Anexina-V-FITC (BD Biosciences®) e foram adquiridos 50.000 eventos, para cada amostra, em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems), o qual dispõe do *software* BD FACSDiva versão 8.0.1. Em seguida, a análise da intensidade de fluorescência média das células K562 tratadas foi realizada por meio do *software* Infinicyt 2.0 (Cytognos®) e comparadas ao grupo controle (células sem tratamento).

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS IMIDAZOPIRIDINAS SOBRE CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO.

Para a avaliação do efeito citotóxico e do potencial hemolítico dos compostos sobre células não neoplásicas, foram coletadas amostras de sangue periférico de indivíduos considerados saudáveis, conforme aprovação do Comitê de Ética de Pesquisa em Seres humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH nº2.838.107/2018). Foram considerados clinicamente saudáveis os indivíduos não

fumantes que não se encontravam em processo infeccioso, alérgico ou inflamatório e sem histórico de doenças crônicas.

4.6.1 Avaliação Do Potencial Hemolítico.

Para a realização do ensaio de hemólise, as amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos contendo EDTA (Greiner Bio-One®) e os eritrócitos separados dos demais constituintes sanguíneos por centrifugação. Na sequência, foi realizada a padronização das suspensões de eritrócitos em NaCl 0,9% (Lifar®), as quais foram posteriormente incubadas em termobloco (Eppendorf®) por uma hora em concentrações crescentes das imidazopiridinas (uma a cinco vezes a CI_{50} de 24 h em células K562), a 37° C e sob leve agitação.

Como controle positivo, a suspensão de eritrócitos foi diluída com água destilada. Já para o controle negativo foi utilizado NaCl 0,9% no preparo da suspensão. Os controles não foram incubados com os compostos investigados.

A taxa de hemólise foi calculada de acordo com a densidade óptica dos grupos tratados em relação aos controles, a qual é proporcional à quantidade de hemoglobina liberada no sobrenadante. Para isso, a seguinte equação foi utilizada:

$$\text{Taxa de hemólise (\%)} = ((DO_t - DO_{cp}) \div (DO_{cp} - DO_{cn})) \times 100$$

Onde: DO_t , densidade óptica da amostra teste; DO_{cn} , densidade óptica do controle negativo; DO_{cp} , densidade óptica do controle positivo.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para realizar a análise estatística dos dados foi utilizado o programa GraphPad Prism 9.0®, onde os resultados dos experimentos, realizados em triplicata ou duplicata, foram expressos como média \pm erro-padrão da média (EPM).

Para a avaliação da citotoxicidade, bem como para hemólise, o método estatístico de escolha foi a variância em uma via (ANOVA *one way*) seguida do pós-teste Bonferroni para citotoxicidade e pelo Tukey para hemólise. Já a análise estatística da expressão de resíduos de fosfatidilserina foi realizada por teste *t* não pareado. Para ambos o limite de confiança adotado foi de 95% ($p < 0,05$).

