



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Amanda Abdalla Biasi Ribeiro

**Ensaio de Citotoxicidade para Investigação dos Principais Mecanismos de Morte Celular causados por Compostos Naturais e Sintéticos no Modelo de Leucemias Agudas.**

Florianópolis

2022

Amanda Abdalla Biasi Ribeiro

**Ensaio de Citotoxicidade para Investigação dos Principais Mecanismos de Morte Celular causados por Compostos Naturais e Sintéticos no Modelo de Leucemias Agudas.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Farmácia  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Maria Cláudia Santos da Silva

Florianópolis

2022

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

Biasi Ribeiro, Amanda

Ensaio de Citotoxicidade para Investigação dos Principais Mecanismos de Morte Celular causados por Compostos Naturais e Sintéticos no Modelo de Leucemias Agudas / Amanda Biasi Ribeiro ; orientador, Professora Dr<sup>a</sup> Maria Cláudia Santos da Silva, 2022.

88 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, , Programa de Pós-Graduação em , Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. . 2. Leucemia mieloide aguda. 3. Citotoxicidade. 4. Imidazopiridinas. 5. Apoptose. I. Santos da Silva, Professora Dr<sup>a</sup> Maria Cláudia . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em . III. Título.

Amanda Abdalla Biasi Ribeiro

Ensaio de Citotoxicidade para Investigação dos Principais Mecanismos de Morte Celular causados por Compostos Naturais e Sintéticos no Modelo de Leucemias Agudas.

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

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Izabella Thaís da Silva  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr<sup>a</sup>. Iris Mattos Santos Pirath  
Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago/ UFSC

Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco  
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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Thaís Cristine Marques Sincero  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Maria Cláudia Santos da Silva  
Orientadora

Florianópolis, 2022.

## AGRADECIMENTOS

Acredito que existem poucas verdades absolutas no mundo. Uma delas é que ninguém é autossuficiente. A outra é que também não somos onipotentes. Entendi essas duas verdades durante a execução do meu trabalho de mestrado. E posso afirmar que muito mais do que saber sobre leucemias, linfomas, apoptose, marcadores celulares etc. O que mais esse trabalho me ensinou é que o que importa de verdade, são os laços sinceros de amizade e amor que você faz na vida. Esses te ajudam a ser autossuficiente e onipotente quando necessário.

Agradeço, portanto, à Deus por encaminhar minha vida e meus laços de parceria. Pela família, pelos amigos, pela saúde, pela comida, pelo lar, pelo conforto. Por me abençoar diariamente ao me dar o poder de mais um dia saudável de vida.

A minha orientadora, prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Cláudia, pela dedicação intensa ao LOEH. Desde buscar verbas para as pesquisas, parcerias entre laboratórios que enriqueçam os trabalhos do grupo como também a maneira firme e gentil com que lapida seus alunos. Por seis anos pude acompanhá-la se dedicando a chefia das análises clínicas do HU, aos alunos de farmácia, a citometria de fluxo, ao LOEH, aos filhos, ao marido e agora a netinha. Todos os papéis exercidos com amor e seriedade.

Aos meus colegas, e amigos, do LOEH, Lis, Lau, Ana Gabriela, Iris, Chandra, João Victor, Nati, Helô, Bruna, Dani, Sandro por transformarem o ambiente de trabalho mais leve e alegre, pelas experiências de vida compartilhadas e pela parceria sempre atendida quando solicitada.

A minha amiga Lisandra, que de colega do LOEH se tornou uma das amigas mais especiais que tenho. Agradeço pelo carinho que tens comigo e com a minha família, e pela bondade genuína que habita esse coração enorme que tens. Você sorri para vida e a vida, pode ter certeza, sorri pra ti também. Amo você!

A minha amiga Laura, outra amiga que o LOEH me deu, pelo incentivo, habilidades docentes e comentários engraçados que animam todo o processo de realização de todos os trabalhos que já colocaste a mão. Tua forma de encarar desafios, e vencê-los, é uma fonte de inspiração e orgulho para aqueles que te cercam.

Aos meus pais, Aloir e Juliana, aos meus irmãos João Luiz e Julia e aos meus avós Nedy e Arialdo (in memoriam), Ageni e Nicolau pelo amor, que sempre me emociona quando penso sobre a intensidade que ele é, pela dedicação, pela preocupação com o meu bem-estar. Eu sei que Deus me ama por ter me dado vocês como família. Eu amo vocês, intensamente.

Ao meu marido, José Luiz, pela força propulsora com que me motiva, por ser, sempre, o meu ponto de equilíbrio quando nem eu me entendo, por compartilhar comigo a vida, com suas alegrias, dificuldades, tristezas e peripécias. Pelo pai dedicado, amigo, carinhoso e preocupado que és. Sabes que se antes eu te admirava, hoje te admiro mil vezes mais. Te amo muito!

Aos meus filhos, João Pedro e meu menininho que ainda está dentro da barriga. A vocês meus filhos, não existe no mundo palavras que possam expressar o tamanho do meu amor. São vocês os meus condutores para aquilo que há de melhor na vida. Por eu poder desfrutar do melhor amor do mundo, por ter forças de me tornar cada dia melhor, por ter coragem de enfrentar meus medos e defeitos. Amo vocês!

A gentileza dos professores Dr Ricardo Ferreira Affeldt, Dra Lílian Sibelli Campos Bernardes, Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg, Dr Eloir Paulo Schenkel, a Dra Ana Cláudia Philippus e a MSc Fernanda Nienkötter Sardá pela cessão dos compostos testados nesse trabalho.

Ao PGFAR, CAPES, CNPQ, por acreditarem na ciência e no conhecimento, por manterem a pesquisa mesmo em tempos pandêmicos e por permitirem a realização do meu trabalho de mestrado.

*“Cuide de quem corre do seu lado e de quem te quer bem, essa é a coisa mais pura”*

*(Charlie Brown Jr., 2007)*



## RESUMO

As leucemias mieloides agudas (LMA) são neoplasias hematológicas complexas e heterogêneas e seu tratamento ainda apresenta dificuldades na cura completa dos pacientes. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito citotóxico de quatro compostos naturais e 34 compostos sintéticos em linhagem de LMA, K562. Entre os compostos avaliados, a imidazopiridina DSH64 foi o que demonstrou maior citotoxicidade para essas células, avaliado pelo método do Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). Esse composto apresentou efeito citotóxico concentração e tempo dependentes para as células K562, cujas  $CI_{50}$  foram de  $51,88 \pm 2,85 \mu\text{M}$ , de  $19,68 \pm 0,81 \mu\text{M}$  e  $7,88 \pm 0,28 \mu\text{M}$ , nos tempos de 24h, 48h e 72h, respectivamente. Já em células de fibroblasto humano, HS-5, o DSH64 apresentou  $CI_{50}$  de 24h de  $98,33 \pm 3,95 \mu\text{M}$ . A capacidade hemolítica do DSH64 foi avaliada em concentrações 10 x superiores à sua  $CI_{50}$  de 24h e não foi observada hemólise significativa. As alterações morfológicas visualizadas pela microscopia de fluorescência observadas com BE/LA após tratamento com  $CI_{50}$  de 24h do composto sugerem morte por apoptose. No entanto, não foram detectados exposição dos resíduos de fosfatidilserina por citometria de fluxo no tempo de 24h de incubação com o composto. Embora o DSH64 não tenha reduzido significativamente o  $\Delta\psi_m$ , houve aumento da expressão da proteína pró apoptótica Bax, da caspase -3, do FasR e aumento da relação Bax/Bcl-2, analisadas por citometria de fluxo, o que sugere o envolvimento da apoptose extrínseca. Os resultados também mostraram uma redução de survivina e aumento de EROs. Em conjunto, esses resultados sugerem que imidazopiridina DSH64 é um composto promissor para o desenvolvimento de um novo fármaco a ser utilizado no tratamento da LMA.

**Palavras-chave:** Leucemia mieloide aguda, citotoxicidade, apoptose, imizadopiridina



## ABSTRACT

Acute myeloid leukemias (AML) are complex and heterogeneous hematological neoplasms and their treatment still presents difficulties in the complete cure of patients. Thus, the aim of this study was to investigate the cytotoxic effect of four natural compounds and 34 synthetic compounds on the AML strain, K562. Among the compounds evaluated, imidazopyridine DSH64 was the one that showed the highest cytotoxicity for these cells, evaluated by the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) method. . This compound showed concentration and time dependent cytotoxic effect for K562 cells, whose IC50 were  $51.88 \pm 2.85 \mu\text{M}$ ,  $19.68 \pm 0.81 \mu\text{M}$  and  $7.88 \pm 0.28 \mu\text{M}$ , in 24h, 48h and 72h, respectively. In human fibroblast cells, HS-5, DSH64 showed a 24h IC50 of  $98.33 \pm 3.95 \mu\text{M}$ . The hemolytic capacity of DSH64 was evaluated at concentrations 10x higher than its 24h IC50 and no significant hemolysis was observed. The morphological changes visualized by fluorescence microscopy observed with BE/LA after treatment with 24h ED IC50 of the compound suggest death by apoptosis. However, exposure of phosphatidylserine residues by flow cytometry was not detected within 24 h of incubation with the compound. Although DSH64 did not significantly reduce  $\Delta\psi\text{m}$ , there was an increase in the expression of the pro-apoptotic protein Bax, caspase -3, FasR and an increase in the Bax/Bcl-2 ratio, analyzed by flow cytometry, which suggests the involvement of apoptosis extrinsic. The results also showed a reduction in survivin and an increase in ROS. Taken together, these results suggest that imidazopyridine DSH64 is a promising compound for the development of a new drug to be used in the treatment of AML.

**Keywords:** Acute myeloid leukemia; Cytotoxicity; Apoptosis; Imidazopyridine.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Apresentações clínicas de pacientes de LMA.....	20
Figura 2. A rede complexa das citocinas e sistema imunológico no microambiente da LMA. ....	25
Figura 3. “Regime 7+3” .....	26
Figura 4. Evolução do tratamento da LMA.....	29
Figura 5. Estrutura química das imidazopiridinas.....	30
Figura 6. O ciclo celular .....	32
Figura 7. Apoptose intrínseca.....	34
Figura 8. Apoptose extrínseca .....	35
Figura 9. Esquema da Triagem de citotoxicidade dos compostos naturais e sintéticos sobre células K562 .....	39
Figura 10. Fluxograma dos compostos naturais triados em células K562. ....	49
Figura 11. Avaliação da citotoxicidade de compostos naturais derivados indólicos e derivados da fucoxantina sobre células de LMA (K562).....	50
Figura 12. Fluxograma dos compostos triados em células K562.....	51
Figura 13. Avaliação da citotoxicidade de sulfonas sintéticas sobre células de linhagem de LMA (K562).....	51
Figura 14. Avaliação da citotoxicidade de compostos sintéticos derivados do éster cinâmico e sulfonamidas sobre células de linhagem de LMA (K562).....	52
Figura 15. Avaliação da citotoxicidade de imidazopiridinas sintéticas sobre células de linhagem de LMA (K562).....	52
Figura 16. Avaliação do efeito citotóxico dos compostos derivados do Coral Sol, SPH7 e CSCRT2 sobre células K562 .....	54
Figura 17. Avaliação do efeito citotóxico de duas sulfonas LM20 e LM27 sobre células K562. ....	55
Figura 18. Avaliação do efeito citotóxico dos derivados do éster do ácido cinâmico sobre células K562. ....	56
Figura 19. Avaliação do efeito citotóxico de imidazopiridinas sintéticas sobre células K562. ....	57
Figura 20. Avaliação do efeito citotóxico em três tempos diferentes dos compostos LM20, LM27 e DSH64. ....	58
Figura 21 - Predição <i>in silico</i> da biodisponibilidade oral do composto DSH64. ....	60

Figura 22. Predição <i>in silico</i> dos possíveis alvos moleculares da imidazopiridina DSH64.....	62
Figura 23. Avaliação do efeito citotóxico da imidazopiridina DSH64 sobre células HS-5.....	62
Figura 24. Efeito do composto DSH64 em eritrócitos de SP.....	63
Figura 25. Efeito da imidazopiridina DSH64 na evolução do ciclo celular em células K562.....	64
Figura 26. Alterações morfológicas induzidas pela imidazopiridina DSH64 em células K562.....	65
Figura 27. Efeito da Imidazopiridina DSH64 sobre a exposição dos resíduos de fosfatidilserina nas células K562.....	66
Figura 28. Efeito da imidazopiridina DSH64 no $\Delta\Psi_m$ de células K562 .....	67
Figura 29. Efeito da imidazopiridina DSH64 na proteína próapoptótica BAX nas células K562.....	68
Figura 30. Efeito da imidazopiridina DSH64 sobre a proteína antiapoptótica Bcl-2 nas células K562.....	68
Figura 31. Efeito do composto DSH64 sobre a proteína AIF em células K562 .....	69
Figura 32. Efeito da imidazopiridina DSH64 na expressão do receptor Fas nas células K562.....	70
Figura 33. Efeito da imidazopiridina DSH64 sobre a caspase-3 ativada em células K562.....	71
Figura 34. Efeito da imidazopiridina DSH64 sobre a expressão da proteína survivina.....	72
Figura 35. Efeito da imidazopiridina DSH64 sobre a proteína KI-67.....	72
Figura 36. Efeito da imidazopiridina DSH64 na produção de EROs em células K562.....	73

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Predição *in silico* das características físico-químicas do composto DSH64.....60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - $CI_{50}$ dos compostos naturais SPH7 e CSCRT2 .....	54
Tabela 2 - $CI_{50}$ dos compostos sintéticos sulfonas LM20 e LM27. ....	55
Tabela 3 - $CI_{50}$ dos compostos sintéticos 4-OMe e 2Me.....	56
Tabela 4 - $CI_{50}$ das imidazopiridinas sintéticas .....	57
Tabela 5 - $CI_{50}$ da sulfona sintética LM20 nos tempos de 24,48 e 72h.....	59
Tabela 6 - $CI_{50}$ da sulfona sintética LM27 nos tempos de 24,48 e 72h. células K562.....	59
Tabela 7 - $CI_{50}$ do composto DSH64 nos tempos de 24,48 e 72h. células K562.....	59
Tabela 8 - Taxa de hemólise (%) causada pelo composto DSH64 em diferentes concentrações .....	63
Tabela 9 - Efeito da imidazopiridina DSH64 na evolução do ciclo celular em células K562. ....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ADME</b>	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
<b>AIF</b>	Fator indutor de apoptose
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>APAF-1</b>	Fator indutor de apoptose 1
<b>BE</b>	Brometo de etídio
<b>BH</b>	Domínios de homologia com Bcl-2
<b>BSA</b>	Albumina do soro bovino
<b>CDKs</b>	Quinases dependentes de ciclinas
<b>CEBPA</b>	Do inglês, <i>CCAAT enhancer-binding protein alpha</i>
<b>CF</b>	Citometria de fluxo
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória de 50%
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CYP</b>	Citocromo P450
<b>DAUDI</b>	Células de linfoma de Burkitt com mutações no códon 213
<b>DISC</b>	Complexo sinalizador indutor de apoptose
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FasR</b>	Receptor Fas
<b>FDA</b>	Do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FLT3</b>	Do inglês, <i>fms-like tyrosine kinase 3</i>
<b>FSC</b>	Do inglês, <i>forward scatter</i>
<b>HSCs</b>	Células-tronco hematopoiéticas
<b>IAP</b>	Proteínas inibidoras da apoptose
<b>IDH1</b>	Isocitrato desidrogenase 1
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>K562</b>	Células de Leucemia Mieloide Crônica em crise blástica
<b>LA</b>	Laranja de acridina
<b>LMA</b>	Leucemia mieloide aguda
<b>LLC</b>	Leucemia linfóide crônica
<b>LOEH</b>	Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias
<b>LPA</b>	Leucemia Promielocítica Aguda
<b>LSC</b>	Do inglês, <i>Leukemia stem cell</i>
<b>MAPK</b>	Proteína quinase ativada por mitógeno
<b>MO</b>	Medula óssea
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
<b>NPM1</b>	Nucleofosfomina
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PAINS</b>	Do inglês, <i>pan assay interference compounds</i>
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PercP</b>	Complexo proteína peridina-clorofila
<b>P-gp</b>	Glicoproteína-P

<b>PI</b>	Iodeto de propídeo
<b>RNase</b>	Ribonuclease
<b>RNM</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>RPMI</b>	Do inglês, Roswell Park Memorial Institute
<b>SBF</b>	Soro fetal bovino
<b>SDS</b>	Docetil sulfato de sódio
<b>SP</b>	Sangue periférico
<b>SSC</b>	Do inglês, Side scatter
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TCR</b>	Receptor de célula T (do inglês, T cell receptor)
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>UFSC</b>	Universidade Federal de Santa Catarina
<b><math>\Delta\Psi_m</math></b>	Potencial de membrana mitocondrial

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
3.1	LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA) .....	19
<b>3.1.1</b>	<b>A PATOGÊNESE DA LMA .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.2</b>	<b>TRATAMENTO DA LMA .....</b>	<b>25</b>
3.2	IMIDAZOPIRIDINAS .....	30
3.3	CICLO CELULAR.....	31
3.4	APOPTOSE .....	33
<b>3.4.1</b>	<b>Apoptose intrínseca .....</b>	<b>33</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Apoptose extrínseca .....</b>	<b>35</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Morte celular independente de caspase .....</b>	<b>36</b>
3.5	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS).....	36
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
4.1	SÍNTESE DOS COMPOSTOS .....	38
4.2	COMPOSTOS NATURAIS .....	38
4.3	COMPOSTOS SINTÉTICOS .....	38
4.4	TRIAGEM E DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CONCENTRAÇÃO E TEMPO RESPOSTA.....	39
4.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO ESCOLHIDO SOBRE CÉLULAS DE FIBROBLASTO HUMANO (HS-5) .....	40
4.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO DSH64 SOBRE CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO (SP).....	41
<b>4.6.1</b>	<b>Teste de hemólise .....</b>	<b>41</b>



4.7	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO DSH64 SOBRE O CICLO CELULAR DE CÉLULAS K562 .....	42
4.8	AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA APOPTOSE CAUSADA PELO COMPOSTO DSH64	43
<b>4.8.1</b>	<b>Avaliação por microscopia de fluorescência das alterações morfológicas em células coradas com BE e LA.....</b>	<b>43</b>
<b>4.8.2</b>	<b>Avaliação da exposição dos resíduos de fosfatidilserina pelo método da Anexina-V por CF .....</b>	<b>44</b>
4.9	DETERMINAÇÃO DO COMPROMETIMENTO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi_M$ ) .....	44
4.10	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE (KI-67, BCL-2, BAX, AIF, FASR, CASPASE - 3 ATIVADA E SURVIVINA). .....	45
4.11	PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i> DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS.....	46
4.12	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EROS .....	47
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
5.1	AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DE COMPOSTOS NATURAIS E SINTÉTICOS SOBRE LINHAGEM DE CÉLULAS DE LMA (K562).....	49
<b>5.1.1</b>	<b>Triagem de citotoxicidade de compostos de origem natural em células K562</b>	<b>49</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Triagem de citotoxicidade de compostos sintéticos em células K562 .....</b>	<b>50</b>
5.2	DETERMINAÇÃO DA $CI_{50}$ DOS COMPOSTOS NATURAIS DERIVADOS DO CORAL SOL .....	53
5.3	DETERMINAÇÃO DA $CI_{50}$ DOS COMPOSTOS SINTÉTICOS SELECIONADOS.....	54
5.4	AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DOS COMPOSTOS DSH64, LM20 E LM27 SOBRE CÉLULAS K562 EM TEMPOS DE 24h, 48h e 72h .....	57

5.5	PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i> DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DA IMIDAZOPIRIDINA DSH64 .....	59
5.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DA IMIDAZOPIRIDINA DSH64 EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE FIBROBLASTOS HUMANOS (HS-5) .....	62
5.7	AVALIAÇÃO DO EFEITO HEMOLITICO INDUZIDO PELA IMIDAZOPIRIDINA DSH64 EM ERITROCITOS HUMANOS .....	63
5.8	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA IMIDAZOPIRIDINA DSH64 NO CICLO CELULAR DE CÉLULAS K562 .....	64
5.9	ANÁLISE DOS EFEITOS DO COMPOSTO DSH64 SOBRE A APOPTOSE...	65
<b>5.9.1</b>	<b>Análise das alterações morfológicas por microscopia de fluorescência com BE e LA</b>	<b>65</b>
<b>5.9.2</b>	<b>Efeito da Imidazopiridina DSH64 sobre a exposição dos resíduos de fosfatidilserina nas células K562 .....</b>	<b>66</b>
5.10	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA IMIDAZOPIRIDINA DSH64 NO POTENCIAL DE MEMBRANA ( $\Delta\Psi$ M).....	66
5.11	AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADOS AO MECANISMO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE.....	67
<b>5.11.1</b>	<b>Investigação do efeito da imidazopiridina DSH64 sobre proteínas da BCL-2 (BCL-2 e BAX).....</b>	<b>67</b>
<b>5.11.2</b>	<b>Investigação do efeito do composto DSH64 sobre o fator indutor de apoptose (AIF)</b>	<b>69</b>
<b>5.11.3</b>	<b>Investigação do efeito da imidazopiridina DSH64 sobre o receptor Fas.....</b>	<b>69</b>
<b>5.11.4</b>	<b>Avaliação do efeito da imidazopiridina DSH64 sobre a caspase-3 ativada....</b>	<b>70</b>
<b>5.11.5</b>	<b>Investigação do efeito da imidazopiridina DSH64 sobre a proteína antiapoptótica survivina .....</b>	<b>71</b>
5.12	EFEITO DA IMIDAZOPIRIDINA DSH64 SOBRE A PROTEÍNA KI-67.....	72
5.13	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA IMIDAZOPIRIDINA DSH64 NA PRODUÇÃO DE EROS EM CÉLULAS K562.....	73
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>83</b>

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>92</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O câncer compreende um conjunto de doenças complexas e heterogêneas que se originam em tecidos ou órgãos e que apresentam como principais características a exacerbação da proliferação celular e a capacidade de acometer outros órgãos/tecidos adjacentes (NCI, 2021; WHO, 2022). Sabe-se que o câncer é um dos principais problemas de saúde pública mundial, está entre a quarta maior causa de mortes precoces, em pessoas com menos de 70 anos, na maioria dos países. Apenas no ano de 2020, 19,3 milhões de pessoas foram diagnosticadas com câncer, das quais 9,6 milhões de pessoas vieram a óbito em decorrência dessa doença (BENDER et al., 2021; YIN et al., 2021). No Brasil, para o triênio 2020-2022, o INCA prevê 625 mil novos casos de câncer no país (INCA, 2020).

Entre os cânceres mais prevalentes no Brasil, para o triênio 2020-2022, tanto para homens quanto para mulheres encontram-se as leucemias (INCA, 2020). As leucemias são neoplasias do sistema hematopoiético e são caracterizadas pela proliferação anormal de células hematopoiéticas neoplásicas que podem acumular-se na medula óssea (MO) e/ou no sangue periférico (SP). As leucemias podem ser divididas em mieloides, quando há comprometimento da linhagem mieloide e em linfoides quando o comprometimento ocorre na linhagem linfoide. Além dessa subdivisão, as leucemias também são divididas em agudas ou crônicas de acordo com o estágio de maturação das células acometidas (SWERDLOW et al, 2017).

Ainda que a fisiopatologia das leucemias mieloides agudas (LMA) esteja cada vez mais bem elucidada e que existem inúmeros tratamentos disponíveis, o prognóstico do paciente diagnosticado com LMA ainda continua desfavorável, com sobrevida global de 5 anos de apenas 13,5%, principalmente em razão da recidiva/refratariedade da doença. Em pacientes jovens essa adversidade pode ocorrer em 10 a 40% dos pacientes, o que aumenta para 40 a 60% em pacientes com idade acima de 60 anos (GUO et al., 2020; THOL; GANSER, 2020). Além disso, entre o período dos anos de 2009 a 2019 as LMAs foram as neoplasias medulares mais prevalentes no Brasil (SALVARO et al., 2021).

Portanto, diante das adversidades sociais, econômicas e psicológicas encontradas no do tratamento das LMAs julga-se de suma importância a busca de novos compostos que atuem como possíveis antineoplásicos no tratamento dessa doença. Nesse sentido, para este estudo propomos investigar o efeito citotóxico de quatro compostos de origem natural (dois compostos derivados do Coral-Sol e dois compostos derivados da Fucoxantina) e 34 compostos de origem sintética (cinco imidazopiridinas, três derivados do éster do ácido cinâmico, 13 Sulfonas e 14

Sulfonamidas) sobre células de LMA (K562), bem como investigar seus principais mecanismos de morte celular.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito citotóxico de quatro compostos de origem natural (dois compostos derivados do Coral-Sol e dois compostos derivados da Fucoxantina) e 34 compostos de origem sintética (quatro imidazopiridinas, três derivados do éster do ácido cinâmico, 13 Sulfonas e 14 Sulfonamidas) sobre células de LMA (K562), bem como investigar seus principais mecanismos de morte celular.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito citotóxico de quatro compostos de origem natural (dois compostos derivados do Coral-Sol e dois compostos derivados da Fucoxantina) e 34 compostos de origem sintética (quatro imidazopiridinas, três derivados do éster do ácido cinâmico, 13 Sulfonas e 14 Sulfonamidas) sobre células de LMA (K562) e selecionar os compostos que apresentaram maior redução da viabilidade celular;
- Determinar as respostas dos compostos selecionados em relação a concentração e ao tempo de incubação assim como calcular as suas concentrações inibitórias de 50% (CI<sub>50</sub>) em células K562;
- Realizar a predição *in silico* das características físico-químicas e biológicas dos compostos que apresentaram maior redução na viabilidade celular;
- Investigar a citotoxicidade do composto selecionado sobre linhagem celular de fibroblasto (HS-5) bem como calcular sua CI<sub>50</sub>;
- Investigar o efeito do composto selecionado sobre eritrócitos de sangue periférico (SP) de indivíduos clinicamente saudáveis.
- Verificar se o composto selecionado causa morte celular por apoptose em células K562;
- Investigar o efeito do composto selecionado sobre o ciclo celular e sobre a expressão do marcador de proliferação KI-67 em células K562;
- Avaliar se o composto selecionado altera o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) de células de linhagem K562;
- Investigar se o efeito citotóxico do composto selecionado sobre as células K562 envolve a modulação de proteínas antiapoptóticas bcl-2 e survivina, da proteína pró-apoptótica Bax, do receptor Fas(FasR), do fator indutor da apoptose (AIF) e caspase-3 ativada.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

Entende-se que câncer é uma doença que se caracteriza pelo conjunto de células anormais que crescem de forma incontrolável e ignoram o mecanismo normal de divisão celular. Diferente das células saudáveis, que se ordenam por estímulos coordenados de proliferação, diferenciação e morte celular, as células neoplásicas despendem da independência desses sinais reguladores, o que resulta em uma proliferação desordenada dessas células neoplásicas, como também a invasão de tecidos e órgãos adjacentes àquele tecido/órgão inicial (YADAV; MOHITE, 2020).

O câncer é uma doença genética, pois é por meio de mutações genéticas que há o início das neoplasias. Essas alterações genéticas podem acontecer por exposições mutagênicas, envelhecimento ou por hereditariedade. Quando uma célula sofre um dos danos citados anteriormente, e se modifica geneticamente, torna-se capaz de se proliferar de forma clonal, ou seja, gerar outras células que sejam tão idênticas quanto a célula inicial, e, por expressarem aberrações moleculares que favorecem a sua proliferação e manutenção. Essas células tendem a proliferar-se com maior rapidez do que as células saudáveis, assim tomam o espaço que antes era de células fisiológicas normais (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2018; NCI, 2021).

Os principais genes envolvidos no desenvolvimento tumoral são: proto-oncogenes; genes supressores de tumor, pois estão envolvidos na proliferação e divisão celular, e os genes de reparo do DNA, os quais realizam o reparo do DNA danificado. Células com alterações nesse último gene são capazes de desenvolver alterações genéticas adicionais em outros genes, além de serem capazes de alterar cromossomos, com duplicações ou deleções cromossomais (NCI, 2021).

Conforme suas características fisiopatológicas e diante de suas particularidades clínicas, as neoplasias podem ser classificadas entre benignas e malignas. As neoplasias benignas têm seu crescimento de forma mais controlada, usualmente com menor rapidez, suas células são bem diferenciadas e o tumor tem limites bem definidos sem capacidade de invadir outros tecidos/órgãos. Em contrapartida, as neoplasias malignas são caracterizadas por células que proliferam com muita rapidez e sem controle, apresentam graus de diferenciação variáveis e tem uma enorme capacidade de acometer outros órgãos, ou seja, são capazes de formar metástases (NCI, 2021; WANG; LEI; HAN, 2018).



De forma geral as neoplasias malignas são subdivididas entre neoplasias de tumores sólidos e neoplasias hematológicas. Os tumores sólidos ocorrem quando há a formação de uma massa sólida em um tecido que previamente encontrava-se saudável. As neoplasias hematológicas têm origem na medula óssea e/ou em tecidos linfoides e são decorrentes do desajuste da hematopoiese normal ou do crescimento de células linfoides em tecidos linfoides primários ou secundários (SWERDLOW et al., 2017; NCI, 2021; WHO, 2022).

As leucemias são neoplasias do sistema hematopoiético que se caracterizam pela proliferação desordenada de células hematopoiéticas anormais. Essas células podem se acumular na MO e/ou SP, bem como se infiltrar em outros tecidos e causar metástase. O clone leucêmico pode originar-se em diferentes fases de diferenciação de precursores mieloides ou linfoides. Assim essas neoplasias podem ser subdivididas em mieloides e linfoides, e, em agudas e crônicas, o que define essa doença como uma neoplasia heterogênea, tanto biologicamente quanto morfológicamente (SWERDLOW et al, 2017, MARIANI; CABRETA, 2014, HU; SHILATIFARD, 2016).

### 3.1 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA)

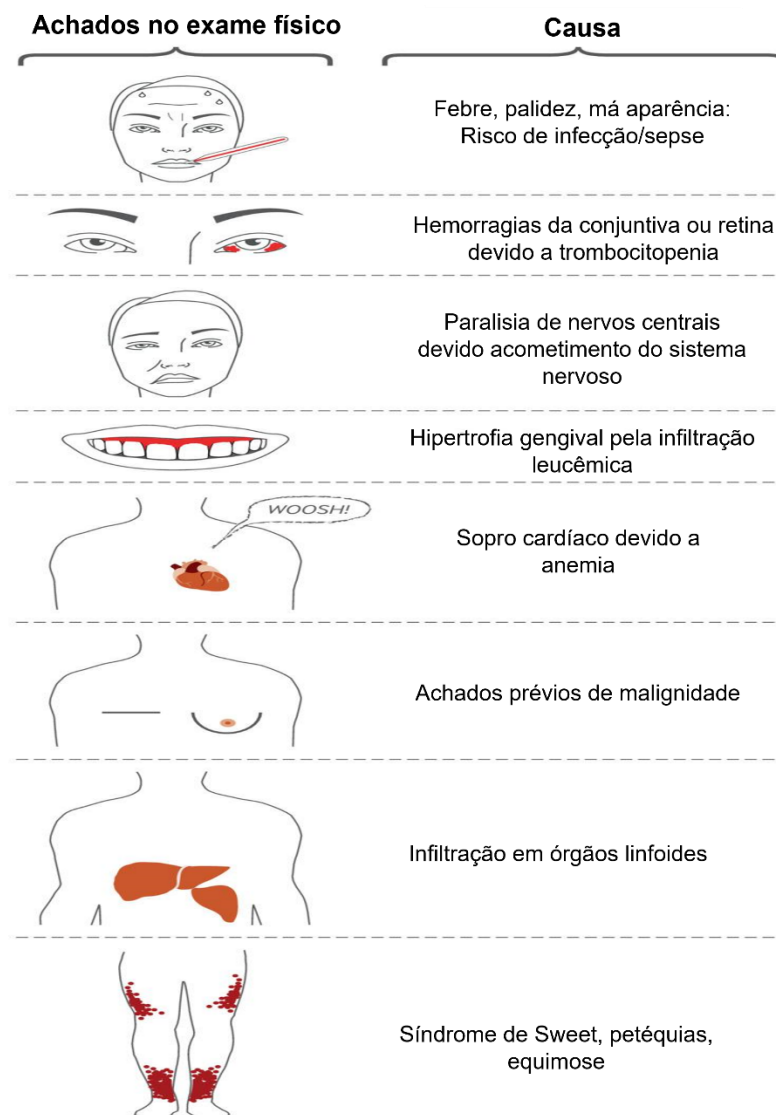
A LMA é uma neoplasia hematológica de células progenitoras mieloides, e é considerada uma doença complexa devido a sua heterogeneidade. A principal causa dessa neoplasia são as alterações genéticas, e, é devido a essas alterações que as células neoplásicas perdem seu potencial de diferenciação e se proliferam de forma anormal (PELCOVITS; NIROULA, 2020; WOJCICKI et al., 2020; SWERDLOW et al, 2017). Além das alterações genéticas outros fatores de riscos estão associados à doença como: idade, exposição a produtos químicos, uso de cigarro, tratamentos prévios a outras neoplasias e alta exposição à radiação (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022).

É uma neoplasia que atinge, principalmente, adultos mais velhos com média de idade de 68 anos, é rara em indivíduos com menos de 45 anos de idade. O prognóstico da doença para indivíduos idosos é considerado desfavorável, pois a taxa de sobrevivência de 5 anos é de apenas 25% dos casos (MONTESINOS et al., 2019; MUKHEJEE; SEKERES, 2019). Outro grupo que apresenta um prognóstico desfavorável são crianças com LMA, apesar da doença ser rara nesse grupo. Cerca de um terço dos pacientes pediátricos sofrem recidiva da doença após o tratamento inicial (APLENC et al., 2020;

BRISSOT; MOTY, 2015; ELGARTEN; RUBNITZ, 2008; RUBNITZ; KASPERS, 2021).

Os sinais e sintomas podem se manifestar de forma variada, desde o paciente sem nenhum sintoma identificado, àquele em estado crítico devido a uma sepse causada pela insuficiência medular. As manifestações clínicas são inespecíficas e por isso o diagnóstico precoce se torna mais difícil. A Figura 1 mostra alguns sintomas possíveis que os pacientes com LMA podem apresentar (BHATT, 2019; KLEPIN et al., 2020; NEWELL; COOK, 2021).

Figura 1. Apresentações clínicas de pacientes de LMA



Apresentações clínicas apresentadas por pacientes com LMA. Estes sinais e sintomas podem ser observados por diversos profissionais da saúde como médicos, enfermeiros, farmacêuticos, dentistas etc. Fonte: Adaptado(NEWELL; COOK, 2021).

O diagnóstico laboratorial das LMAs é realizado pela avaliação morfológica e citocimica, imunofenotípicas e genética das células neoplásicas, e, são classificadas segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (KARIMDADI SARIANI et al., 2021; ROSE-INMAN; KUEHL, 2017; SWERDLOW et al., 2017).

### **3.1.1 A PATOGÊNESE DA LMA**

Por tratar-se de uma doença extremamente complexa e heterogênea, a patogênese completa da LMA continua desconhecida. Porém, ao longo dos anos muitos estudos investigaram a biologia molecular dessas doenças. Esse conhecimento é importantíssimo para o estabelecimento de tratamentos mais individualizados e eficazes (CULP-HILL; D’ALESSANDRO; PIETRAS, 2021; PADMAKUMAR et al., 2021; WOJCICKI et al., 2020b).

Sabe-se que, devido a mutações genéticas, células progenitoras mieloides que deveriam se diferenciar a células mieloides maduras na medula óssea, para posteriormente alcançarem o SP, perdem a capacidade de maturação, se proliferam de forma descontrolada e sua funcionalidade é limitada. Essas células, também denominadas de células tronco leucêmicas (LSCs) são responsáveis por originar os blastos leucêmicos, que assim como as LSCs, se proliferam de forma aberrante e bloqueiam a maturação do restante das células da linhagem mielóide (CULP-HILL; D’ALESSANDRO; PIETRAS, 2021; WOJCICKI et al., 2020b).

Para que mantenham a proliferação exacerbada, sabe-se que os blastos leucêmicos requerem uma enorme quantidade de energia e metabólitos. É através do “efeito Warburg”, descrito há cem anos atrás por Otto Warburg, que as células leucêmicas se mantêm energeticamente ativas. As células neoplásicas utilizam, preferencialmente, a glicólise aeróbica sobre o processo de fosforilação oxidativa, e, assim conferem vantagem de proliferação e sobrevivência. A mutação tirosina quinase 3 (FLT3) potencializa o efeito descrito acima, pela regulação positiva da hexoquinase-2, e, assim, há uma dependência de glicólise aeróbica (WOJCICKI et al., 2020b). Essa alteração genética está presente em cerca de 30% dos casos de LMA, e, está associada a um pior prognóstico. O gene FLT3 é responsável por codificar o receptor de tirosina quinase, o qual tem um papel fundamental na hematopoiese, pois atua como regulador em processos celulares tais quais proliferação, diferenciação e apoptose (CHAN, 2011; LAGUNAS-RANGEL et al., 2017). Quando esse gene sofre uma mutação de

duplicação em tandem interna (DIT) ele perde a sua conformação fisiológica, isso permite que o ligante se ligue de forma desordenada ao FLT3, o que resulta no estímulo da proliferação celular (PADMAKUMAR et al., 2021). Por isso, os casos que apresentam células leucêmicas com a mutação no FLT3-DIT apresentam leucocitose, e, por isso, aumento do risco de recidiva e diminuição da sobrevida (DAVER; VENUGOPAL; RAVANDI, 2021). O FLT3-DIT ativa de forma significativa a via STAT5, que por sua vez induz a expressão gênica de importantes genes para a proliferação celular como Ciclina D1, c-MYC e p21 (CHAN, 2011; LAGUNAS-RANGEL et al., 2017; PADMAKUMAR et al., 2021).

Outra mutação importante na LMA é a da proteína nucleolar nucleofosmina (NPM1). Essa proteína é encontrada no núcleo de células em proliferação. As principais funções dessa proteína são reparo ao DNA, apoptose e biogênese do ribossomo (PADMAKUMAR et al., 2021). Foi observado que essa mutação ocorre de forma dependente da idade, portanto, pacientes mais velhos têm uma incidência maior da mutação NPM1. Essa mutação também se caracteriza por apresentar-se com outras mutações como por exemplo FLT3-DIT, cerca de 40% dos pacientes com NPM1 também apresentam FLT3-DIT o que indica um prognóstico desfavorável. Porém, quando a mutação NPM1 se apresenta de forma isolada é considerada como um fator de prognóstico favorável (BEWERSDORF; ABDEL-WAHAB, 2022; LAGUNAS-RANGEL et al., 2017; MARCUCCI et al., 2012a, 2012b; PADMAKUMAR et al., 2021; THIEDE et al., 2006).

O fator de transcrição CEBPA mutado também pode aparecer na LMA. Em condições normais, o CEPBA exerce uma função vital na regulação da proliferação e na diferenciação dos precursores mielóides, entretanto, a expressão de CEPBA é suprimida na LMA o que leva a uma insuficiência na diferenciação dos granulócitos. Essa mutação aparece em cerca de 15-19% dos casos de LMA, e, está associada a um risco menor de falha do tratamento, recidiva ou morte, ou seja, pacientes que apresentam essa mutação tem melhor sobrevida livre de recaída e sobrevida global (CULP-HILL; D'ALESSANDRO; PIETRAS, 2021; FRÖHLING et al., 2004; PADMAKUMAR et al., 2021; WILHELMSON; PORSE, 2020).

Outro fator de transcrição mutado que também pode ser observado na LMA, é o gene supressor de tumor (TP53), o qual codifica o fator de transcrição p53. Esse gene controla a parada do ciclo celular, apoptose, a senescência celular e o reparo ao DNA.

Inclusive esse gene já foi descrito como o “guardião do genoma” pois é capaz de prevenir mutações do DNA. Na LMA, essa mutação está relacionada principalmente a contagens baixas de blastos, tanto na MO quanto no SP, idade avançada, e tratamento quimioterápico prévio. É considerado um marcador de mau prognóstico, e está associado com baixa resposta a terapia de indução quimioterápica (KISHTAGARI; LEVINE; VINY, 2020; LAGUNAS-RANGEL et al., 2017; PADMAKUMAR et al., 2021; PANUZZO et al., 2020; WELCH, 2018).

Além das mutações citadas acima, sabe-se que as interleucinas (ILs) também desempenham um papel importante na LMA. Essas ILs exibiram função regulatória na sobrevivência, apoptose e proliferação de células leucêmicas (KASER et al., 2021; NAKASE; KITA; KATAYAMA, 2018). Por exemplo, a interleucina 1 (IL-1) desempenha, na LMA, como um fator de proliferação autócrino nas células leucêmicas (KASER et al., 2021; VIJAY et al., 2019). Estudos apontam que, assim como a interleucina 10 (IL-10), a molécula de adesão E-caderina promove a sobrevivência das células leucêmicas (KASER et al., 2021; NISHIOKA et al., 2017).

As interleucinas 2 (IL-2) e a interleucinas 3 (IL-3) estão intimamente ligadas com o CD25, isso porque o CD25 presente na superfície de células de LMA é capaz de ligar-se a IL-2. Essa ligação CD25/IL-2 é apresentada a linfócitos T com receptor de IL-2. A estimulação criada por esta ligação induz a produção de IL-3. A IL-3, por sua vez, exerce uma função altamente proliferativa nas células neoplásicas de LMA positivas para CD25. Assim LMA positiva para CD25 possui uma via de manutenção de proliferação celular mediado por IL-2, IL-3 CD25 e linfócito T (KASER et al., 2021; NAKASE; KITA; KATAYAMA, 2018).

Um dos desafios do tratamento da LMA é a recidiva e refratariedade que muitos pacientes enfrentam após o diagnóstico da neoplasia. Nesse contexto, a interleucina 8 (IL-8) está estreitamente ligada a quimioresistência de células neoplásicas e a proliferação dos blastos leucêmicos. (KASER et al., 2021; VIJAY et al., 2019).