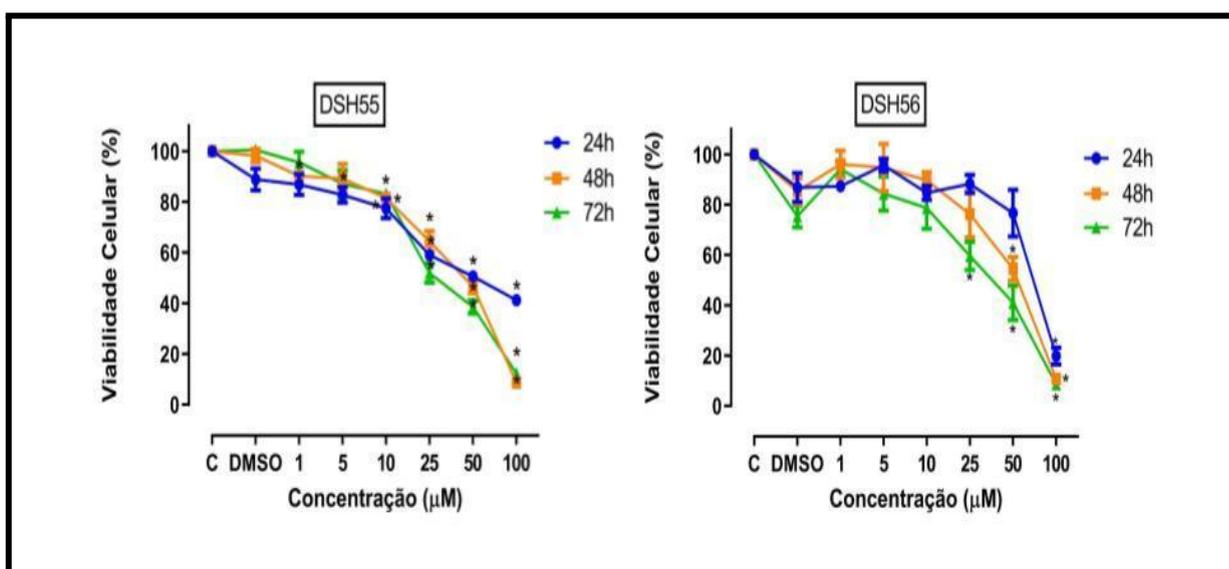
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EFEITO CITOTÓXICO DE IMIDAZOPIRIDINAS SOBRE CÉLULAS DE LMA.

Tendo em vista os severos efeitos adversos e altas taxas de recidivas observadas nos tratamentos disponíveis para LMAs, o presente estudo buscou avaliar o efeito citotóxico das imidazopiridinas DSH55 e DSH56 sobre células de LMA, K562, e investigar se causavam morte celular por apoptose. Sendo assim, inicialmente foi investigado o efeito citotóxico desses compostos sobre as células K562.

Conforme demonstrado na Figura 4, as imidazopiridinas reduziram a viabilidade das células K562 de forma dependente do tempo e da concentração. Como pode ser observado na Tabela 1, o composto DSH55 apresentou maior atividade citotóxica sobre as células de LMA do que o DSH56, com CI_{50} de 24 h de $46,37 \pm 1,70 \mu\text{M}$ e $76,68 \pm 3,64 \mu\text{M}$, respectivamente (Tabela 1).

Figura 4 - Curva de concentração e tempo-resposta das imidazopiridinas DSH55 e DSH56 sobre células de LMA.



Fonte: O autor.

Notas: * indica $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo.

A diferença no efeito dos compostos sobre as células K562 possivelmente seja explicada pela posição da metoxila aromática, pois é a única diferença

estrutural entre o DSH55 e o DSH56, como pode ser observado na Figura 1. Isômeros posicionais, como os avaliados neste estudo, muitas vezes apresentam características farmacocinéticas semelhantes, contudo, suas propriedades farmacodinâmicas podem diferir se a mudança interferir na forma com que o composto interage com o alvo molecular (UNVER et al., 2017). No entanto, estudos de docking molecular seriam necessários para confirmar essa possibilidade.

Tabela 1 - Citotoxicidade sobre células K562.

	DSH55 (CI ₅₀ µM)	DSH56 (CI ₅₀ µM)
24 horas	46.37 ± 1.70	76.68 ± 3.64
48 horas	35.53 ± 1.14	48.65 ± 2.10
72 horas	27.71 ± 1.05	29.79 ± 1.39

Fonte: O autor.