A formação de novos vasos sanguíneos, denominada de angiogênese, é imprescindível para o crescimento e manutenção das células tumorais. Estudos demonstraram que a interleucina 12 (IL-12) é capaz de causar deficiência de moléculas pró angiogênese como VEGF, CXCL6 e CXCL1. Em suma, o estudo demonstrou que a IL-12 inibe diretamente o crescimento das células de LMA, além de influenciar na

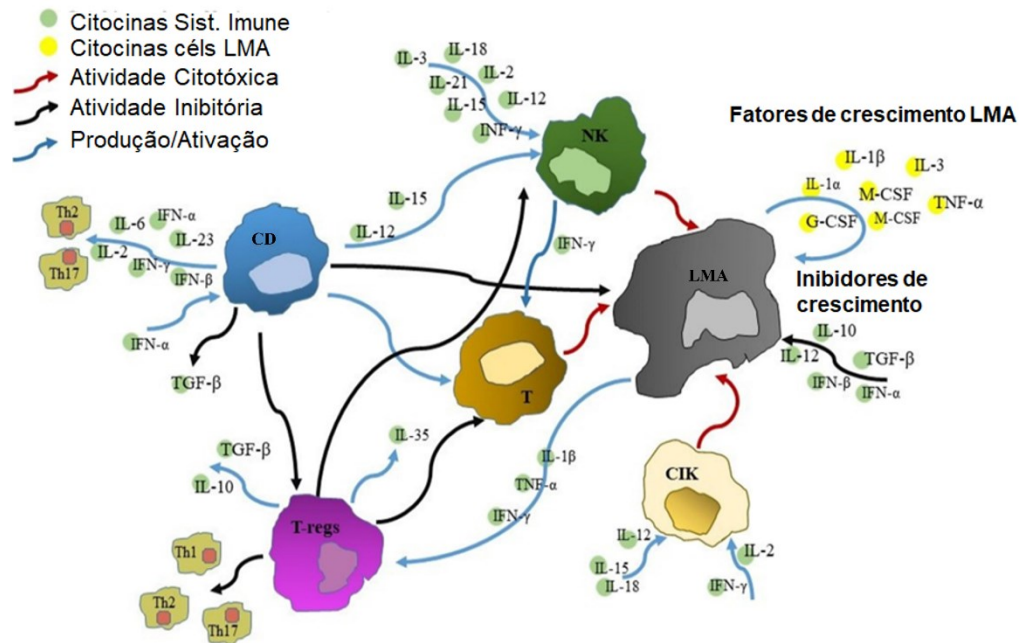
atividade metastática (FERRETTI et al., 2010; KASER et al., 2021; MARTNER et al., 2010).

As células T helper tipo 17(Th17) são células imunes importantes que secretam interleucina 17 (IL-17). Um estudo comparou as concentrações de Th17 e IL-17 em células normais e em células leucêmicas e foi observado que as células de LMA possuem concentrações mais elevadas de Th17 e IL-17 em relação a células normais. Além disso, concentrações mais baixas de Th17 foram relacionadas a remissão pós quimioterapia de pacientes com LMA. As células Th-17 secretam uma isoforma da IL-17, a IL-17A que mostrou propiciar a proliferação de células leucêmicas que expressam receptor de IL-17. A IL-17 também é responsável por inibir células Th1. Essas células são responsáveis por secretarem  $IFN\gamma$ , que por sua vez é responsável por favorecer a resposta imune do paciente contra células tumorais. (HAN et al., 2014; KASER et al., 2021).

As células T reguladoras (T-reg) são moduladoras do sistema imunológico. Dentre suas funções há controle a autoimunidade, e, por vezes, resistência a imunidade antitumoral (KASER et al., 2021). A interleucina 35 (IL-35) é secretada pelas T-regs, e dados sugerem que pacientes com LMA apresentam concentrações de IL-35 e T-reg aumentadas, o que confere a essas pessoas imunossupressão significativa. A ligação entre T-reg e IL-35 também está relacionada a um mecanismo de escape dos blastos leucêmicos em relação ao sistema imune do paciente (KASER et al., 2021; TAO et al., 2015; WANG et al., 2015).

A Figura 2 mostra de forma ilustrativa toda a rede que se forma entre citocinas e células imunológicas no microambiente da LMA.

Figura 2. A rede complexa das citocinas e sistema imunológico no microambiente da LMA.



Rede complexa de citocinas que demonstra os efeitos diretos e indiretos de citocinas no crescimento das células de LMA; as citocinas regulam as conexões entre a neoplasia em crescimento e o sistema imune hematopoiético. Elas atuam no início das atividades imunológicas antitumorais para eliminar as células leucêmicas direta ou indiretamente por meio de células efetoras do sistema imunológico. Em contrapartida, as células neoplásicas também secretam citocinas que atuam como fator de crescimento tumoral, participam da metástase e da progressão do tumor. NK; células NK, CD; células dendríticas, T; células T, T-regs; células T reguladoras, CIK; células assassinas induzidas por citocinas; células T auxiliares, IL; interleucina, TNF; fator de necrose tumoral, INF; interferon, TGF; fator transformador de crescimento. Fonte adaptado: (KARIMDADI SARIANI et al., 2021).

O conhecimento da patogenia da LMA se faz importante, pois é através da compreensão dos fatores que envolvem o microambiente dessa neoplasia que o tratamento da doença se faz cada vez mais individualizado e efetivo (KARIMDADI SARIANI et al., 2021; MUKHERJEE; SEKERES, 2019; PADMAKUMAR et al., 2021; PANUZZO et al., 2020; WOJCICKI et al., 2020b).

### 3.1.2 TRATAMENTO DA LMA

O tratamento da LMA, tem como objetivo eliminar as células leucêmicas para que se estabeleça a hematopoiese normal no microambiente da MO (DÖHNER; WEISDORF; BLOOMFIELD, 2015). A escolha da terapêutica que a ser utilizada depende do subtipo de LMA, além disso outras características também são avaliadas no

momento da decisão do tratamento, entre elas, os fatores prognósticos, que incluem a idade do paciente, estado geral de saúde, comorbidades e a presença de anormalidades genéticas. A quimioterapia intravenosa ainda é a principal forma de tratamento para a grande maioria dos pacientes com LMA, devido a sua ação sistêmica e acessibilidade das instituições. De forma geral o processo quimioterápico é composto por três fases: a etapa de indução, que tem como principal objetivo eliminar os blastos leucêmicos; a etapa de consolidação que visa a destruição das células leucêmicas remanescentes; e a fase de manutenção que consiste na administração de baixa dose de determinado quimioterápico (conforme indicação de cada caso) por meses ou até mesmo anos. Geralmente a etapa de manutenção está relacionado com pacientes de Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)(BHATT, 2019; HEUSER et al., 2020; SAMI et al., 2020; TALLMAN et al., 2019).

A espinha dorsal do tratamento quimioterápico da LMA é conhecida como “regime 7+3”, o qual combina a citarabina, um antimetabólito da piridina, por sete dias e uma antraciclina, que pode ser a daunorrubicina ou idarrubicina, por 3 dias, conforme mostra a Figura 3. Esse regime é utilizado desde o ano de 1973 e foi proposto por um grupo americano liderado por James Holland, que evidenciaram que esses dois medicamentos, anteriormente usados separadamente, quando utilizados de forma concomitante atingiam maiores taxas de remissão em pacientes com LMA. Após quase cinco décadas, esse esquema quimioterápico ainda é muito utilizado, e é a base para outras terapias mais novas (HEUSER et al., 2020; ROWE, 2022; TALLMAN et al., 2019).

Figura 3. “Regime 7+3”





“Regime 7+3” utilizado no tratamento de LMA desde 1973 que combina citarabina, antimentabólico de pirimidina, por sete dias e um antraciclina, daunorrubicina por três dias. Fonte: Adaptado (ROWE, 2022).

Apesar da manutenção do esquema descrito anteriormente por décadas, as taxas de remissão completa ainda despertam preocupação, principalmente em pacientes com 60 anos ou mais. Esse grupo alcança, aproximadamente, apenas 40 a 60% de remissão completa e de 5 a 15% de cura (KAYSER; LEVIS, 2022; NEWELL; COOK, 2021). Por esse motivo, nos últimos anos a *Foods and Drugs Agency* (FDA) aprovou novos medicamentos para o tratamento da LMA. Essas novas terapias aprovadas pela FDA são mais direcionadas para alvos genéticos, como, por exemplo, as mutações genéticas no gene FLT3, para as quais pode-se citar os inibidores de FLT3, midostaurina, quizartinib e gliteritinib. A midostaurina foi aprovada em abril de 2017 para ser utilizada em pacientes recém diagnosticados com LMA FLT-DIT positivos juntamente com o “regime 7+3” na fase de indução, assim como utilizada também na fase de consolidação. Já o quizartinibe e o gliteritine são utilizados em pacientes que foram recidivantes ou refratários à quimioterapia inicial (DÖHNER; WEI; LÖWENBERG, 2021; HEUSER et al., 2020; KAYSER; LEVIS, 2022; TALLMAN et al., 2019).

A FDA aprovou também, nos anos de 2017 e 2018, os inibidores das enzimas isocitrato desidrogenase 2 (IDH2) e IDH1, respectivamente. Essas enzimas são componentes chaves do ciclo de Krebs. A IDH1 está presente nos peroxissomos e citoplasma, enquanto a IDH2 é encontrada na matriz mitocondrial. Tanto o inibidor seletivo de IDH1, ivosidenib, quanto o inibidor seletivo de IDH2, ensidenib, tem como mecanismo de ação a diferenciação e maturação das células leucêmicas, e, por isso, pode induzir a síndrome de diferenciação e leucocitose, que podem ser tratados com corticoides e hidroxiuréia. Quando recém aprovados ambos os medicamentos eram utilizados como linha de frente em casos de recidiva/refratariedade de pacientes com LMA positivos para mutação IDH. Porém por apresentarem boas taxas de remissão completa em cerca de 22% dos pacientes, esses inibidores avançaram para a primeira linha de tratamento de pacientes recém diagnosticados com LMA positivos para IDH com mais de 75 anos, e, que não são elegíveis para a terapia intensiva. Porém, apesar do sucesso aparente, alguns aspectos ligados ao ivosidenib e ensidenib continuam

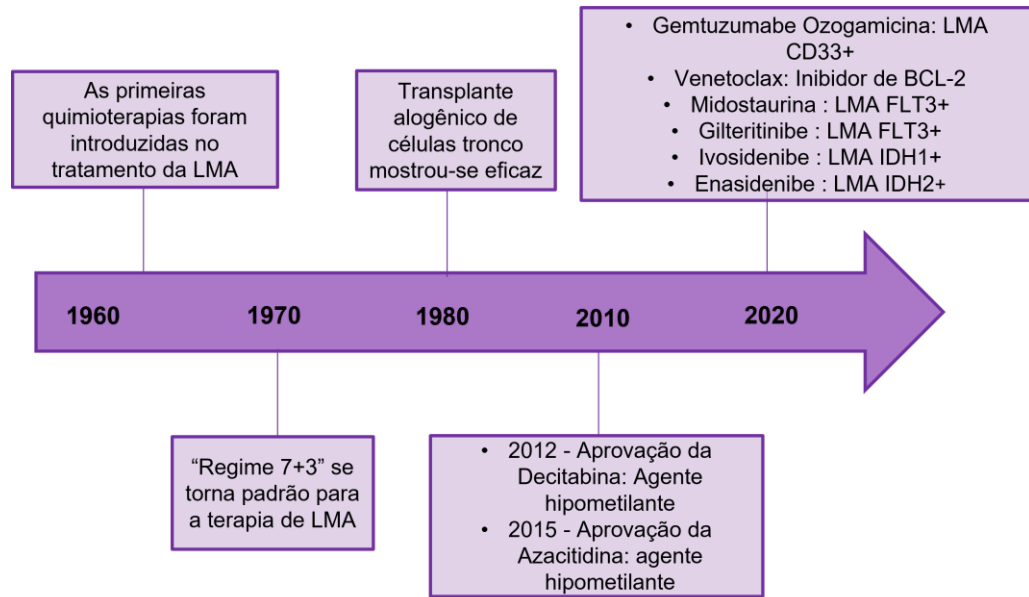
inexplicáveis, que incluem a variabilidade da resposta entre os pacientes com LMA IDH mutante, a resistência primária presente em alguns pacientes e a resistência adquirida que alguns pacientes apresentam após a remissão completa (DINARDO; PERL, 2019; KAYSER; LEVIS, 2022; SAMI et al., 2020; SHORT et al., 2020; TALLMAN et al., 2019).

Reaprovado pela FDA em 2017, o gentuzumab ozogamicina (GO) é um imunoc conjugado que combina o anticorpo anti-CD33 com a toxina caliqueamicina. Esse fármaco é utilizado junto com o esquema de combinação de daunorrubicina e citarabina em pacientes recém diagnosticados com LMA com expressão de CD33. Também é utilizado para LMA recidivante/ refratária e para pacientes pediátricos (DINARDO; PERL, 2019; SHORT et al., 2020; TALLMAN et al., 2019).

Um outro fármaco desenvolvido nas últimas décadas foi o venetoclax, um inibidor oral da proteína antiapoptótica BCL-2. Inicialmente foi utilizado para leucemia linfocítica crônica (LLC), mas depois, considerando que nas células leucêmicas da LMA, a BCL-2 está firmemente ligada a proteínas pró-apoptóticas, como BAX, também foi sugerido o seu uso para tratamento nesses pacientes. Ao ser administrado, o venetoclax bloqueia o sulco hidrofóbico de BCL-2, assim, há o deslocamento de BAX, e, conseqüentemente, as células de LMA sofrem apoptose. Entretanto, os pacientes tratados com venetoclax, em monoterapia, apresentaram resistência a medicação por regulação positiva de uma outra proteína antiapoptótica, a MCL-1. A fim de solucionar esta questão, um agente hipometilante, como, por exemplo, a azacitidina, foi combinado com venetoclax para melhorar os resultados dessa terapia (BAZINET; ASSOULINE, 2021; HEUSER et al., 2020; SHORT et al., 2020; TALLMAN et al., 2019).

A evolução do tratamento da LMA, demonstrado na Figura 4, reflete a necessidade de desenvolvimento de medicações que sejam capazes de driblar a complexidade dessa neoplasia (DINARDO; PERL, 2019; SHORT et al., 2020).

Figura 4. Evolução do tratamento da LMA



As pesquisas para medicações cada vez mais efetivas fez com que a LMA estivesse no topo de estudos para tal finalidade nas últimas décadas. A linha do tempo mostra as aprovações terapêuticas cada vez mais específicas para atender a heterogeneidade da LMA. Fonte: Adaptado de (DINARDO; PERL, 2019).

Apesar dos esforços da indústria farmacêutica, o tratamento da LMA ainda apresenta índice de recidiva/refratariedade consistente. As taxas de remissão completa ainda ficam abaixo dos 30% (SAXENA; KONOPLEVA, 2020).

Com os avanços no entendimento da patogenia da LMA um leque de possíveis alvos farmacológicos foram descritos. Um alvo terapêutico que ganhou bastante notoriedade foi a apoptose. Foi observado que as células leucêmicas interagem de forma simbiótica com proteínas antiapoptóticas, e, por isso, muitos estudos se valem desse conhecimento para o desenvolvimento de novos fármacos contra a LMA, como o venetoclax, citado anteriormente (BALL; BORTHAKUR, 2020a; SAXENA; KONOPLEVA, 2020a).

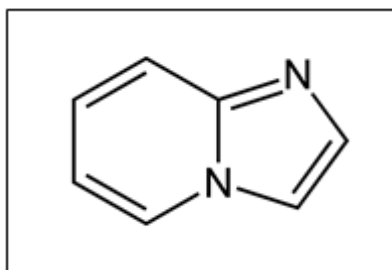
Para tal fim, os compostos sintéticos têm sido amplamente pesquisados pela indústria farmacêutica. Cerca de 85% dos medicamentos utilizados atualmente na clínica são de origem sintética, pois a síntese desses compostos tornou-se uma facilidade para a produção farmacêutica., além de possibilitar o controle analítico dos produtos preparados (BARREIRO; FRAGA, 2015). Os anéis heterocíclicos com um anel imidazol estão presente em uma gama de atividades biológicas como antifúngicos (SAWYER et al., 1975), antineoplásicos, anticonvulsivantes e antibióticos (DEVI;

JANA; SINGH, 2018; KISHBAUGH, 2016). Entre os produtos da adição de anéis heterocíclicos às piridinas, é possível destacar a imidazopiridina (SAYEED et al., 2018).

### 3.2 IMIDAZOPIRIDINAS

A estrutura das imidazopiridinas tem-se demonstrado um importante elemento quando se pensa na questão farmacológica, pois sua estrutura química ganhou enorme relevância nas últimas décadas por ser usada com grande frequência no desenvolvimento racional de novos análogos sintéticos para muitos distúrbios terapêuticos. Uma ampla gama de derivados de imidazopiridinas foi desenvolvida como potenciais quimioterápicos, antivirais, anti-inflamatórios, antiparasitários e antidiabéticos. Isso se deve ao fato de que o sistema heterocíclico (Figura 5), presente na estrutura química dessa classe, é considerado um farmacofórico chave para a otimização e identificação de estruturas *leads* (DYMIŃSKA, 2015, EL-AWADY; SEMREEN; SABER-AYAD; CYPRIAN; MENON; AL-TEL, 2016; KHATUN et al., 2021a).

Figura 5. Estrutura química das imidazopiridinas



Fonte: Silva, LO, 2021

As imidazopiridinas são compostos que pertencem a um grande grupo de antibióticos nucleosídeos. Como há uma semelhança conformacional muito grande entre os nucleosídeos humanos e os presentes nos antibióticos, estes conseguem interagir com o material genético humano e assim exercem sua atividade biológica. (DYMIŃSKA, 2015)

Estes compostos estão associados a um grande potencial antineoplásico. Um estudo realizado com células de câncer de mama (MCF7, MDA-MB-231 e SKBR3) demonstrou que as imidazopiridinas testadas diminuíram a expressão da proteína EZH2 que conseqüentemente leva a uma parada do ciclo celular na fase G2/M e induz a apoptose (DYMIŃSKA, 2015, HAYDEN; JOHNSON; PACKHAM; CRABB, 2010).

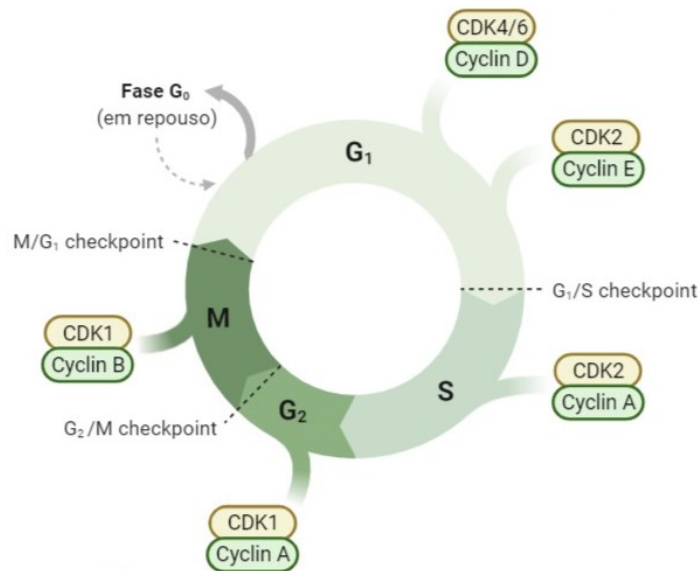
Outro estudo realizado por Ramasamy e colaboradores (1990) investigou o efeito citotóxico de imidazopiridinas em camundongos com LMA. O resultado da pesquisa evidenciou que as imidazopiridinas reduziram as células leucêmicas em até 77% (DYMIŃSKA, 2015; RAMASAMY; IMAMURA; HANNA; FINCH; AVERY; ROBINS; REVANKAR, 1990). Ainda, DAHAN-FARKAS e colaboradores (2011), demonstraram que derivados de imidazopiridinas induziam a apoptose em células de câncer de colon, HT-29 e Caco-2.

As imidazopiridinas também já foram descritas como inibidores da enzima Aurora quinase A. Essa enzima, que pertence à família das serinas/treoninas quinases, é responsável pela regulação do fuso mitótico e encontra-se super expressa em cânceres como colorretal, próstata, ovário, mama, glioma entre outros. (DYMIŃSKA, 2015).

### 3.3 CICLO CELULAR

O processo do ciclo celular é vital para que haja a replicação e proliferação das células neoplásicas bem como o estímulo que sustenta a replicação e à imortalidade, que são propriedades importantes para o desenvolvimento das células tumorais (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Como mostra a Figura 5, o ciclo celular é dividido em interfase e mitose e assegura que o material genético de uma célula mãe seja repassado igualmente a duas células filhas. Durante a interfase, período que compreende o tempo entre duas mitoses, a célula se prepara para a divisão celular, para isso aumenta seu volume celular, realiza a condensação dos cromossomos e a síntese de proteínas. Essa etapa é denominada de fase G1 (*gap one*). Posteriormente a G1, se inicia a fase G2, onde há a síntese de RNA e proteínas, componentes necessários para realizar a mitose. Ainda na interfase a célula pode entrar na fase G0, período em que a célula se encontra em repouso (quiescência). A próxima fase do ciclo celular é a mitose (fase M), onde uma célula-mãe se divide em duas células-filhas que possuem o mesmo número de cromossomas. A fase M se divide em cinco etapas: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase (WENZEL; SINGH, [s.d.]; WILLIAMS; STOEBER, 2012).

Figura 6. O ciclo celular



O ciclo celular é dividido em interfase (G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> 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: Silva, 2021.

Com a finalidade de garantir que o processo de divisão celular esteja de forma correta e que não haja danos e mutações no DNA, existem diversos pontos de checagem (*checkpoints*) durante o ciclo celular. Os *checkpoints* são mediados por ciclinas, as quais são expressas durante as fases do ciclo e regulam de maneira alostérica uma família de quinases, denominadas quinases dependentes de ciclinas (CDKs). São as CDKs que permitem a progressão do ciclo celular. Ao encontrar erros no processo de divisão, há a formação de um complexo estável entre as CDKs e suas proteínas inibitórias (CKIs) e a interrupção do processo de divisão celular. Falhas nesses processos de regulação podem acarretar acúmulo de anormalidades no DNA, e a proliferação celular descontrolada, características observadas em neoplasias malignas, como na LMA (GABRIELLI; BROOKS; PAVEY, 2012; SHERR; BARTEK, 2017; WILLIAMS; STOEBER, 2012).

Sabe-se que as células troncos leucêmicas (LSCs) são capazes de escapar dos efeitos dos agentes quimioterápicos por permanecerem em quiescência. Um aumento no miRNA 126 nas LSCs leva à diminuição na expressão de CDK3 que leva ao atraso da célula em sair de G<sub>0</sub>. Além disso, as células leucêmicas têm regulação positiva de CDKs e proteínas de *checkpoints*. As CDKs promovem a progressão do ciclo celular

em resposta a sinais mutagênicos como FLT3-DIT e os *checkpoints* são capazes de reparar os danos ao DNA causados pela quimioterapia. Por esses motivos, muitos fármacos que visam inibir CDKs e *checkpoint* têm sido avaliados para o tratamento de LMA (ABOU ZAHR; BORTHAKUR, 2017a; JAMMAL et al., 2020).

### 3.4 APOPTOSE

A apoptose é um processo celular conhecido como morte celular programada pois o mecanismo de eliminação da célula danificada começa a partir de uma medida racional do organismo que visa a homeostase celular. Trata-se de um processo fisiológico e rotineiro que, em geral, não causa ativação de mediadores inflamatórios, diferentemente da necrose, outro tipo de processo de morte celular, onde pode ser observado trauma celular e resposta inflamatória (D'ARCY et al., 2019; GALLUZZI et al., 2018). A arquitetura da apoptose é complexa e abrange muitas vias de sinalização. Esse processo de morte celular pode ser desencadeado através da via intrínseca ou extrínseca, ambas as vias convergem para ativar caspases efetoras o que resulta em alterações celulares morfológicas e bioquímicas (PISTRITTO; TRISCIUOGGIO; CECI; GARUFI; DORAZI, 2016).

#### 3.4.1 Apoptose intrínseca

A apoptose intrínseca (Figura 7), também denominada apoptose mitocondrial, ocorre quando há desordem no microambiente intracelular, como por exemplo, alta concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs), estresse no retículo endoplasmático (RE) ou danos ao DNA (SONG et al., 2015; XU; LAI; HUA, 2019).

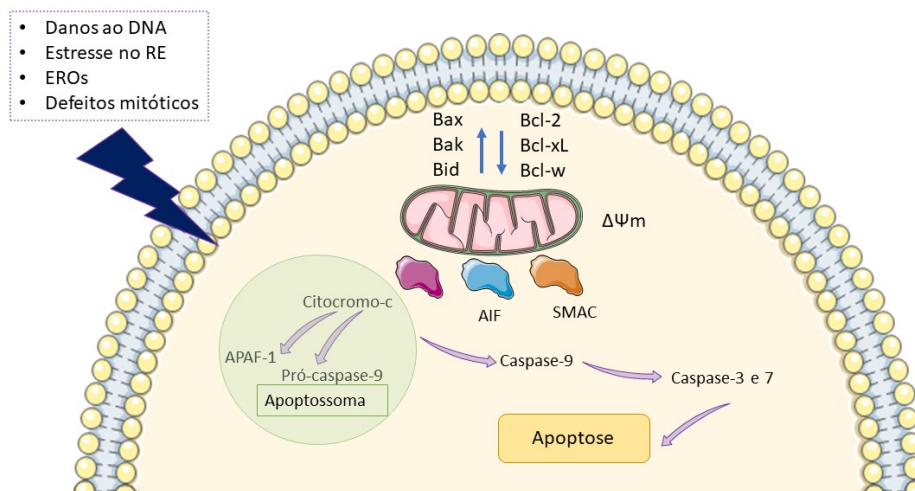
Os membros da família de proteínas Bcl-2 são os responsáveis pela regulação dessa via da apoptose, e são divididos em duas classes: os membros favoráveis à apoptose (pró-apoptóticos) que são as proteínas Bax, Bak, Bid, Puma e Noxa; e os membros que não favorecem a apoptose (anti-apoptóticos) como Bcl-2, Bcl-xL e Bcl-w (MOLDOVEANU et al., 2014).

Diante de um estímulo apoptótico, os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 mudam sua conformação, e se translocam do citosol para para o interior da membrana mitocondrial. A partir desse momento ocorre a inibição das proteínas antiapoptóticas e a permeabilização da membrana mitocondrial, o que permite que os fatores apoptóticos sejam liberados no citosol (GALLUZZI et al., 2018).

A mitocôndria é revestida por duas membranas, externa e interna, e o espaço entre elas é controlado pelo potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Com a permeabilização membranar, poros são formados na membrana externa da mitocôndria ocasionando a perda do  $\Delta\Psi_m$ , e, por consequência, há a liberação de componentes que se encontravam no espaço intermembranar, como, por exemplo, o citocromo-c, o fator indutor da apoptose (AIF) e a proteína SMAC/Diablo (BANO; PHEHN, 2018; JULIEN; WELLS, 2017).

Após a liberação do citocromo-c, este se liga ao fator-1 ativador de protease apoptótica (APAF-1) e a pró-caspase-9, e, dessa forma, ocorre a formação de um complexo denominado de apoptossoma. Esse complexo, por sua vez, ativa a caspase-9, e, conseqüentemente, ocorre a clivagem proteolítica das caspases efetoras -3 e -7. Após a clivagem das caspases efetoras, elas se tornam ativas e são responsáveis por inúmeras alterações conformacionais na estrutura celular, como a formação dos blebbings de membrana, danos ao DNA, exposição dos resíduos de fosfatidilserina, e a formação de corpos apoptóticos. Em paralelo a proteína SMAC bloqueia os membros da família inibidores da apoptose (IAP), o que impede a inibição das caspases efetoras. Já o AIF pode atuar independente da ativação das caspases (PISTRITTO; TRISCIUOGLIO; CECI; GARUFI; DORAZI, 2016).

Figura 7. Apoptose intrínseca



O processo de apoptose intrínseca que se inicia após desordem no ambiente intracelular e desbalanço entre as proteínas pró-apoptóticas como bax, bak e bid e as proteínas anti-apoptóticas como bcl-2, bcl-xL e bcl-w. Assim, há a permeabilização da membrana mitocondrial e, portanto, a perda do

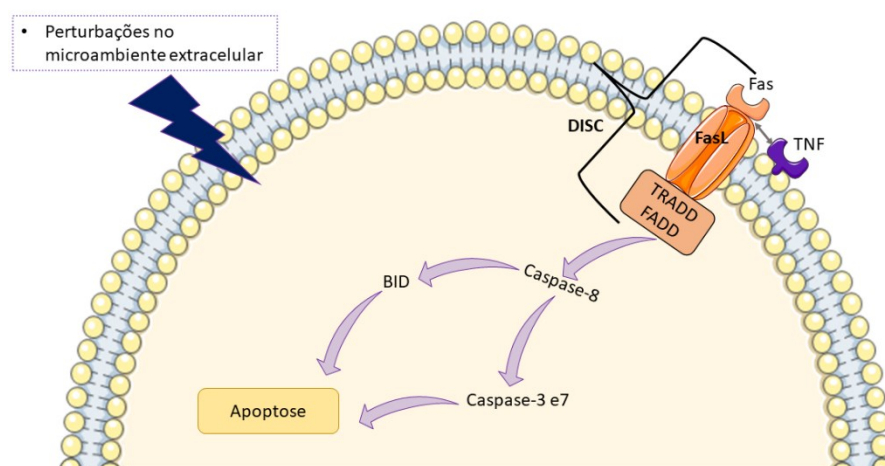


potencial de membrana mitocondrial que é responsável pela liberação de componentes pró-apoptóticos, como citocromo-c, AIF e Smac/Diablo. O citocromo-C combina-se com o APF-1 e a pró-caspase 9 para formar o apoptossoma. É através da formação do apoptossoma que ocorre a clivagem da caspase-9 que por sua vez ativará as caspases efetoras -3 e -7 e levará a célula a morte por apoptose. Fonte: A autora

### 3.4.2 Apoptose extrínseca

A apoptose extrínseca (Figura 8) é desencadeada via receptores de morte, localizados na superfície celular, que captam estímulos externos. Os receptores de morte incluem o receptor Fas (que se liga ao FasL), os receptores de fator de necrose tumoral (TNF) que incluem TNFR1 e TNFR2, TRAIL DR4 e DR5. O processo da apoptose extrínseca se inicia com a interação entre o ligante Fas e os receptores da família TNF. Essa ligação por sua vez chamará os domínios de morte (DD) como TRADD ou FADD que em conjunto com as caspases-8 e -10 comporão o complexo DISC, o qual é um complexo sinalizador de apoptose. A formação do complexo DISC induz a clivagem da caspase-8, que após liberar sua forma ativa, estimulará as caspases -3 e -7. Essas caspases são responsáveis pela morte celular. A caspase -8 também é responsável pela clivagem da proteína pró-apoptótica Bid, que após clivada aumentará a permeabilidade mitocondrial, e liberará fatores apoptóticos, que iniciarão a apoptose intrínseca (CARNEIRO; EL-DEIRY, 2020; D'ARCY, 2019; GALLUZZI et al., 2018).

Figura 8. Apoptose extrínseca



O processo de apoptose extrínseca se inicia a partir de perturbações no microambiente extracelular que sensibilizam os receptores de membrana, como fas e receptores da família TNF. Após estes receptores interagirem entre si, há a ativação dos domínios de morte, TRADD ou FADD, que irão

se ligar ao receptor Fas através do ligante FasL e assim comporão o complexo DISC. Este complexo será responsável pela clivagem da caspase-8 que levará a clivagem das caspases efetoras -3 e -7 e levará a célula a morte por apoptose. A caspase-8 também é responsável por ativar a proteína pró-apoptótica Bid que será responsável pelo início da cascata da apoptose intrínseca que levará a célula a morte por apoptose. Fonte: A autora

### 3.4.3 Morte celular independente de caspase

A homeostase entre a divisão celular e a morte celular é de inquestionável importância para a manutenção e desenvolvimento dos seres vivos. Qualquer erro em um desses processos tem consequências graves como o desenvolvimento do câncer. Nos últimos anos a morte celular programada (PCD) passou a ser muito estudado e descobriu-se que, a apoptose depende de caspase não é a única forma de PCD. Além da apoptose, citada anteriormente, outras PCDs tem sido muito estudadas como autofagia, necrose, piroptose, necroptose, ferroptose, esferoctose, autosis, anoikis, morte celular netótica, morte celular dependente de lisossomos, morte celular imunogênica e processos que não classificados como PCD. (GALLUZI et al., 2018; GIACCONE G, 2005).

## 3.5 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são moléculas que contém oxigênio quimicamente reativo e se formam pela redução incompleta de um elétron de oxigênio, como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxila (OH) e o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) (AGGARWAL et al., 2019). A mitocôndria é a maior fonte de EROS em seres vivos (GALADARI et al., 2017). O equilíbrio entre a produção de EROS e antioxidantes é de grande importância, pois a alta concentração de EROs está relacionada com o desenvolvimento de várias doenças, como o câncer (GALADARI et al., 2017; HAN; WILLIAMS; CADENAS, 2001).

Disfunções mitocondriais são encontradas em células neoplásicas que podem ocorrer por dois fatores: pela reação celular à hipóxia encontrada no microambiente tumoral onde ocorre uma reprogramação metabólica e a geração de energia da célula se dá via anaeróbia (efeito Waburg), ou através de mutações que alteram o DNA da mitocôndria (POTTER; NEWPORT; MORTEN, 2016). Portanto, o aumento de EROs, de acordo com a concentração e o período de exposição, pode ocasionar o estresse oxidativo, que por sua vez pode causar danos nos lipídeos de membrana, nas proteínas

e no DNA, o que poderá gerar instabilidade genômica e a inativação de genes supressores tumorais, como o p53. O aumento de EROS também está ligada a ativação de diferentes vias como a via PI3K/Akt/ mTOR, NF-κB e MAPK/ERK que estão associadas a tumorigênese(REZATABAR et al., 2019).

Em contrapartida, altas concentrações de EROs podem gerar citotoxicidade em células neoplásicas e ocasionar a morte celular em processos como o da apoptose, pois o aumento de EROS diminui a permeabilidade mitocondrial, e assim há a formação de poros na membrana, conseqüentemente, o citocromo-c é liberado, e em conjunto com Apaf-1 e a pró-caspase-9 levam a ativação de caspase-9 e a ativação de caspases efetoras, o que resulta em clivagem de proteínas celulares e a morte celular por apoptose (AGGARWAL et al., 2019).

Apesar do seu papel paradoxal, a busca de compostos que aumentem a produção de EROs parece ser interessante para o desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos.

#### **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 4.1 SÍNTESE DOS COMPOSTOS

Para a execução deste trabalho, utilizou-se quatro compostos de origem natural, nos quais dois foram isolados a partir do coral-Sol (*Tubastraea coccinea* L.) e dois derivados da fucoxantina (pigmento de algas pardas ou marrons). Além desses, foram investigados os efeitos citotóxicos de 34 compostos sintéticos, como descrito abaixo.

#### 4.2 COMPOSTOS NATURAIS

Os compostos CSCRT2 e SPH7 foram gentilmente cedidos pela MSc Fernanda Nienkötter Sardá, a qual realizou sua dissertação de mestrado sob orientação do professor Dr. Eloir Paulo Schenkel do laboratório GEPRONAS/CCS da UFSC. Ambos os compostos foram extraídos do coral - Sol e a coleta aconteceu na Ilha do Arvoredo no Saco do Vidal em Santa Catarina, em maio de 2017, e são derivados indólicos.

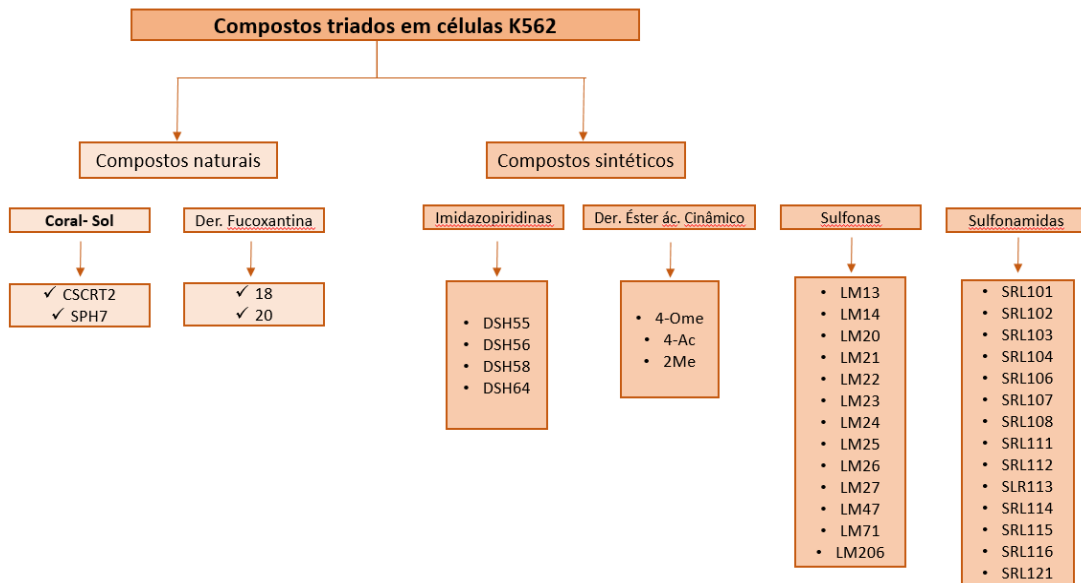
Os compostos 18 e 20 são derivados da fucoxantina. Esses compostos fizeram parte da tese da Dra. Ana Cláudia Philippus, sob orientação da professora Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg, do Laboratório de Química Farmacêutica/CCS da UFSC e foram gentilmente cedidos para este trabalho.

#### 4.3 COMPOSTOS SINTÉTICOS

Duas séries de compostos sintéticos foram cedidas pelo Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais da (LACFI) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), coordenado pelo professor Dr. Ricardo Ferreira Affeldt, quatro imidazopiridinas (DSH55, DSH56, DSH58, DSH64) e três compostos derivados do éster do ácido cinâmico (4-OMe, 4-Ac e 2Me).

Além desses compostos, também foram analisadas outras duas séries, uma de compostos sintéticos derivados de sulfonamidas (SRL101, SRL102, SRL103, SRL104, SRL106, SRL107, SRL108, SRL111, SRL112, SRL113, SRL114, SRL115, SRL116, SRL121) e outra de sulfonas (LM13, LM14, LM20, LM21, LM22, LM23, LM24, LM25, LM26, LM27, LM47, LM206), ambas gentilmente cedidas pelo Laboratório de Química Farmacêutica coordenado pela professora Dra. Lílian Sibelle Campos Bernardes.

Figura 9. Esquema da Triagem de citotoxicidade dos compostos naturais e sintéticos sobre células K562



Fonte: A AUTORA

#### 4.4 TRIAGEM E DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CONCENTRAÇÃO E TEMPO RESPOSTA

Para atingir as concentrações desejadas nos experimentos de citotoxicidade, inicialmente, foi preparada uma solução com concentração de 10mM dos compostos analisados, dissolvidos em DMSO e armazenados a 4°C. As concentrações usadas nos experimentos foram obtidas através de soluções intermediárias.

Inicialmente foi analisado o efeito citotóxico dos compostos a serem estudados na concentração máxima de 100µM sobre células K562 ( $1 \times 10^5$  células/poço), incubadas por 24h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, a viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio). O método do MTT baseia-se na capacidade das desidrogenases mitocondriais de clivar o anel tetrazólico (cor amarela) do MTT e formar um precipitado formazan (cor roxa). Desse modo, a viabilidade celular e a formação de formazan relacionam-se de forma diretamente proporcional. (MOSMANN, 1983).

O MTT (5 mg/mL em PBS, Sigma-Aldrich®) foi adicionado às placas de cultivo após 24h da incubação das células com 100µM de cada composto, e, depois incubado novamente

por 3 horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Terminado o período das 3 horas, o meio de cultura foi removido e o precipitado formado foi diluído em 100 µL de solução de álcool isopropílico/HCL 0,04 N, depois as placas foram centrifugadas a 264 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi movido para outra placa para realizar a leitura em espectrofotômetro (Microplate reader MB-580®) no comprimento de onda 540 nm.

Para avaliar as curvas de concentração e tempo resposta, as células K562 foram incubadas em tempos de 24h, 48h e 72h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e nas concentrações de 1µM, 5µM, 10µM, 25µM, 50 µM e 100 µM. A quantidade de células utilizadas variou em relação ao tempo de incubação. Foram utilizadas 1 x 10<sup>5</sup> células/poço para 24 horas de incubação, 5 x 10<sup>4</sup> células/poço para 48 horas e 2,5 x 10<sup>4</sup> células/poço para 72 horas, em 200 µL de meio de cultura. Cada experimento foi realizado em triplicada e repetido por três vezes, pelo menos, de forma independente. Considerou-se 100% de viabilidade a densidade óptica do grupo controle, e a concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) foi obtida pela regressão não linear das curvas de concentração e tempo-resposta utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5.0®.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO ESCOLHIDO SOBRE CÉLULAS DE FIBROBLASTO HUMANO (HS-5)

Com a intenção de elucidar a citotoxicidade do composto escolhido em células não neoplásicas, utilizou-se células de linhagem de fibroblasto humano (HS-5).

A realização do experimento se deu através do plaqueamento das células HS-5 (1,0x10<sup>4</sup> células/poço) incubadas com concentrações crescentes do composto (10, 25, 50, 100, 150 e 200 µM) por 24h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, a viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio). O método do MTT baseia-se na capacidade das desidrogenases mitocondriais de clivar o anel tetrazólico (cor amarela) do MTT e formar um precipitado formazan (cor roxa). Desse modo, a viabilidade celular e a formação de formazan relacionam-se de forma diretamente proporcional. (MOSMANN, 1983).

O MTT (5 mg/mL em PBS, Sigma-Aldrich®) foi adicionado às placas de cultivo após 24h da incubação das células com diferentes concentrações do composto, e, depois incubado novamente por 3 horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Terminado o período das 3 horas, o meio de cultura foi removido e o precipitado formado foi diluído em 100 µL de solução de álcool isopropílico/HCL 0,04 N, depois as placas foram centrifugadas a 264 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi movido para outra placa para realizar a leitura em espectrofotômetro (Microplate reader MB-580®) no comprimento de onda 540 nm.