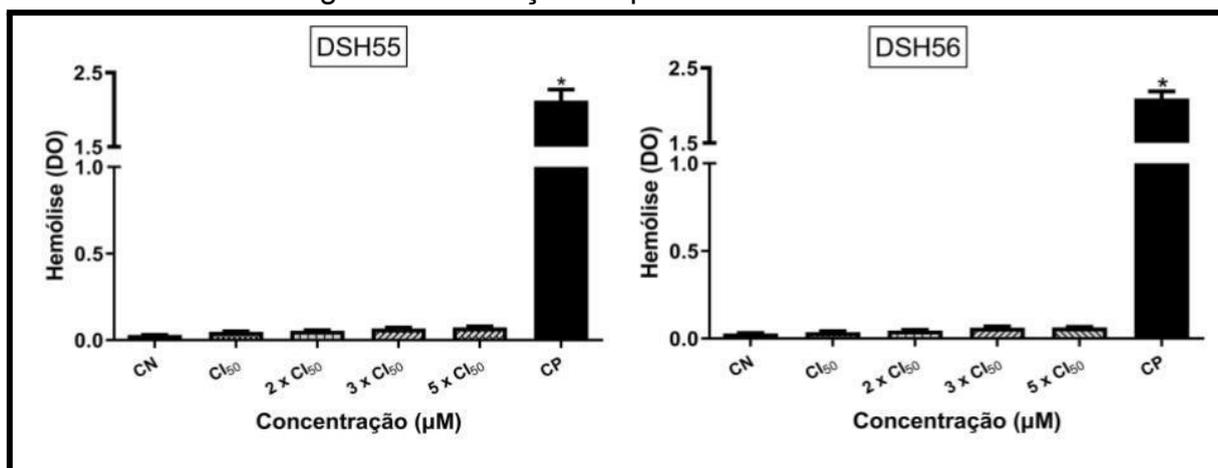
Os resultados obtidos são promissores, já que as imidazopiridinas avaliadas mostram significativo efeito citotóxico sobre as células K562, células de leucemia crônica agudizada, BCR/ABL positivas e, por isso, tendem a ser mais resistentes aos tratamentos disponíveis (LOSCOCCO et al., 2019). Esses achados são compatíveis com aqueles encontrados na literatura, já que outros representantes da classe já mostraram atividade sobre as células K562 (MARTÍNEZ-URBINA et al., 2010).

5.2 EFEITO DAS IMIDAZOPIRIDINAS DSH55 E DSH56 SOBRE ERITRÓCITOS SAUDÁVEIS

Para investigar se um novo composto potencialmente citotóxico poderá futuramente ser administrado de forma segura por via endovenosa, é importante avaliar a capacidade de hemólise *in vitro* como um resultado preliminar (BEDNARCZUK et al., 2010; ALENCAR et al., 2015; PEREIRA et al., 2016). Assim, o ensaio de hemólise foi conduzido a fim de avaliar a biocompatibilidade das imidazopiridinas DSH55 e o DSH56 sobre eritrócitos. Os resultados obtidos sugerem que ambos os compostos não causam hemólise significativa *in vitro* nas concentrações testadas, quando comparados a um controle negativo (Figura 5). Isso

indica que os compostos são biocompatíveis com eritrócitos saudáveis em concentrações até cinco vezes maiores que a CI_{50} de 24 h sobre células K562.

Figura 5 - Avaliação do potencial hemolítico.



Fonte: O autor.

Notas: * indica $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo.

Avaliar a biocompatibilidade entre protótipos e eritrócitos é fundamental, tendo em vista que a maior parte dos quimioterápicos utilizados atualmente no tratamento da LMA, são administrados por infusão parenteral (PELCOVITS et al., 2020). Essa forma continua sendo a forma mais eficaz de obter uma distribuição sistêmica do agente citotóxico de escolha, o que é desejável para atingir possíveis metástases, em paralelo ao tumor sólido, ou no caso das neoplasias hematológicas, para atingir a população de células neoplásicas em circulação (MU et al., 2018).