Cada experimento foi realizado em triplicada e repetido por três vezes, pelo menos, de forma independente. Considerou-se 100% de viabilidade a densidade óptica do grupo controle, e a concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) foi obtida pela regressão não linear das curvas de concentração e tempo-resposta utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5.0®.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO DSH64 SOBRE CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO (SP)

A fim de analisar o potencial hemolítico do composto escolhido, foram coletadas amostras de SP de indivíduos considerados saudáveis (pessoas que não apresentavam nenhum processo infeccioso, inflamatório ou alérgico e que sem doenças crônicas) e não fumantes que assinaram previamente à coleta o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme o Comitê de Ética de Pesquisa em Seres humanos da UFSC (CLAE n°: 80430317.0.0000.0121) (Anexo A). As amostras foram coletadas por punção venosa e processadas imediatamente após a coleta.

##### 4.6.1 Teste de hemólise

O teste de hemólise teve como objetivo avaliar a capacidade do composto em provocar a lise das membranas eritrocitárias, e conseqüentemente, a perda da integridade da membrana e o extravasamento do conteúdo celular.

A coleta de amostras de SP foi realizada em tubos contendo o anticoagulante citrato de sódio e processadas imediatamente após a punção. Primeiramente, os tubos foram centrifugados a 264 x g por 10 min e o plasma (sobrenadante) foi descartado. O *pellet* de hemácias foi lavado por três vezes com salina (NaCl 0,9%) e por fim suspenso em NaCl 0,9% com a finalidade de se obter uma dispersão de estoque de eritrócitos. Realizou-se também a preparação do 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 diluídas em salina (50 µl de dispersão de eritrócitos com adição de 950 µl de salina), foram incubadas em diferentes concentrações de DSH64 (múltiplos da CI<sub>50</sub>). Posteriormente, 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. Por fim o sobrenadante foi retirado e transferido para uma placa de 96 poços em triplicata, e a absorbância foi lida em espectrofotômetro (HEALES -MB580®). 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):

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

Onde: DOt, densidade óptica da amostra teste; DOcn, densidade óptica do controle negativo; DOcp, densidade óptica do controle positivo.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO DSH64 SOBRE O CICLO CELULAR DE CÉLULAS K562

Para avaliar o efeito da imidazopiridina DSH64 nas diferentes fases do ciclo celular das células K562, utilizou-se o kit comercial PI/RNase Solution (Immunostep®). Essa metodologia fundamenta-se na coloração dos ácidos nucleicos pelo 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 K562 ( $5 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com a imidazopiridina DSH64 na sua CI50 pelo período de 24 horas em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Células K562 sem tratamento foram utilizadas como controle negativo, a fim de caracterizar o 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®).



#### 4.8 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA APOPTOSE CAUSADA PELO COMPOSTO DSH64

Para investigar se o composto DSH64 causava morte celular por apoptose nas células K562, foram utilizadas as seguintes 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 detecção 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.

##### **4.8.1 Avaliação por microscopia de fluorescência das alterações morfológicas em células coradas com BE e LA**

A fim de avaliar a morte celular por apoptose utilizou-se a microscopia de fluorescência com BE e LA. Este método propicia que seja analisada a morfologia das células por microscopia de fluorescência, assim é possível observar as células quando estão em processo de apoptose e/ou necrose.

As células viáveis que apresentam membrana plasmática íntegra são permeadas pelo corante LA, que interage com o DNA celular e emite coloração verde ao microscópio de fluorescência. O corante BE, por sua vez, 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 essa análise, as células K562 ( $1 \times 10^6$ ) que foram incubadas com a  $CI_{50}$  do composto DSH64 por 24h em estufa úmida com 5% de  $CO_2$  a  $37^\circ C$ . Após esse período, as células foram lavadas com PBS, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi suspenso com 40  $\mu L$  de uma solução com BE (5  $\mu g/mL$ ) e LA (10  $\mu g/mL$ ) na proporção de 1:1. Para realização da leitura em microscópio de fluorescência, 25  $\mu L$  foram transferidos para uma placa de vidro que foi recoberta por uma lamínula. Após esse procedimento as lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-FLA®), na objetiva de 40x. As células foram observadas em pelo menos dez campos diferentes e fotografadas. Uma curva com as mesmas concentrações do composto (1 - 100  $\mu M$ ) com o diluente (DMSO) foi realizada para excluir a interferência do diluente nos resultados. O controle negativo foi realizado com

células sem nenhum tratamento e os experimentos foram realizados pelo menos três vezes de forma independente.

#### 4.8.2 Avaliação da exposição dos resíduos de fosfatidilserina pelo método da Anexina-V por CF

No processo de apoptose, os resíduos de fosfatidilserina são externalizados na membrana citoplasmática da célula, os quais têm afinidade pela anexina-V, que pode estar ligada a um fluorocromo, e, dessa forma, serem detectados por citometria de fluxo (KOOPMAN et al., 1994). Para realização dos ensaios, as células K562 ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com a  $CI_{50}$  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  $\mu$ 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  $\mu$ L, onde foram adicionados 5  $\mu$ L de anexina-V conjugada a FITC (BD Pharmingen™). As amostras foram incubadas por 30 minutos na ausência de luz em temperatura ambiente. Foram adquiridos 50.000 eventos para cada amostra 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®)

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DO COMPROMETIMENTO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi_M$ )

Para a avaliação do efeito do composto DSH64 sobre  $\Delta\Psi_M$  de células K562, utilizou-se o kit MitoView 633 (Biotium®). Esse kit é constituído por um corante fluorescente que apresenta a capacidade de corar as mitocôndrias de células viáveis, pois consegue permear a membrana celular e se acumular na membrana mitocondrial. Assim a fluorescência produzida pelo corante é proporcional à integridade da membrana mitocondrial, visto que o corante não tem a capacidade de acumular-se em membranas mitocondriais que perderam seu potencial.

Para essa avaliação, as células K562 ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com a imidazopiridina DSH64 na sua  $CI_{50}$  de 24 h pelo período de 24 h, em estufa úmida a 37°C com 5 % de  $CO_2$ . O controle negativo foi preparado com células sem tratamento para caracterização

dos parâmetros a serem analisados no citômetro de fluxo. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, submetidas à centrifugação a 264 x g por 5 min, e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados sobre o sedimento celular 300 µL da solução de Mito View 633 diluído 1:10.000, de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente na ausência da luz. Ao fim do período de incubação, as células foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 400 µL de PBS. Foram adquiridos 50.000 eventos 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®) os doublets foram retirados utilizando-se as características de forward scatter (FSC) (altura x área).

#### 4.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE (KI-67, BCL-2, BAX, AIF, FASR, CASPASE - 3 ATIVADA E SURVIVINA).

O efeito do composto DSH64 sobre diversas proteínas envolvidas na apoptose e proliferação celular foi analisado por citometria de fluxo. Para todos os experimentos, as células K562 ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com o composto DSH64 na sua CI50 de 24 h, em estufa úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> pelo tempo de 24h. O controle negativo foi preparado com células sem tratamento para caracterização dos parâmetros a serem analisados no citômetro de fluxo. Para as proteínas intracelulares (Ki-67, Bcl-2, Bax, AIF, caspase-3 ativada, survivina) utilizou-se um kit de permeabilização celular FIX&PERM® (Nordic-MUBio®) e para o FasR, uma proteína de membrana, utilizou-se a técnica de marcação direta.

Portanto, para a marcação das proteínas intracelulares e após o tempo de incubação. As células foram transferidas para tubos de plásticos e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspensionado por 4 mL de PBS, centrifugou-se novamente as células por 5 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi novamente descartado, e ao *pellet* formado adicionou-se 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 1500 rpm por 5 min. Depois, o sobrenadante foi descartado, e ao *pellet* foram adicionados 100 µL do reagente B (reagente de permeabilização celular) juntamente com o volume correspondente do anticorpo

de interesse e as células foram incubadas novamente por 15 minutos. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min e suspensas com 4 mL de PBS, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300 µL de PBS para aquisição das células no citômetro de fluxo.

Para a marcação direta da proteína FasR, após o período de incubação das células com o composto, as células foram lavadas uma vez com PBS e ressuspensas em 100 µL de PBS. Ao sedimento celular foi acrescentado o volume adequado do anticorpo específico para detecção da proteína investigada. As células foram incubadas por 15 min em temperatura ambiente e na ausência da luz. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min com 2 mL de PBS, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com 300 µL de PBS para a análise no citômetro de fluxo. Para todas as proteínas, foram adquiridos 50.000 eventos 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®) e os *doublets* foram retirados utilizando-se as características de forward scatter (FSC) (altura x área).

#### 4.11 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 (DAINA; 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, o composto DSH64 também foi avaliado 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).

#### 4.12 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 K562 ( $1 \times 10^5$  células/ poço) foram incubadas com o composto na  $CI_{50}$  DSH64 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  $\mu$ L 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 em 300  $\mu$ 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)

#### 4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram exibidos pela média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Todos os experimentos foram realizados, no mínimo, em triplicata de maneira independente entre si. Para todas as análises, foi adotado um nível de confiança de 95%. Para os testes de citotoxicidade, foi utilizado análise de variância (ANOVA) two way seguida de teste post-hoc de Bonferroni. Para avaliação do efeito do composto sobre a expressão dos resíduos de fosfatidilserina e caspase ativada, foi utilizado o teste t de Student não pareado, o qual comparou cada grupo de tratamento ao grupo controle. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5.



## 5 RESULTADOS

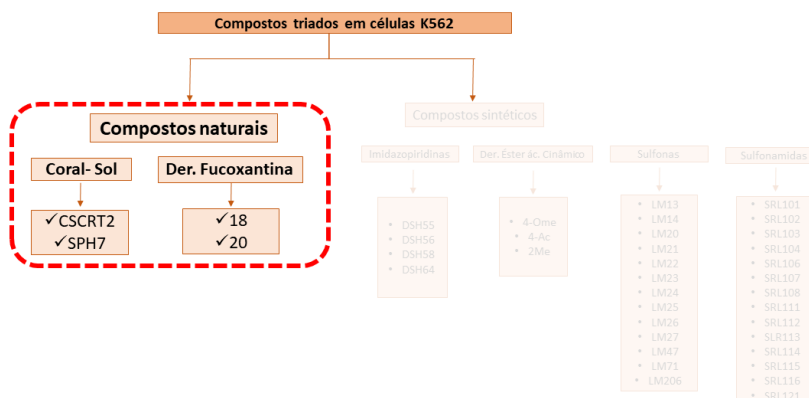
### 5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DE COMPOSTOS NATURAIS E SINTÉTICOS SOBRE LINHAGEM DE CÉLULAS DE LMA (K562)

Para melhor apresentação dos resultados obtidos na triagem de citotoxicidade dos compostos, serão apresentados primeiramente a citotoxicidade dos compostos de origem natural e, posteriormente, a dos compostos sintéticos

#### 5.1.1 Triagem de citotoxicidade de compostos de origem natural em células K562

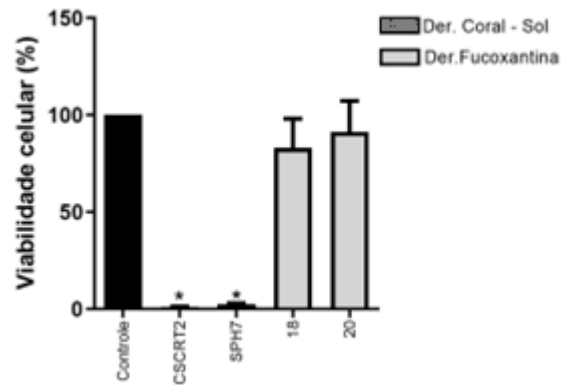
Primeiramente foram analisados os efeitos citotóxicos de quatro compostos de origem natural sobre células K562 (Figura 7). Os compostos CSCRT2 e SPH7, que são derivados indólicos, foram isolados a partir do Coral Sol. Já os compostos denominados 18 e 20, foram isolados da Fucoxantina. Como é possível observar na Figura 8 os compostos CSCRT2 e SPH7 apresentaram redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) da viabilidade celular na concentração de 100  $\mu\text{M}$  quando comparados com o controle, e, por isso foram selecionados para dar continuidade aos experimentos. No entanto, os compostos que foram sintetizados a partir da fucoxantina não demonstraram redução da viabilidade celular em células K562 (EID; ALTHUBITI; ABDALLAH; WINK; EL-READI, 2020; XIAO; ZHAO; FANG; CAO; XING; LI; HOU; JI; SONG, 2020).

Figura 10. Fluxograma dos compostos naturais triados em células K562.



Circulados em vermelho os compostos de origem natural, cujos efeitos citotóxicos foram triados em células K562 na concentração de 100 $\mu\text{M}$  por 24h. Fonte: A AUTORA

Figura 11. Avaliação da citotoxicidade de compostos naturais derivados indólicos e derivados da fucoxantina sobre células de LMA (K562)



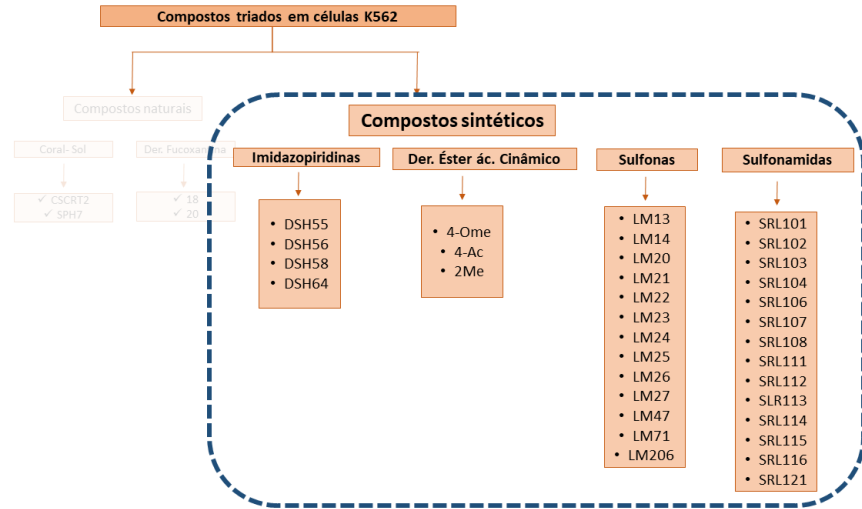
As células K562 ( $5 \times 10^4$  células/poço) foram incubadas com os compostos naturais (derivados indólicos e derivados da fucoxantina) na concentração de  $100 \mu\text{M}$  por 24 h e a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \*Diferença significativa em relação ao grupo controle (células sem tratamento),  $p \leq 0,05$ . ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonforreni. Fonte: A AUTORA

### 5.1.2 Triagem de citotoxicidade de compostos sintéticos em células K562

Além dos compostos naturais, neste trabalho também foram avaliados os efeitos citotóxicos de 34 compostos sintéticos (três derivados do ácido cinâmico, 14 sulfonamidas, cinco imidazopiridinas e 13 sulfonas) demonstrados na Figura 9.



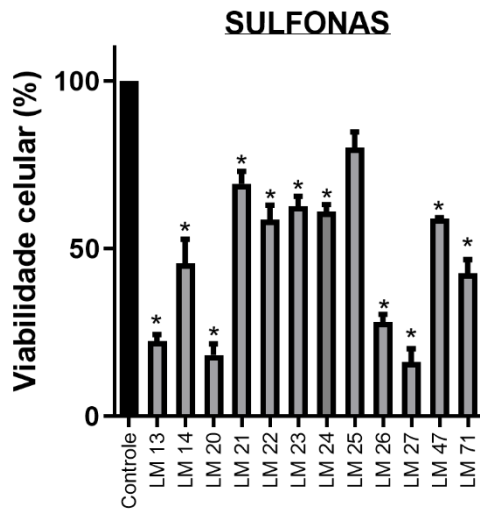
Figura 12. Fluxograma dos compostos triados em células K562.



Em destaque, todos os compostos sintéticos cujos efeitos citotóxicos foram triados na concentração de 100 µM em células K562, separados conforme suas respectivas classes químicas. Fonte: A AUTORA.

Como pode ser observado nas Figuras 10, 11 e 12 os compostos derivados do ácido cinâmico 4-OMe e 2Me, as imidazopiridinas e as sulfonas de número LM20 e LM27 foram os compostos que mais reduziram a viabilidade das células K562 na concentração de 100 µM quando comparado com o controle e por esse motivo foram selecionados para dar continuidade aos experimentos.

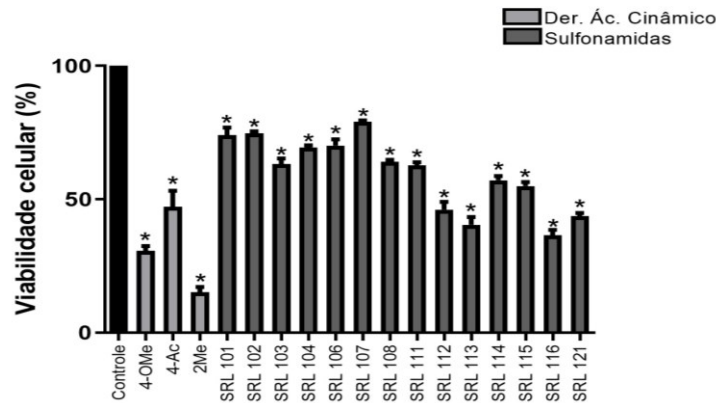
Figura 13. Avaliação da citotoxicidade de sulfonas sintéticas sobre células de linhagem de LMA (K562)



As células K562 (5 x 10<sup>4</sup> células/poço) foram incubadas com os compostos sintéticos pertencentes à classe das sulfonas na concentração de 100 µM por 24 h e a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Os

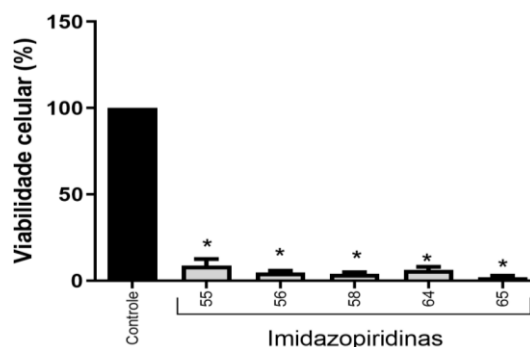
resultados expressam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \*Diferença significativa em relação ao grupo controle (células sem tratamento),  $p \leq 0,05$ . ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni. Fonte: A AUTORA

Figura 14. Avaliação da citotoxicidade de compostos sintéticos derivados do éster cinâmico e sulfonamidas sobre células de linhagem de LMA (K562)



As células K562 ( $5 \times 10^4$  células/poço) foram incubadas com os compostos sintéticos derivados do éster cinâmico e sulfonamidas 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 bonferroi. Fonte: A AUTORA.

Figura 15. Avaliação da citotoxicidade de imidazopiridinas sintéticas sobre células de linhagem de LMA (K562).

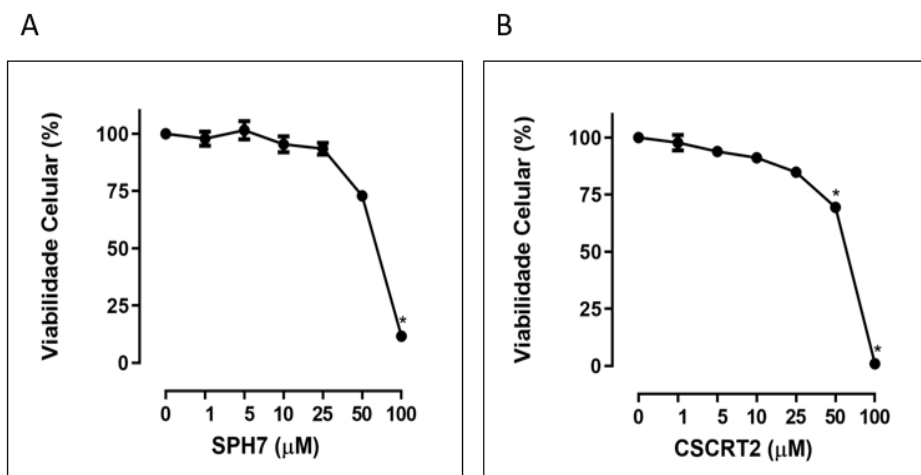


As células K562 ( $5 \times 10^4$  células/poço) foram incubadas com os compostos sintéticos pertencentes a classe química imidazopiridinas na concentração de  $100 \mu\text{M}$  por 24 h e a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \* Diferença significativa em relação ao grupo controle (células sem tratamento),  $p \leq 0,05$ . ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de bonferroi. Fonte: A AUTORA.

## 5.2 DETERMINAÇÃO DA $CI_{50}$ DOS COMPOSTOS NATURAIS DERIVADOS DO CORAL SOL

Com o propósito de elucidar a  $CI_{50}$  dos compostos que demonstraram maior citotoxicidade na triagem com 100  $\mu\text{M}$ , realizou-se uma curva com diferentes concentrações (1, 5, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) dos compostos selecionados. Para isso, avaliou-se a viabilidade pelo método do MTT com um período de 24h de incubação com os compostos. As Figuras 13A e 13B mostram as curvas da concentração-resposta da viabilidade das células da K562 com os compostos testados. A Tabela 1 mostra o valor da  $CI_{50}$  de cada composto com seu respectivo desvio padrão. Por demonstrarem valores altos de  $CI_{50}$ , os compostos naturais não foram escolhidos para dar continuidade aos experimentos.