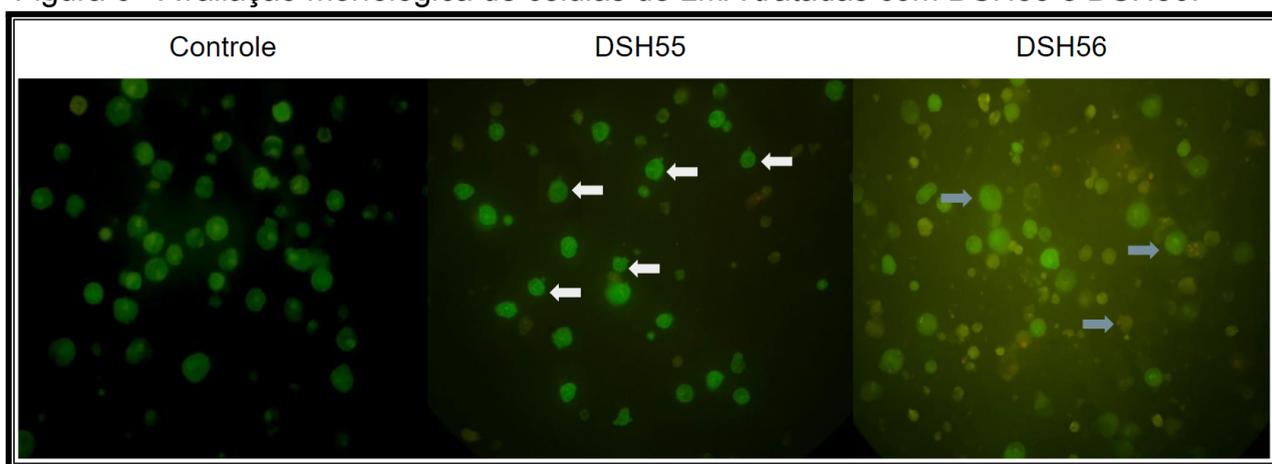
Não foram encontrados estudos na literatura que avaliam o potencial hemolítico de compostos da classe das imidazopiridinas. No entanto, em um estudo conduzido por Güçlü *et al.* (2018) duas imidazopiridinas demonstraram baixa atividade citotóxica sobre uma linhagem não neoplásica (WS1). Assim, os resultados obtidos no presente trabalho, acompanhados de ensaios adicionais sobre outros modelos de células não neoplásicas, podem viabilizar futuros testes em modelos animais.

5.3 EFEITO DAS IMIDAZOPIRIDINAS DSH55 E DSH56 NA INDUÇÃO DA APOPTOSE

Como citado anteriormente, para verificar se o mecanismo de morte celular induzido pelas imidazopiridinas sobre células K562 envolve a indução da apoptose, foram analisadas a morfologia celular e a exposição de resíduos de fosfatidilserina após incubação com cada um dos compostos.

Como pode ser observado na Figura 6, as células incubadas com DSH55 apresentaram características típicas de apoptose inicial e tardia, tais como diminuição do volume celular, condensação da cromatina, formação de *blebs* na membrana plasmática, formação de corpos apoptóticos e raras células com aumento na permeabilidade de membrana (células laranjas coradas pelo BE). Por outro lado, após incubação com o DSH56, a morfologia das células K562 apresentaram-se com características compatíveis com apoptose tardia, devido ao aumento na permeabilidade de membrana evidenciado pela coloração laranja, e poucas características compatíveis com apoptose inicial, como diminuição do volume celular, condensação da cromatina e raros *blebs* de membrana plasmática.

Figura 6 - Avaliação morfológica de células de LMA tratadas com DSH55 e DSH56.



Fonte: O autor.

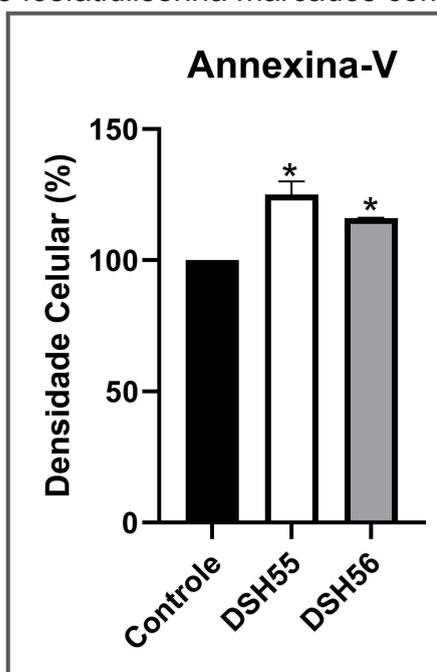
Notas: Setas brancas indicam células com características típicas de apoptose inicial, enquanto setas cinzas indicam células com características de apoptose tardia.