Figura 16. Avaliação do efeito citotóxico dos compostos derivados do Coral Sol, SPH7 e CSCRT2 sobre células K562



As células K562 ( $5 \times 10^4$  células/poço) foram incubadas com os compostos naturais SPH7 e CSCRT2 em diferentes concentrações (1,5,10,25,50,100 µM) por 24 h e a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. O painel A demonstra a curva concentração resposta do composto SPH7. O painel B demonstra a curva concentração resposta do composto CSCRT2. Fonte: A AUTORA

Tabela 1 -  $CI_{50}$  dos compostos naturais SPH7 e CSCRT2

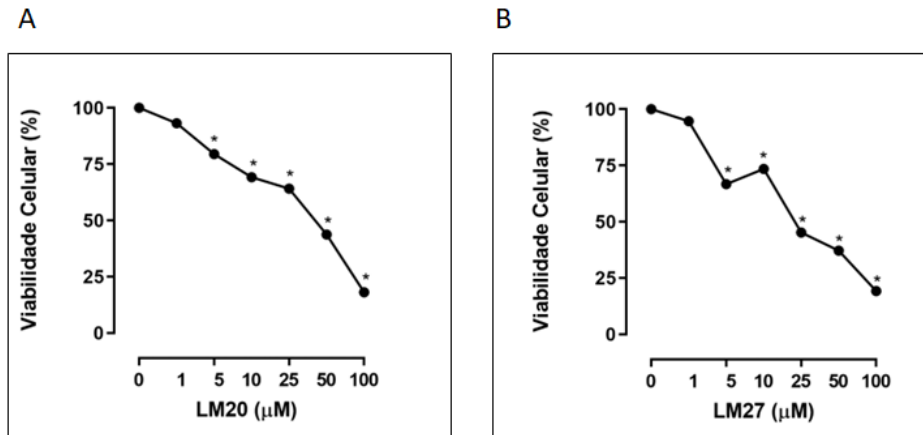
Composto	$CI_{50}$
SPH7	$75,33 \pm 4,55 \mu\text{M}$
CSCRT2	$56,96 \pm 4,34 \mu\text{M}$

Fonte: A AUTORA

### 5.3 DETERMINAÇÃO DA $CI_{50}$ DOS COMPOSTOS SINTÉTICOS SELECIONADOS

Para os compostos sintéticos selecionados (sulfonas LM20 e LM27, derivados do ácido cinâmico 4-OMe, 2Me e imidazopiridinas) também foram realizadas as curvas de concentração-resposta. O objetivo foi determinar a  $CI_{50}$  de cada composto. Para isso, as células K562 foram incubadas com os compostos em diferentes concentrações (1, 5, 10, 25, 50, 100 µM) por 24h e a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Como é possível observar na Figura 14 as sulfonas selecionadas apresentaram  $CI_{50}$  inferior aos demais compostos (Tabela 2) e por esse motivo foi escolhida para dar continuidade aos experimentos.

Figura 17. Avaliação do efeito citotóxico de duas sulfonas LM20 e LM27 sobre células K562.



As células K562 ( $5 \times 10^4$  células/poço) foram incubadas com as sulfonas sintéticas LM20 e LM27 em diferentes concentrações (1,5,10,25,50,100  $\mu\text{M}$ ) por 24 h e a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. Na Figura X, Painel A demonstra a curva concentração-resposta do composto LM20 e no Painel B a curva concentração-resposta do composto LM7. Fonte: A AUTORA

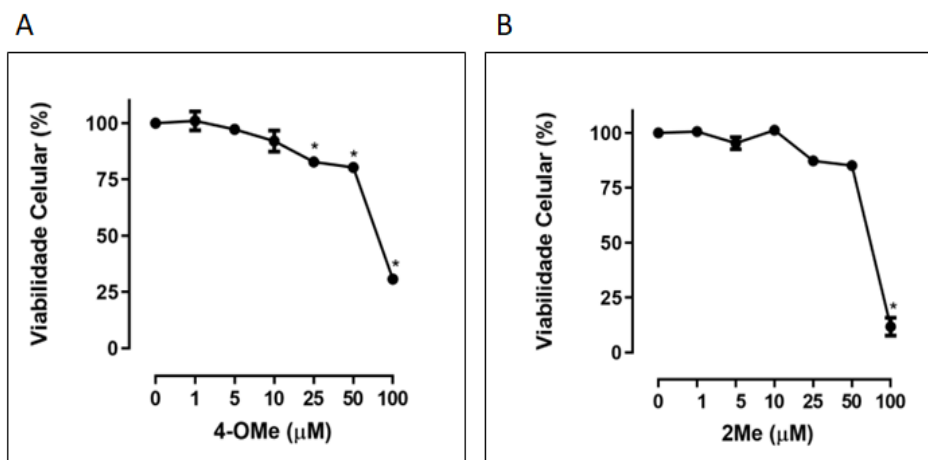
Tabela 2 -  $\text{CI}_{50}$  dos compostos sintéticos sulfonas LM20 e LM27.

Compostos	$\text{CI}_{50}$
LM20	$31,60 \pm 1,39 \mu\text{M}$
LM7	$21,94 \pm 1,21 \mu\text{M}$

Fonte: A AUTORA

A Figura 15 apresenta os resultados dos derivados do ácido cinâmico, 4-OMe e 2Me, que apresentaram altas concentrações de  $\text{CI}_{50}$  (Tabela 3), por isso não foram escolhidos para a continuidade dos experimentos.

Figura 18. Avaliação do efeito citotóxico dos derivados do éster do ácido cinâmico sobre células K562.



As células K562 ( $5 \times 10^4$  células/poço) foram incubadas com os compostos sintéticos derivados do éster cinâmico 4-OMe e 2Me em diferentes concentrações (1,5,10,25,50,100  $\mu\text{M}$ ) por 24 h e a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. O painel A demonstra a curva concentração resposta do composto 4-OMe. O painel B demonstra a curva concentração resposta do composto 2Me. Fonte: A AUTORA

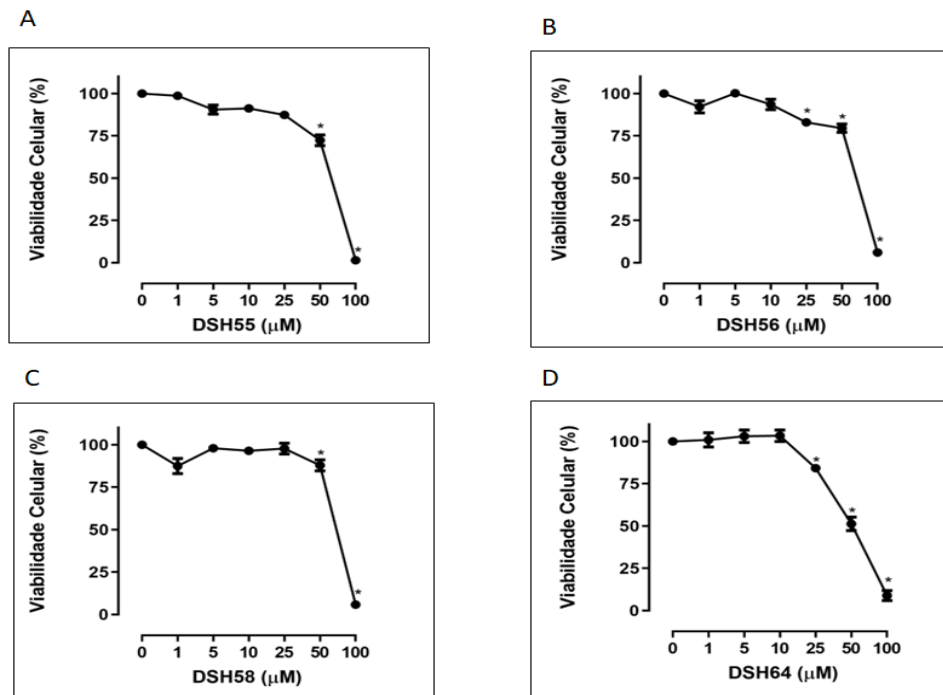
Tabela 3 -  $CI_{50}$  dos compostos sintéticos 4-OMe e 2Me.

Compostos	$CI_{50}$
4-OMe	$93,24 \pm 3,17 \mu\text{M}$
2Me	$83,36 \pm 0,51 \mu\text{M}$

Fonte: A AUTORA

A Figura 16 apresenta as curvas de concentração-resposta das imidazopiridinas DSH55, DSH56, DSH58, DSH64, e, como pode ser observado na Tabela 4, o composto DSH64 apresentou a menor  $CI_{50}$  dentre as outras imidazopiridinas e, portanto, foi escolhido para a continuidade dos experimentos.

Figura 19. Avaliação do efeito citotóxico de imidazopiridinas sintéticas sobre células K562.



As células K562 ( $5 \times 10^4$  células/poço) foram incubadas com imidazopiridinas sintéticas DSH55, DSH56, DSH58 e DSH64 em diferentes concentrações (1,5,10,25,50,100 μM) por 24 h e a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. O painel A demonstra a curva concentração resposta do composto DSH55. O painel B demonstra a curva concentração resposta do composto DSH56. O painel C demonstra a curva concentração resposta do composto DSH58. O painel D demonstra a curva concentração resposta do composto DSH64. Fonte: A AUTORA

Tabela 4 -  $CI_{50}$  das imidazopiridinas sintéticas

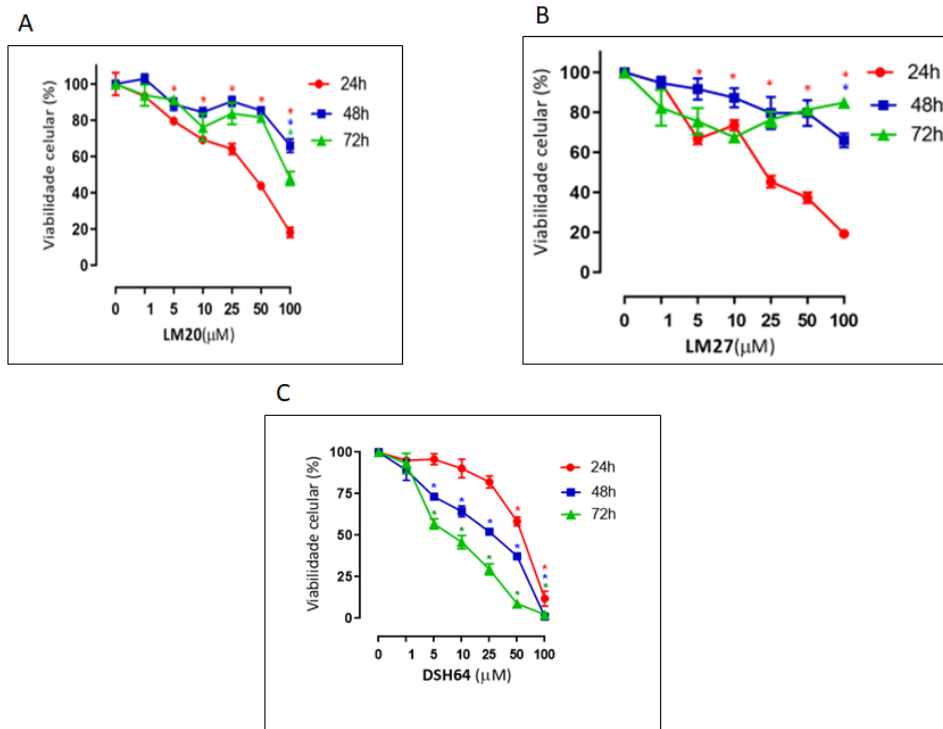
Compostos	$CI_{50}$
DSH55	$59,94 \pm 3,37 \mu\text{M}$
DSH56	$68,18 \pm 2,35 \mu\text{M}$
DSH58	$85,59 \pm 2,29 \mu\text{M}$
DSH64	$51,88 \pm 2,85 \mu\text{M}$

Fonte: A AUTORA

#### 5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DOS COMPOSTOS DSH64, LM20 E LM27 SOBRE CÉLULAS K562 EM TEMPOS DE 24H, 48H E 72H

A fim de verificar como os compostos DSH64, LM20 e LM27, que apresentaram as menores  $CI_{50}$ , afetavam a viabilidade celular de células K562 em relação ao tempo, foi realizada curvas concentração-resposta em três tempos diferentes: 24h, 48h e 72h. É possível observar na Figura 17, Painéis A e B que as sulfonas nos tempos de 48h e 72h obtiveram  $CI_{50}$  maior do que a  $CI_{50}$  de 24h. As Tabelas 5 e 6 mostram as  $CI_{50}$  das sulfonas LM20 e LM27 bem como o valor de cada  $CI_{50}$  para cada tempo correspondente. Na Figura 17 Painel C, pode-se observar que o composto DSH64 diminuiu a viabilidade das células K562 de forma significativa ( $p \leq 0,05$ ) a partir da concentração de 5  $\mu\text{M}$  nos tempos de 48 e 72h, e no tempo de 24h a redução da viabilidade celular ocorreu a partir da concentração de 50  $\mu\text{M}$ , e, por esse motivo, o composto DSH64 foi o escolhido para prosseguir com o restante dos experimentos. A Tabela 7 mostra as  $CI_{50}$  do composto DSH64 para cada tempo.

Figura 20. Avaliação do efeito citotóxico em três tempos diferentes dos compostos LM20, LM27 e DSH64.



As células K562 ( $5 \times 10^4$  células/poço, 24 h,  $25 \times 10^3$  células/poço, 48 h e  $12,5 \times 10^3$  células/poço, 72 h) foram incubadas com o composto DSH64, sulfona LM20 e LM27 nas concentrações de 1, 5, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ . 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 5 -  $CI_{50}$  da sulfona sintética LM20 nos tempos de 24,48 e 72h.

<b>Tempo</b>	<b><math>CI_{50}</math></b>
24h	$31,60 \pm 1,39 \mu\text{M}$
48h	$CI_{50} > 100 \mu\text{M}$
72h	$CI_{50} > 100 \mu\text{M}$

Fonte: A AUTORA

Tabela 6 -  $CI_{50}$  da sulfona sintética LM27 nos tempos de 24,48 e 72h. células K562.

<b>Tempo</b>	<b><math>CI_{50}</math> K562</b>
24h	$21,94 \pm 1,21 \mu\text{M}$
48h	$CI_{50} > 100 \mu\text{M}$
72h	$CI_{50} > 100 \mu\text{M}$

Fonte: A AUTORA

Tabela 7 -  $CI_{50}$  do composto DSH64 nos tempos de 24,48 e 72h. células K562.

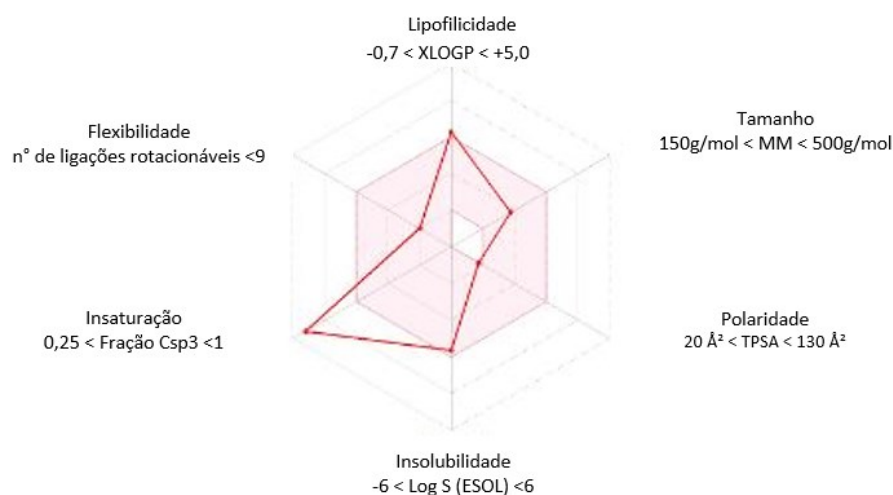
<b>Tempo</b>	<b><math>CI_{50}</math> DSH64</b>
24h	$51,88 \pm 2,85 \mu\text{M}$
48h	$19,68 \pm 0,81 \mu\text{M}$
72h	$7,88 \pm 0,28 \mu\text{M}$

Fonte: A AUTORA

## 5.5 PREDIÇÃO *IN SILICO* DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DA IMIDAZOPIRIDINA DSH64

Utilizando-se a ferramenta de predição *in silico* SWISSADME foi possível avaliar a biodisponibilidade oral do composto DSH64 como representado na Figura 18, assim como as propriedades físico-químicas, as características farmacocinéticas e as características farmacológicas, todas representadas na Quadro 2. A predição dos possíveis alvos moleculares do composto DSH64 está representada na Figura 19.

Figura 21 - Predição *in silico* da biodisponibilidade oral do composto DSH64.



A área marcada em rosa corresponde ao espaço físico-químico ideal para uma boa disponibilidade oral e a linha em vermelho representa os parâmetros apresentados pela imidazopiridina DSH64. Fonte: Adaptado de SWISSADME, 2022.

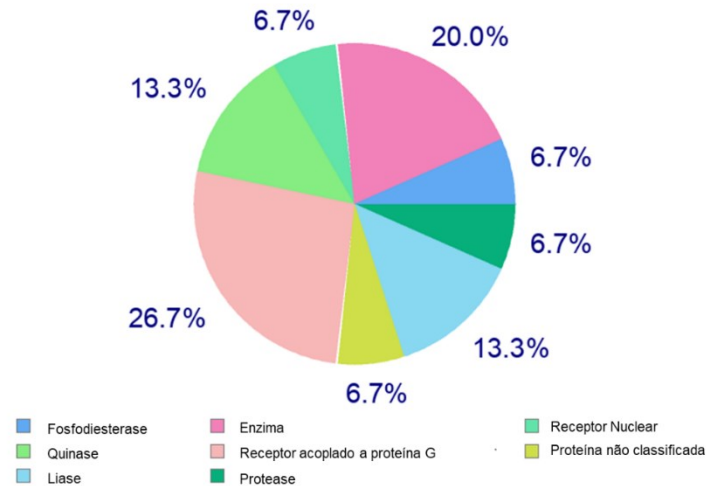
Quadro 1 - Predição *in silico* das características físico-químicas do composto DSH64

<b>Propriedades físico-químicas</b>	
	<b>DSH64</b>
<b>Fórmula</b>	$\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{FN}_2$
Peso Molecular	302,32 g / mol
Número de Átomos Pesados	23
Fração Csp3	0,05
Número de ligações rotacionáveis	3
Aceptores de ligações de hidrogênio	2
Doadores de ligações de hidrogênio	0
Refratividade Molar	90,04

Área de superfície polar topológica (TPSA)	17,30 Å <sup>2</sup>
Log P o/w	3,49
Log P o/w (XLOGP3)	5,48
Solubilidade em água	Solubilidade Moderada
<b>Características farmacocinéticas</b>	
Absorção gastrointestinal	Alta
Permeação da barreira hematoencefálica	Sim
Substrato da glicoproteína-P (P-gp)	Não
Inibidor da CYP1A2	Sim
Inibidor da CYP2C19	Sim
Inibidor da CYP2C9	Não
Inibidor da CYP2D6	Sim
Inibidor da CYP3A4	Não
<b>Características farmacológicas</b>	
Lipinski	Sim (nenhuma violação)
Ghose	Sim
Veber	Sim
Egan	Sim
Muegge	Não
Escore de biodisponibilidade	0,55

Fonte: Adaptado de SWISSADME, 2022.

Figura 22. Predição *in silico* dos possíveis alvos moleculares da imidazopiridina DSH64.

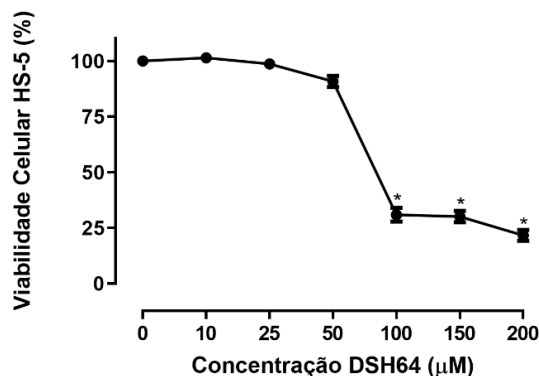


Fonte: SWISSTARGETPREDICTION, 2022.

## 5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DA IMIDAZOPIRIDINA DSH64 EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE FIBROBLASTOS HUMANOS (HS-5)

A viabilidade celular de células HS-5 após tratamento com o composto DSH64 também foi avaliada. Como pode ser observado na Figura 20 o composto DSH64 é citotóxico para as células HS-5 somente a partir de 100  $\mu\text{M}$ , com valor da  $\text{CI}_{50}$  de  $98,33 \pm 3,95 \mu\text{M}$ .