Resultados semelhantes aos observados após exposição ao DSH55 foram relatados para outros compostos pertencentes à classe das imidazopiridinas quando analisados na linhagem de células epiteliais HeLa (ROY et al., 2011).

Como um dos eventos iniciais da apoptose é a externalização dos resíduos de fosfatidilserina, a fim de sinalizar que a célula está em apoptose e para que seus corpos apoptóticos sejam fagocitados, sem que haja exposição de antígenos citoplasmáticos ao meio extracelular, os resultados anteriores, sugestivos de apoptose, foram avaliados por outra perspectiva, utilizando a metodologia da anexina-V conforme descrita anteriormente.

Como pode ser visualizado na Figura 7, ambos os compostos foram capazes de causar um aumento significativo (DSH55: 25% e DSH56: 16%) do número de células com expressão de resíduos de fosfatidilserina marcados com Anexina V, quando comparado ao controle não tratado.

Figura 7 - Efeito das imidazopiridinas DSH55 e DSH56 sobre a exposição de resíduos de fosfatidilserina marcados com Anexina V.



Fonte: O autor.

Notas: * indica $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo.

O aumento na expressão de resíduos de fosfatidilserina induzido por imidazopiridinas também foi relatado por outros estudos publicados na literatura, em esferóides de adenocarcinoma pancreático metastático (DAMGHANI et al., 2021) e cultura de células de câncer de pulmão (SAYEED et al., 2018).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir desse estudo permitem concluir que:

- As imidazopiridinas DSH55 e DSH56 apresentaram efeito citotóxico sobre células de linhagem de LMA, K562, de forma concentração e tempo dependentes. A DSH55 apresentou CI_{50} de 24 h de $46,37 \pm 1,70 \mu\text{M}$, CI_{50} de 48 h de $35,53 \pm 1,14 \mu\text{M}$ e de CI_{50} de 72 h de $27,71 \pm 1,05 \mu\text{M}$. A DSH56 apresentou CI_{50} de 24 h de $76,68 \pm 3,64 \mu\text{M}$, CI_{50} de 48 h de $48,65 \pm 2,10 \mu\text{M}$ e de CI_{50} de 72 h de $29,79 \pm 1,39 \mu\text{M}$. Assim, a DSH55 apresentou efeito citotóxico mais evidente;
- Ambas imidazopiridinas não causaram hemólise significativa em eritrócitos de indivíduos saudáveis em concentrações até cinco vezes maior que a IC_{50} de 24 h sobre células K562 durante 1 h de incubação;
- As imidazopiridinas DSH55 e DSH56 causam morte celular por apoptose em células K562, evidenciadas pela avaliação morfológica e pela indução da exposição de resíduos de fosfatidilserina;

Apesar das imidazopiridinas sintéticas DSH55 e DSH56 apresentaram efeito citotóxico expressivo e promissor com CI_{50} de 48 h e 72 h baixas, mais experimentos serão necessários para avaliar seu mecanismo de ação e seletividade.

REFERÊNCIAS

BACCON-SOLLIER, Paul Le *et al.* Imidazopyridine-fused [1,3]diazepinones: modulations of positions 2 to 4 and their impacts on the anti-melanoma activity. **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 935-949, 1 jan. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14756366.2020.1748024>.

BAO, Rudi *et al.* CUDC-305, a Novel Synthetic HSP90 Inhibitor with Unique Pharmacologic Properties for Cancer Therapy. **Clinical Cancer Research**, [S.L.], v. 15, n. 12, p. 4046-4057, 15 jun. 2009. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-09-0152>.

COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS. PORTARIA N° 705: **Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas da Leucemia Mieloide Aguda do Adulto**. Brasília: Secretaria de Atenção à Saúde, 2014.

DAMGHANI, Tahereh *et al.* Imidazopyridine hydrazone derivatives exert antiproliferative effect on lung and pancreatic cancer cells and potentially inhibit receptor tyrosine kinases including c-Met. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-11, 11 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-83069-4>.

D'ARCY, Mark s. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, [S.L.], v. 43, n. 6, p. 582-592, 25 abr. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbin.11137>.

ESTEY, Elihu H. *et al.* Acute myeloid leukemia: 2019 update on risk-stratification and management. **American Journal Of Hematology**, [S.L.], v. 93, n. 10, p. 1267-1291, out. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.25214>.

GARNAR-WORTZEL, Leopold *et al.* Chemical Inhibition of ENL/AF9 YEATS Domains in Acute Leukemia. **Acs Central Science**, [S.L.], v. 7, n. 5, p. 815-830, 30 abr. 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acscentsci.0c01550>.

GALLUZZI, Lorenzo *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. **Cell Death & Differentiation**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 486-541, 23 jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>

GLOBOCAN. Estimated number of incident cases all cancers, both sexes, all ages. Disponível em: encurtador.com.br/uSTUX . Acesso em: 07 fev. 2022.

GLOBOCAN. Global Cancer Observatory. **International Agency for Reserch on Cancer** . 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 14 fev. 2022.

GÜÇLÜ, Dilek *et al.* Synthesis of novel imidazopyridines and their biological evaluation as potent anticancer agents: a promising candidate for glioblastoma. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 28, n. 15, p. 2647-2651, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.06.033>.

HANAHAN, Douglas *et al.* Hallmarks of Cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 31-46, 1 jan. 2022. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-1059>.

HOCHHAUS, A. *et al.* European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 966-984, 3 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-020-0776-2>.

IARC (org.). Estimated number of deaths from 2020 to 2040, Males & Females, age [0-85+]. Disponível em: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/trends?types=1&sexes=1_2&mode=population&group_populations=0&multiple_populations=1&multiple_cancers=1&cancers=39&populations=900&group_cancers=1. Acesso em: 07 fev. 2022

INCA. Atlas de Mortalidade por Câncer. 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/aplicativos/atlas-de-mortalidade-por-cancer>. Acesso em: 13 fev. 2022.

INCA. BRASIL - ESTIMATIVA DOS CASOS NOVOS. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>. Acesso em: 07 fev. 2022

KANTARJIAN, Hagop M. *et al.* Acute myeloid leukemia: treatment and research outlook for 2021 and the md anderson approach. **Cancer**, [S.L.], v. 127, n. 8, p. 1186-1207, 18 mar. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.33477>.

KHATUN, Samima *et al.* Imidazopyridine, a promising scaffold with potential medicinal applications and structural activity relationship (SAR): recent advances. **Journal Of Biomolecular Structure And Dynamics**, [S.L.], p. 1-24, 15 nov. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2021.1997818>.

KHOURY, Joseph D. *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. **Leukemia**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1-1, 22 jun. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>.

LOSCOCCO, Federica *et al.* BCR-ABL Independent Mechanisms of Resistance in Chronic Myeloid Leukemia. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 9, n. 00, p. 1-1, 24 set. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2019.00939>.

MARTÍNEZ-URBINA, Miguel Angel *et al.* 6-Substituted 2-(N-trifluoroacetyl-amino)imidazopyridines induce cell cycle arrest and apoptosis in SK-LU-1 human cancer cell line. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 45, n. 3, p. 1211-1219, mar. 2010. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.11.049>.

MILLER, Kimberly D. *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [S.L.], v. 69, n. 5, p. 363-385, 11 jun. 2019. Wiley.

<http://dx.doi.org/10.3322/caac.21565>.

MOSMANN, Tim *et al.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Of Immunological Methods**, [S.L.], v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dez. 1983. Elsevier BV.

[http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

MU, Chao-Feng *et al.* Targeted drug delivery for tumor therapy inside the bone marrow. **Biomaterials**, [S.L.], v. 155, p. 191-202, fev. 2018. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.029>.

PATEL, Sagarkumar *et al.* Novel imidazopyrimidines-based molecules induce tetramerization of tumor pyruvate kinase M2 and exhibit potent antiproliferative profile. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 170, p. 106112, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106112>.

PAVLOVA, Natalya N. *et al.* The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. **Cell Metabolism**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 27-47, jan. 2016. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>

PENZO, Maria *et al.* High-throughput screening of the Plasmodium falciparum cGMP-dependent protein kinase identified a thiazole scaffold which kills erythrocytic and sexual stage parasites. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-9, 7 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC.

<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-42801-x>.

PELCOVITS, Ari *et al.* Acute Myeloid Leukemia: A Review. **Rhode Island Medical Journal**, [S.L.], v. 103, n. 3, p. 38-40, abr. 2020.

RENVOIZÉ, C. *et al.* Apoptosis: identification of dying cells. **Cell Biology And Toxicology**, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 111-120, 1998. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1007429904664>.

ROY, Mithun *et al.* Impact of metal binding on the antitumor activity and cellular imaging of a metal chelator cationic imidazopyridine derivative. **Dalton Transactions**, [S.L.], v. 40, n. 18, p. 4855-4864, 2011. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c0dt01717e>.

SALLES, Helena de *et al.* Imidazo[1,2-a]pyridine A3-Coupling Catalyzed by a Cu/SiO₂ Material. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], v. 30, n. 9, p. 1825-1833, 2019. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).
<http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190089>.

SAYEED, Ibrahim Bin *et al.* Imidazopyridine linked triazoles as tubulin inhibitors, effectively triggering apoptosis in lung cancer cell line. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 80, p. 714-720, out. 2018. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.07.026>.

SCHIRRMACHER, Volker. From chemotherapy to biological therapy:: a review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (review). **International Journal Of Oncology**, [S.I.], v. 54, n. 2, p. 407-419, fev. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30570109/>. Acesso em: 16 jun. 2022.

SHARMA, Pankaj *et al.* Imidazoles as Potential Anticancer Agents: an update on recent studies. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 14, p. 4213, 11 jul. 2021. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules26144213>.

SWERDLOW, Steven H *et al.* WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, 2017. IARC.

TENNANT, Judith R. *et al.* EVALUATION OF THE TRYPAN BLUE TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF CELL VIABILITY. **Transplantation**, [S.L.], v. 2, n. 6, p. 685-694, nov. 1964. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).
<http://dx.doi.org/10.1097/00007890-196411000-00001>.

TELFORD, William G. *et al.* Multiparametric Analysis of Apoptosis by Flow Cytometry. **Flow Cytometry Protocols**, [S.L.], p. 167-202, 26 out. 2017. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-7346-0_10.

TETALI, Samanvai Reddy *et al.* Current advances in the clinical development of anti-tubercular agents. **Tuberculosis**, [S.L.], v. 125, p. 101989, dez. 2020. Elsevier BV.

THE CANCER ATLAS. The Economic Burden of Cancer. Disponível em: <https://canceratlas.cancer.org/taking-action/economic-burden/>. Acesso em: 07 fev. 2022.

UNVER, Hakan *et al.* Synthesis and Characterization of Two New Thiophene Acetyl Salicylic Acid Esters and their ortho- and para-effect on Anticancer Activity. **Anti-Cancer Agents In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 17, n. 10, p. 1383-1388, 2 out. 2017. Bentham Science Publishers Ltd..
<http://dx.doi.org/10.2174/1871520617666170213113843>.

ZHANG, Guohong *et al.* Early Detection of Apoptosis Using a Fluorescent Conjugate of Annexin V. **Biotechniques**, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 525-531, set. 1997. Future Science Ltd. <http://dx.doi.org/10.2144/97233pf01>.