Figura 23. Avaliação do efeito citotóxico da imidazopiridina DSH64 sobre células HS-5

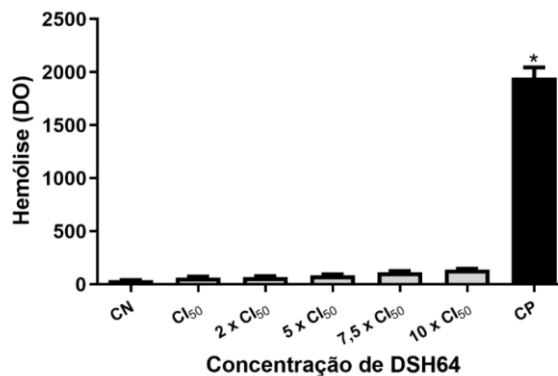


As células HS-5 ( $1 \times 10^4$  células/poço) foram incubadas com a imidazopiridina DSH64 em diferentes concentrações (10, 25, 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{M}$ ) por 24 h e a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. Fonte: A AUTORA

## 5.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO HEMOLITICO INDUZIDO PELA IMIDAZOPIRIDINA DSH64 EM ERITROCITOS HUMANOS

O efeito do composto DSH64 sobre eritrócitos humanos isolados de SP de indivíduos considerados saudáveis foi avaliado nas concentrações de 51,88  $\mu\text{M}$  ( $\text{CI}_{50}$ ), 103,76  $\mu\text{M}$  ( $2 \times \text{CI}_{50}$ ), 259,4  $\mu\text{M}$  ( $3 \times \text{CI}_{50}$ ), 389,1  $\mu\text{M}$  ( $7,5 \times \text{CI}_{50}$ ) e 518,8  $\mu\text{M}$  ( $10 \times \text{CI}_{50}$ ). Os valores de hemólise encontrados em cada concentração podem ser observados na Tabela 8 e estão demonstrados na Figura 21. Os resultados mostram que o composto DSH64 não causa hemólise significativa quando comparado ao controle negativo, mesmo em concentrações dez vezes maiores que sua  $\text{CI}_{50}$ .

Figura 24. Efeito do composto DSH64 em eritrócitos de SP.



Hemólise 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 conforme o 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,  $p \leq 0,05$ , ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Tukey  
Nota: CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo. Fonte: A AUTORA

Tabela 8 - Taxa de hemólise (%) causada pelo composto DSH64 em diferentes concentrações

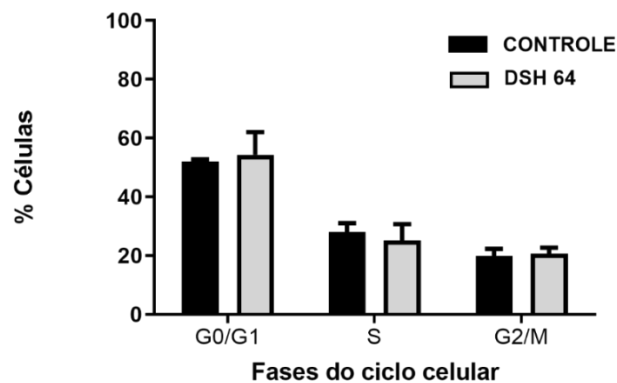
	$\text{CI}_{50}$	$2 \times \text{CI}_{50}$	$5 \times \text{CI}_{50}$	$7,5 \times \text{CI}_{50}$	$10 \times \text{CI}_{50}$
DSH64	$1,50 \pm 0,55\%$	$1,57 \pm 0,83\%$	$2,45 \pm 0,59\%$	$4,07 \pm 0,69\%$	$5,36 \pm 0,09\%$

Fonte: A AUTORA.

## 5.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA IMIDAZOPIRIDINA DSH64 NO CICLO CELULAR DE CÉLULAS K562

O efeito do DSH64 no seguimento do ciclo celular das células K562 foi avaliado após tratamento de 24h na sua  $CI_{50}$ . Na Tabela 9 apresentam-se a porcentagem de cada fase do ciclo celular, assim como estão representadas na Figura 22 Quando as células tratadas com o DSH64 são comparadas com o controle (células sem tratamento), é possível observar que o composto não alterou significativamente a quantidade de células em cada fase do ciclo celular das células K562.

Figura 25. Efeito da imidazopiridina DSH64 na evolução do ciclo celular em células K562.



As células K562 (1 x 10<sup>6</sup> células/poço) foram incubadas por 24h com o DSH64 na sua  $CI_{50}$  de 24h e os grupos controle correspondem às células sem tratamento. As fases estão representadas por G0/G1, S e G2/M. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo software InFinicity versão 2.0 (Cytognos®). Os gráficos representam a média ± EPM de pelo menos três experimentos independentes. Fonte: A AUTORA.

Tabela 9 - Efeito da imidazopiridina DSH64 na evolução do ciclo celular em células K562.

	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
Controle	52,1 ± 0,65	28,0 ± 3,05	19,9 ± 2,40
DSH64	54,3 ± 1,70	25,1 ± 1,22	20,6 ± 2,10

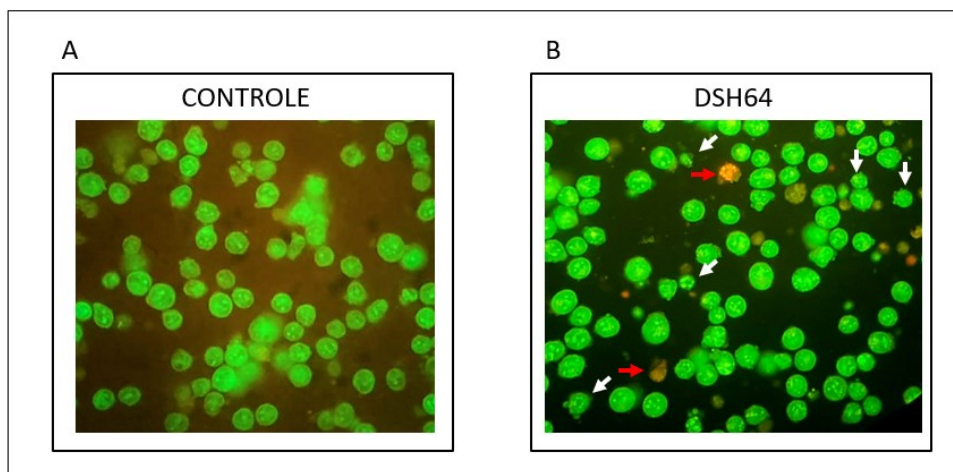
Fonte: A AUTORA

## 5.9 ANÁLISE DOS EFEITOS DO COMPOSTO DSH64 SOBRE A APOPTOSE

### 5.9.1 Análise das alterações morfológicas por microscopia de fluorescência com BE e LA

A fim de avaliar se o composto DSH64 induz morte celular por apoptose em células K562, utilizou-se, inicialmente, a avaliação da morfologia por microscopia de fluorescência após coloração com BE e LA. As células K562 foram incubadas pelo período de 24h com DSH64 em sua  $CI_{50}$  e como é possível observar na Figura 23 as células K562 apresentaram alterações morfológicas características de apoptose inicial, como a integridade da membrana, condensação da cromatina e formação de prolongamentos na membrana plasmática, denominados “*blebs*” (células coradas em verde com LA). Ainda é possível observar células coradas em laranja, com BE, nas quais há perda da integridade celular, o que é característica de apoptose tardia.

Figura 26. Alterações morfológicas induzidas pela imidazopiridina DSH64 em células K562.

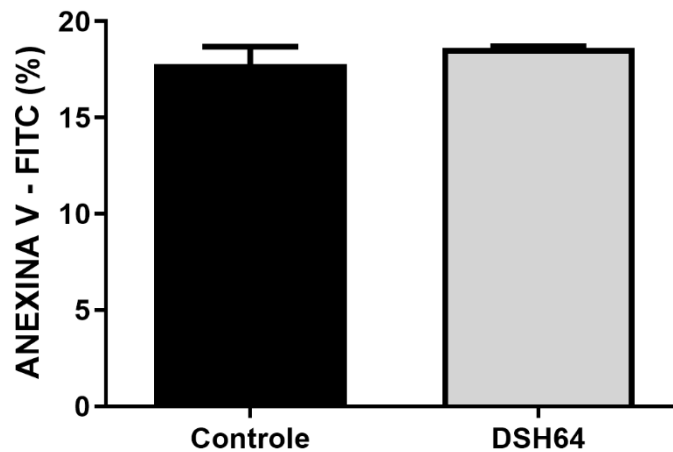


As células K562 ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com o composto na sua  $CI_{50}$  de 24 h e coradas com uma solução 1:1 de BE/LA. Painel A: grupo controle, células sem tratamento; Painel B: células que receberam tratamento com o composto DSH64. As células foram observadas em microscópio de fluorescência na magnitude de 400 x, e os campos representativos foram fotografados, pelo menos, dez campos diferentes. As setas brancas indicam células em apoptose inicial e as setas na cor vermelha representam células em apoptose tardia/necrose. Os resultados foram obtidos em pelo menos dois experimentos independentes. Escala: 10  $\mu$ m. Fonte: A AUTORA

### 5.9.2 Efeito da Imidazopiridina DSH64 sobre a exposição dos resíduos de fosfatidilserina nas células K562

Como pode ser observado na Figura 24, não houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) na expressão de fosfatidilserina entre o controle (células K562 sem tratamento) e as células tratadas com o composto DSH64 por 24 h.

Figura 27. Efeito da Imidazopiridina DSH64 sobre a exposição dos resíduos de fosfatidilserina nas células K562



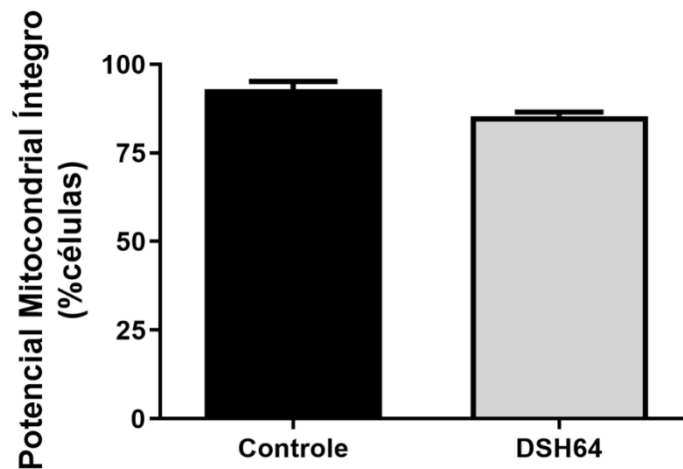
As células K562 ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com o composto DSH64 na sua  $CI_{50}$  de 24h (grupo tratado) e incubadas na ausência do composto (grupo controle) pelo tempo de 24h. A porcentagem da expressão dos resíduos de fosfatidilserina foram determinadas pela marcação com anexina-V conjugada a FITC e avaliadas por CF. As análises foram feitas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e foram avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®). O gráfico apresenta 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.

### 5.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA IMIDAZOPIRIDINA DSH64 NO POTENCIAL DE MEMBRANA ( $\Delta\Psi_M$ )

Para investigar se o efeito citotóxico da imidazopiridina DSH64 envolvia danos às mitocôndrias, avaliou-se o  $\Delta\Psi_M$  nas células K562 após tratamento com o composto. Como é possível observar na Figura 25, o composto DSH64 não reduziu significativamente o potencial mitocondrial de células K562 após o tratamento com o composto na sua  $CI_{50}$  de 24 h.



Figura 28. Efeito da imidazopiridina DSH64 no  $\Delta\Psi_m$  de células K562



As células K562 ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com o composto DSH64 na sua  $CI_{50}$  de 24h (grupo tratado) e na ausência do mesmo (grupo controle) pelo tempo de 24h. A porcentagem da expressão do potencial mitocondrial foi determinada por meio de CF após a marcação com mitoview® conjugada PE. As análises foram feitas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e foram avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®). O gráfico apresenta 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.

### 5.11 AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADOS AO MECANISMO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE.

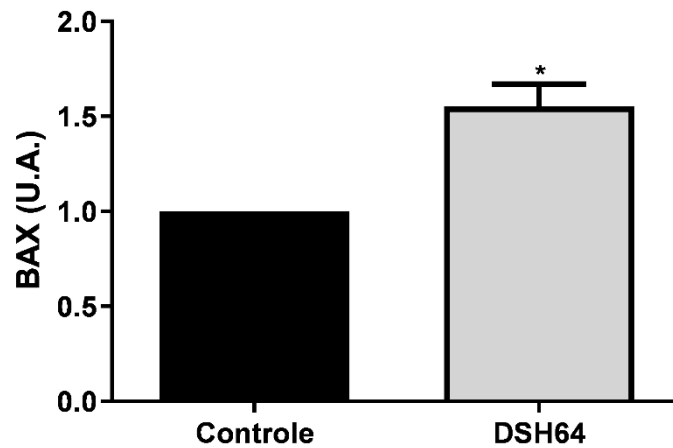
Com o objetivo de compreender os resultados obtidos anteriormente que sugeriam morte celular por apoptose, avaliou-se a expressão de proteínas relacionadas com apoptose intrínseca e/ou extrínseca. Em todas as análises as células K562 foram incubadas com a  $CI_{50}$  de 24h do composto DSH64 por um período de 24h.

#### 5.11.1 Investigação do efeito da imidazopiridina DSH64 sobre proteínas da BCL-2 (BCL-2 e BAX).

Como pode ser observado na Figura 26, o composto DSH64 aumentou significativamente a expressão da proteína pró-apoptótica BAX em  $1,54 \pm 0,10$  vezes após 24h do tratamento com a concentração da  $CI_{50}$  de 24h do composto em comparação ao grupo controle (células sem tratamento). Entretanto, em relação a proteína antiapoptótica Bcl-2 não houve diferença significativa entre as células K562 do controle (células sem tratamento; Figura

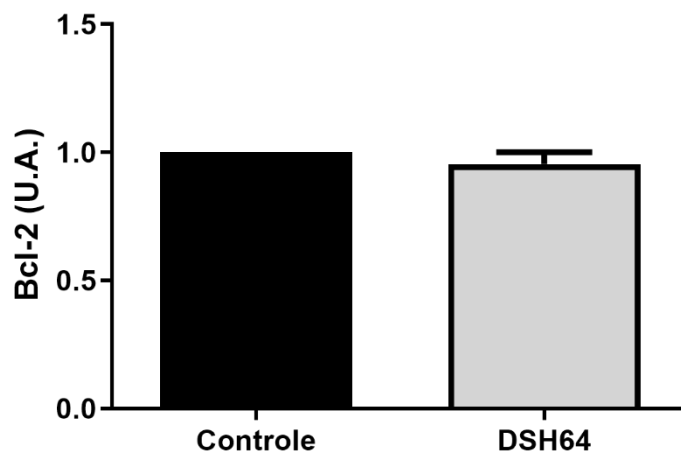
27). Apesar disso, a relação BAX/Bcl-2 nas células tratadas com o DSH64 foi de 1,55, o que configura um estímulo pró-apoptótico.

Figura 29. Efeito da imidazopiridina DSH64 na proteína próapoptótica BAX nas células K562.



As células K562 ( $1 \times 10^6$  células/poço), foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença da imidazopiridina DSH64 na sua  $CI_{50}$  de 24 h. IFM foi determinada por CF após a marcação com o anti-Bax conjugado a PercP. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0. O gráfico representa a média  $\pm$  EPM de, pelo menos, dois experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, teste t de Student. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias. Fonte: A AUTORA

Figura 30. Efeito da imidazopiridina DSH64 sobre a proteína antiapoptótica Bcl-2 nas células K562.



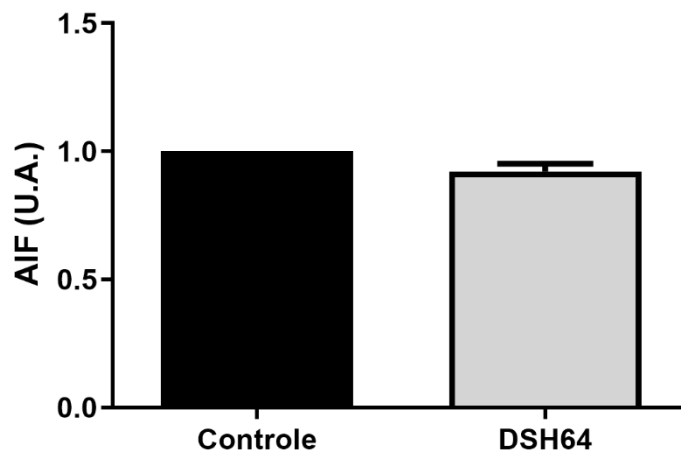
As células K562 ( $1 \times 10^6$  células/poço), foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença da imidazopiridina DSH64 na sua  $CI_{50}$  de 24 h. IFM foi determinada por CF após a marcação com o anticorpo anti-

Bcl-2 conjugado a FITC. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0. O gráfico representa a média  $\pm$  EPM de, pelo menos, dois experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, teste t de Student. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias. Fonte: A AUTORA

### 5.11.2 Investigação do efeito do composto DSH64 sobre o fator indutor de apoptose (AIF)

Como é possível observar na Figura 28, após incubação das células K562 com o composto DSH64 não houve diferença significativa na expressão de AIF quando comparado com células K562 sem tratamento (grupo controle).

Figura 31. Efeito do composto DSH64 sobre a proteína AIF em células K562



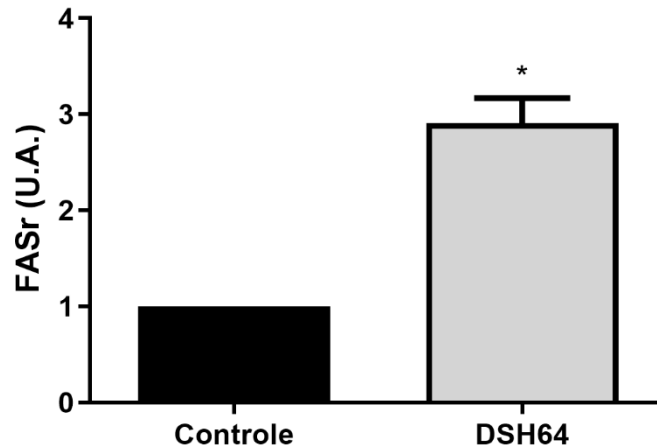
As células K562 ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença da imidazopiridina DSH64 na sua  $CI_{50}$  de 24 h. A IFM foi determinada por CF após a marcação com o anticorpo anti-AIF conjugado a FITC. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD 63 FACSCanto™ II e avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0. O gráfico representa a média  $\pm$  EPM de pelo menos dois experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, teste t de Student. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias. Fonte: A AUTORA

### 5.11.3 Investigação do efeito da imidazopiridina DSH64 sobre o receptor Fas.

A fim de avaliar sobre o efeito do composto DSH64 na apoptose extrínseca, o seu efeito na expressão do receptor foi investigado. Como mostra a Figura 29, houve um aumento

significativo de  $2,91 \pm 0,26$  vezes na expressão dessa proteína nas células tratadas com o composto DSH64, quando comparado com as células controle (sem tratamento).

Figura 32. Efeito da imidazopiridina DSH64 na expressão do receptor Fas nas células K562.

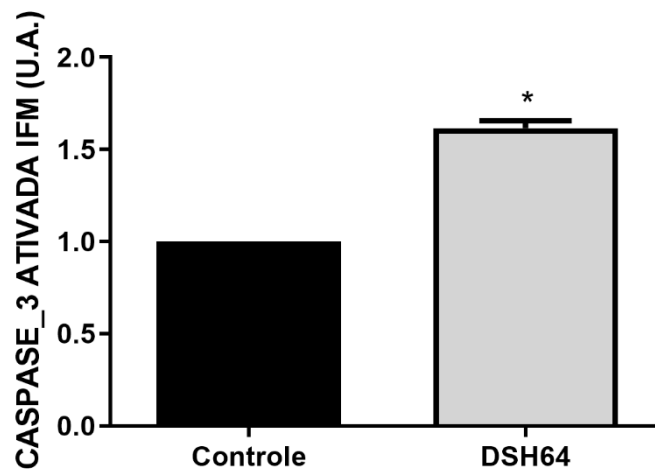


As células K562 ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença da imidazopiridina DSH64 na sua  $CI_{50}$  de 24 h. A IFM foi determinada por CF após a marcação com o anticorpo anti-FasR conjugado a PE. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD 63 FACSCanto™ II e avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0. O gráfico representa a média  $\pm$  EPM de pelo menos dois experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, teste t de Student. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias. Fonte: A AUTORA

#### 5.11.4 Avaliação do efeito da imidazopiridina DSH64 sobre a caspase-3 ativada

Como é possível observar na Figura 30, após tratamento e incubação das células K562 com o composto DSH64, na sua  $CI_{50}$  de 24h, houve um aumento da expressão de caspase-3 ativada de  $1,61 \pm 0,40$  vezes quando comparadas ao controle (células sem tratamento).

Figura 33. Efeito da imidazopiridina DSH64 sobre a caspase-3 ativada em células K562.

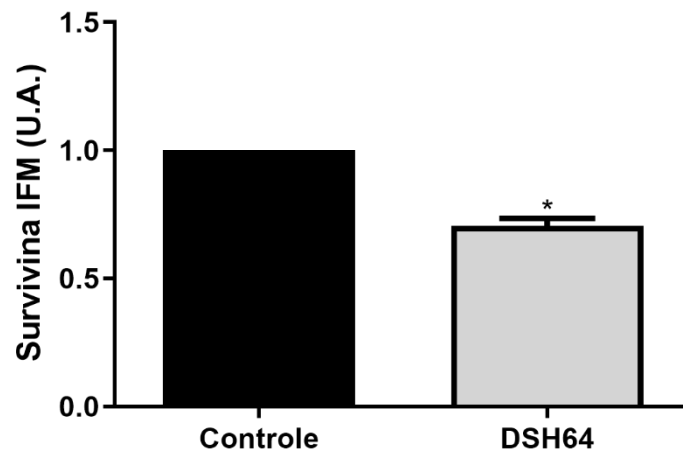


As células K562 ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com o composto DSH64 na sua CI50 de 24h (grupo tratado) e incubadas na ausência do composto (grupo controle) pelo tempo de 24h. O IFM foi determinado por meio de CF após a marcação com o anticorpo anti-caspase-3 conjugado a V450. As análises foram feitas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e foram avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®). O gráfico apresenta 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. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias. Fonte: A AUTORA

### 5.11.5 Investigação do efeito da imidazopiridina DSH64 sobre a proteína antiapoptótica survivina

Como é possível observar na Figura 31, após 24h do tratamento das células K562 com DSH64, houve uma diminuição de  $0,70 \pm 0,03$  vezes da expressão da proteína antiapoptótica survivina quando comparado a células sem tratamento (grupo controle).

Figura 34. Efeito da imidazopiridina DSH64 sobre a expressão da proteína survivina.

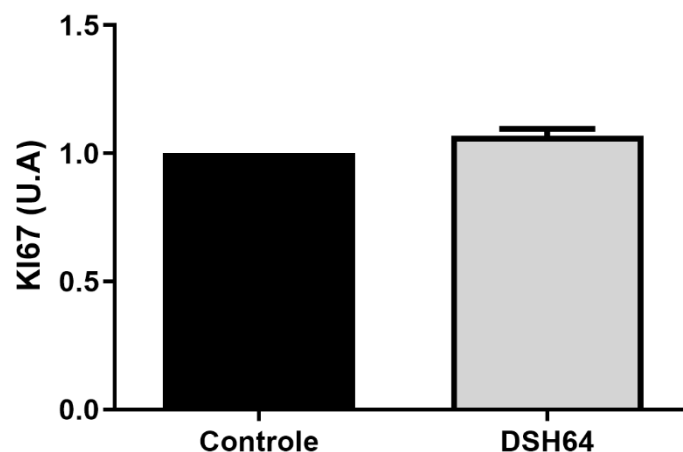


As células K562 ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença da imidazopiridina DSH64 na sua  $CI_{50}$  de 24 h. A IFM foi determinada por CF após a marcação com o anticorpo anti-survivina conjugado a PE. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0. O gráfico representa a média  $\pm$  EPM de pelo menos dois experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, teste t de Student. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias. Fonte: A AUTORA

#### 5.12 EFEITO DA IMIDAZOPIRIDINA DSH64 SOBRE A PROTEÍNA KI-67.

Como é possível observar na Figura 32, não houve diferença significativa na expressão de KI-67 nas células K562, quando comparado o grupo tratado com o composto DSH64 e o grupo sem tratamento (grupo controle).

Figura 35. Efeito da imidazopiridina DSH64 sobre a proteína KI-67.

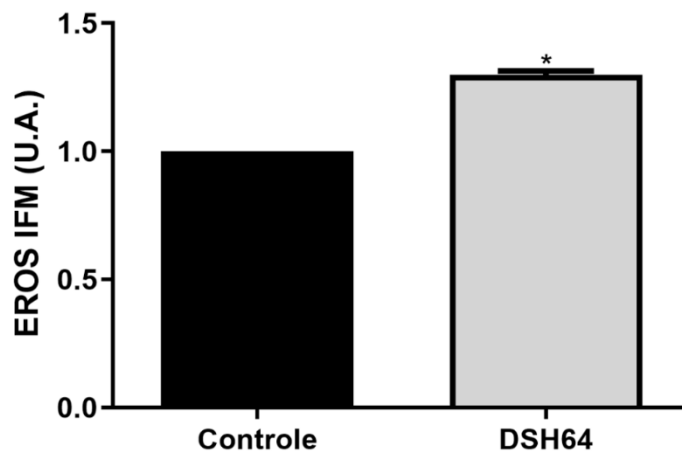


As células K562 ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença da imidazopiridina DSH64 na sua  $CI_{50}$  de 24 h. A IFM foi determinada por CF após a marcação com o anticorpo anti-KI67 conjugado a FITC. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0. O gráfico representa a média  $\pm$  EPM de pelo menos dois experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, teste t de Student. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias. Fonte: A AUTORA

### 5.13 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA IMIDAZOPIRIDINA DSH64 NA PRODUÇÃO DE EROS EM CÉLULAS K562.

Como é possível observar na Figura 33, a incubação das células K562 com o composto aumentou significativamente em  $1,30 \pm 0,02$  a formação de EROs nessas células, quando comparado com o grupo controle (células sem tratamento).

Figura 36. Efeito da imidazopiridina DSH64 na produção de EROs em células K562.



As células K562 ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença da imidazopiridina DSH64 na sua  $CI_{50}$  de 24 h. A IFM foi determinada por CF após a marcação com o corante *MitoSox*. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo software Infinicyt versão 2.0. O gráfico representa a média  $\pm$  EPM de pelo menos dois experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, teste t de Student. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias. Fonte: A AUTORA

## 6 DISCUSSÃO

Diante da complexidade dos mecanismos que envolvem a LMA e da heterogeneidade de seus subtipos, a fisiopatologia dessa neoplasia foi alvo de inúmeras pesquisas nos últimos 20 anos. Esses estudos visaram elucidar as vias de formação da leucemia, e, conseqüentemente, melhorar as terapias a serem utilizadas. O cenário farmacológico da LMA começou a mudar a partir de 2017, quando a FDA incorporou novos fármacos para o tratamento da LMA. Esses fármacos possuem alvos específicos para a manutenção da sobrevivência das células leucêmicas ou que contribuem para o surgimento de novas células neoplásicas. Essa incorporação forneceu bons resultados para a terapia da LMA, no entanto, as taxas de recidiva da doença e sobrevida global continuam desfavoráveis (CARTER et al., 2020; LIU, 2021; SAXENA & KONOPLEVA, 2021).

A resistência primária e secundária a essas novas terapias ainda é um problema enfrentado pelos pacientes com LMA, e os mecanismos de resistência aos tratamentos ainda seguem sendo alvo de estudo. Além disso, a organização clonal complexa das células leucêmicas ainda é um fator chave na variabilidade da efetividade terapêutica e no desenvolvimento da resistência secundária em muitos pacientes. Outra questão importante é em relação às células tronco leucêmicas, que apesar de raras e quiescentes, são geralmente quimiorresistentes, e, assim podem ser um potente reservatório da doença, o que leva a recaída do paciente após a terapia. Diante da complexidade dessa neoplasia, o uso de poliquimioterapia com a combinação de diversos fármacos para o tratamento da LMA é fortemente recomendado, a fim de atingir diferentes vias relacionadas com a leucemogênese, e assim se obter um tratamento mais efetivo (CARTER et al., 2020; SAXENA & KONOPLEVA, 2021; SHORT et al., 2020). Dessa forma, este trabalho tem como principal finalidade avaliar o efeito citotóxico de compostos naturais e sintéticos que possam direta ou indiretamente contribuir para a terapia efetiva da LMA.

Neste trabalho, inicialmente foi avaliada a citotoxicidade de 38 compostos sobre células de LMA K562, dos quais quatro compostos eram de origem natural e 34 compostos de origem sintética. Dentro dessa gama de novos compostos, os que demonstraram menores  $CI_{50}$  foram os compostos sintéticos derivados do éster do ácido cinâmico, as imidazopiridinas e duas sulfonas (LM20 e LM27). Assim, foram



selecionados para dar continuidade ao trabalho. Ao realizar as curvas de concentração e tempo-resposta, os derivados do ácido cinâmico 4-Ome e 2Me apresentaram  $CI_{50}$  superiores, cerca de duas vezes mais, às  $CI_{50}$  de toda a série das imidazopiridinas e das sulfonas LM20 e LM27. Já as sulfonas, apesar de apresentarem uma baixa  $CI_{50}$  em 24h, nos períodos de 48 e 72h esses valores foram mais elevados, o que inviabiliza a continuidade do estudo com esses compostos. Isso pode indicar algum mecanismo de resistência das células K562 aos compostos, como a presença de bombas de efluxo, ou ainda a possibilidade dos compostos se degradarem no meio de cultura utilizado (RPMI). A imidazopiridina DSH64 apresentou destaque entre os demais compostos avaliados, por apresentar maior citotoxicidade, dependente do tempo e concentração nos períodos de 24h, 48h e 72h.

No que tange às imidazopiridinas, sabe-se que o sistema heterocíclico dessa classe química atua como um farmacofóforo chave na identificação e otimização de estruturas *leads*, e, dessa forma, ampliam o emprego na química medicinal (KHATUN et al., 2021b). Essa classe já foi descrita na literatura como antidiabético (JIANG et al., 2020), antituberculares, antimicrobianos (DEVI; JANA; SINGH, 2018), antivirais (PAPADAKIS et al., 2020), anti-inflamatórios, agentes quimioterápicos e agentes em doenças psiquiátricas e neurodegenerativas (VANDA; ZAJDEL; SOURAL, 2019)(KHATUN et al., 2021b).

Acerca do potencial antineoplásico das imidazopiridinas, pesquisas recentes revelaram diversas atividades antitumorais exercidas por essa classe química. Patel et al., 2022 relataram que as imidazopiridinas são capazes de alterar a conformação estrutural da piruvato quinase M2 (PKM2) em células de câncer de mama MCF-7. Essa enzima é super expressa em neoplasias pois regula uma das etapas da via da glicose nas células, portanto, a inibição de PKM2 reduz a proliferação tumoral. Já Sunkari et al., 2019 descreveram o efeito apoptótico de que uma série de imidazopiridinas sobre células de câncer de pulmão pela parada do ciclo celular nessas células.

Assim, como é de suma importância elucidar os mecanismos citotóxicos pelo qual o composto estudado atua e quais seus alvos moleculares, foi imprescindível determinar suas características farmacocinéticas para assegurar que o fármaco chegará ao seu alvo terapêutico dentro da concentração desejada. Portanto, como já comprovado, analisar os parâmetros de estimativa ADME já nas fases iniciais da pesquisa por novos compostos diminui significativamente os contratempos relacionados à farmacocinética

em fases clínicas. Para tal análise, os modelos computacionais são de grande valia nesse avanço (DAHLIN; INGLESE; WALTERS, 2015; HAY et al., 2014).

Posto isso, os primeiros parâmetros avaliados no Quadro 1 informam a respeito das propriedades físico-químicas do DSH64, e, a partir delas, foi gerado o radar de biodisponibilidade oral (Figura 18). Como pode ser observado nessa Figura, a imidazopiridina DSH64 permaneceu dentro da maioria dos parâmetros analisados para uma boa disponibilidade oral, e, apesar de violar uma das regras de Muegge, estabelecidas para predizer a biodisponibilidade oral de compostos, o mesmo ainda se enquadra nas regras de Lipinski, Ghose, Veber e Egan, o que sugere que o DSH64 pode vir a ser empregado via oral (EGAN; MERZ; BALDWIN, 2000; GHOSE; VISWANADHAN; WENDOLOSKI, 1999; LIPINSKI et al., 1997; MUEGGE; HEALD, BRITELLI, 2001; VEBER et al., 1997)

A predição *in silico* apresentou dados sobre a solubilidade em água do DSH64 como moderadamente solúvel. Este parâmetro é importante pois além de demonstrar mais um ponto positivo para administração por via oral, a solubilidade em água é necessária para que haja facilidade na manipulação e formulação do composto (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Outra questão importante é que para medicações de uso parenteral, a solubilidade em água do fármaco se faz necessária para que a substância ativa seja distribuída de forma eficiente em menor dosagem (SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012).

Na predição, também foi avaliado se o composto DSH64 era substrato da P-gp, uma bomba de efluxo. Essa proteína pode ser superexpressa em células neoplásicas, e, dessa forma, efluir os fármacos para fora da célula, o que implica na redução intracelular do fármaco, e, assim a concentração do composto se torna abaixo do limiar terapêutico, o que gera a resistência de amplo espectro de quimioterápicos. Essa é uma das principais causas de resistência medicamentosa (AKAMINE; YASUI-FURUKORI; UNO, 2019; AMAWI et al., 2019; CHOI; YU, 2014). Como pode ser observado no Quadro 1, a imidazopiridina DSH64 não aparenta ser um substrato da P-gp, o que confere ao composto uma possível vantagem em relação a resistência a fármacos por células neoplásicas.

A metabolização dos fármacos é um aspecto a ser levado em consideração. Diante disso, avaliou-se a possibilidade do DSH64 inibir algumas das principais isoenzimas da família CYP450, responsáveis pela metabolização de xenobióticos. Essas enzimas realizam a biotransformação de produtos químicos para que sejam excretados com facilidade pelo organismo (MANIKANDAN; NAGINI, 2018). Vale ressaltar que, os fármacos podem interagir com essas enzimas de maneira inibitória, isso pode causar interações medicamentosas que resultam na impossibilidade da excreção de outro medicamento que foi administrado concomitantemente ou diminuir a efetividade do mesmo. A inibição das enzimas da família CYP450 pode também elevar as concentrações plasmáticas de certos medicamentos e levar a citotoxicidade (MANIKANDAN; NAGINI, 2018; TORNIO; BACKMAN, 2018). A predição *in silico* indicou que o DSH64 pode atuar como inibidor das isoenzimas CYP1A2, CYP2C19 e CYP2D6. Portanto, é importante que seja evitado o uso conjunto do DSH64 com fármacos que são metabolizados por essas isoenzimas. O venetoclax, por exemplo, é metabolizado pela CYP3A4 (LIU et al., 2017), enzima que não é inibida pelo DSH64, o que permitiria a combinação desses fármacos.

Por fim, pelo uso da ferramenta *SwissTargetPrediction*, que sugere os possíveis alvos moleculares dos compostos de acordo com a comparação da sua estrutura 3D com outros compostos presentes na literatura, foi possível observar que o composto possui uma gama de possíveis alvos moleculares como receptores acoplados a proteína G e enzimas.

Ao considerar a busca por um novo composto quimioterápico, um dos principais requisitos esperados é que este seja citotóxico apenas para as células neoplásicas para que dessa forma os efeitos adversos sejam atenuados (KNEZEVIC; CLARKE, 2020; LIVSHITS; RAO; SMITH, 2014). Assim, após analisar a citotoxicidade do DSH64 para a linhagem celular K562, foi realizado o teste de citotoxicidade em linhagem de fibroblastos humanos, HS-5, no período de 24h. Como é possível observar na Figura 20, a  $CI_{50}$  do DSH64 em células HS-5 foi de  $98,33 \pm 3,95 \mu\text{M}$ , cerca de duas vezes maior que a  $CI_{50}$  de 24h observada em células K562. Esse resultado permite relacionar uma seletividade para células neoplásicas. Um estudo de SAYEED et al., 2018 também mostrou  $CI_{50}$  de imidazopiridinas maiores para células renais embrionárias (HEK293) do que para algumas linhagens celulares neoplásicas de tumores sólidos, como por

exemplo MDA-MB-231 (câncer de mama) e HCT116 (câncer de cólon) (SAYEED et al., 2018).

Outro ponto importante durante o processo de construção de um novo fármaco, é avaliar se tal composto lisa os eritrócitos humanos, visto que, a principal forma de administração de quimioterápicos é a via oral e/ou a via endovenosa. Para tal conhecimento, foi avaliado o potencial hemolítico do DSH64 pelo do teste de hemólise com hemácias de indivíduos clinicamente saudáveis. Como apresentado na Tabela 8 e na Figura 21, mesmo em concentrações 10 vezes maiores que a  $CI_{50}$  de 24h do DSH64, não houve lise eritrocitária significativa em relação ao controle positivo. Esse resultado sugere que essa imidazopiridina, se utilizada para o desenvolvimento de um fármaco, possa ser administrado de forma segura por via oral ou parenteral, pois são biocompatíveis com os eritrócitos humanos (PODSIEDLIK; MARKOWICZ-PIASECKA; SIKORA, 2020).

Uma forte característica das células neoplásicas é a velocidade com que se proliferam e sua capacidade de progressão ao longo das fases do ciclo celular, o que as confere replicação e manutenção (ABOU Zahr; BORTHAKUR, 2017b; CARTER et al., 2022). Por esse motivo, o ciclo celular é considerado um bom alvo terapêutico para impedir a proliferação neoplásica (MENON et al., 2019). Portanto, após a incubação com a  $CI_{50}$  de 24h do DSH64 avaliou-se o efeito do composto nas fases do ciclo celular bem como a expressão de KI-67, considerado um marcador de proliferação celular. Como é possível observar na Figura 22 e Tabela 9 não houve parada no ciclo celular após tratamento com DSH64. Não foram encontrados estudos na literatura de experimentos com K562 para corroborar este dado, porém vários estudos demonstraram parada no ciclo celular de linhagem celulares de tumores sólidos induzidos por imidazopiridinas (MARTÍNEZ-URBINA et al., 2010; SAYEED et al., 2017; SONG et al., 2014a). O DSH64 também não demonstrou diminuição significativa da proteína KI-67. Esse dado não está em concordância com Oliveira Silva, 2021 que obteve diminuição de KI-67 após tratamento com a imidazopiridina DSH65. É válido ressaltar que tal estudo apesar de utilizar uma imidazopiridina da mesma série do composto DSH64, utilizou células Daudi (Linfoma de Burkitt).

Assim como nas demais neoplasias malignas, as células leucêmicas de LMA têm como principal característica a evasão do processo de morte celular. Dessa forma,

os mecanismos de ação dos fármacos utilizados para o tratamento neoplásico visam reduzir a viabilidade das células neoplásicas pela ativação de inúmeras vias de sinalização que podem causar a morte celular. Embasados nesse conhecimento, uma das estratégias de morte celular por fármacos é pela ativação da apoptose, um mecanismo de morte celular regulada. A apoptose clássica é considerada como uma morte não imunogênica, e, assim, não gera um processo inflamatório que não atinge tecidos adjacentes. Esse mecanismo de morte celular não é uma estratégia específica à um tipo de neoplasia, posto que existe a possibilidade de aplicar o mesmo tratamento em diversos tipos de neoplásias (PFEFFER; SINGH, 2018). Especificamente na LMA, existem duas proteínas antiapoptóticas que são super expressas pelas células leucêmicas, a BCL-2 e a MCL1 (CZABOTAR et al., 2014). Diante disso, a inibição dessas proteínas parece ser eficiente no tratamento de leucemias, a exemplo disso, pode-se citar os bons resultados da Venetoclax, um inibidor de BCL-2, como uma nova proposta terapêutica contra a LMA (BALL; BORTHAKUR, 2020b; SAXENA; KONOPLEVA, 2020b). Valendo-se dessa informação, a primeira etapa para elucidar o mecanismo de ação do DSH64 foi avaliar o seu envolvimento na apoptose. Para tal, foi realizado duas metodologias distintas: a microscopia de fluorescência com BE/LA e o método da Anexina-V.

Como demonstrado na Figura 23, diferente do controle (células sem tratamento, Painel A) as células tratadas com o composto (Painel B) apresentam condensação da cromatina e formação de prolongamentos na membrana plasmática (*blebs*), as quais são alterações características de apoptose inicial. Ainda na mesma figura é possível observar células que perderam a integridade da membrana, coradas em laranja, que indica apoptose tardia. Esse resultado corrobora outro estudo realizado por Silva, 2021, em células Daudi com a imidazopiridina DSH65.

Durante o estágio inicial da apoptose, a membrana celular perde sua simetria, e, assim, há a externalização dos resíduos de fosfatidilserina que são reconhecidos por células fagocitárias que engolfam essas células em apoptose e as degradam em fagolissomas (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2018a). Após o tratamento com DSH64 em sua  $CI_{50}$  de 24h as células K562 não aumentaram significativamente a externalização de fosfatilserina em comparação com as células do grupo controle (sem tratamento). Esse dado não corrobora os outros resultados desse trabalho que indicam que o DSH64 induz morte celular por apoptose. É possível que a exposição de fosfatilserina seja um evento

observado mais tardiamente nessas células, e, por isso, não foi observado no tempo de 24h. Outros experimentos com um maior tempo de incubação podem auxiliar a averiguar esta informação. Além disso, para que haja a confirmação do envolvimento da apoptose, pode-se realizar a fragmentação do DNA.

Considerando os resultados obtidos, o outro passo do trabalho foi averiguar quais mecanismo apoptóticos, intrínsecos ou extrínsecos, estavam envolvidos nesse processo. A apoptose intrínseca ou mitocondrial é regida pelo desequilíbrio entre as concentrações de proteínas pró- e antiapoptóticas da família BCL-2. Entre as proteínas pró-apoptóticas pode-se citar as proteínas Bax, Bak, Bid, Puma e Noxa. Já as proteínas antiapoptóticas são as proteínas Bcl-2, Mcl-1, Bcl-x (KALE; OSTERLUND; ANDREWS, 2018; MOLDOVEANU et al., 2014). Diante do exposto, as células K562 foram tratadas na  $CI_{50}$  de 24h do composto DSH64 e após incubação pode-se observar, como visto na Figura 26, o aumento significativo de  $1,54 \pm 0,10$  vezes da proteína pró-apoptótica Bax em relação a célula K562 não tratadas com o composto. A Figura 27 mostra que após o tratamento com DSH64 não houve redução significativa da proteína antiapoptótica Bcl-2. Porém é muito importante ressaltar que a relação Bax/Bcl-2 nas células tratadas com DSH64 foi de 1,55, o que sugere um estímulo pro-apoptótico. Como citado anteriormente, o venetoclax, medicamento incorporado recentemente para o tratamento de LMA é um inibidor de Bcl-2 (GUO et al., 2020). O uso concomitante com um possível fármaco advindo do DSH64 pode se tornar interessante, visto que ambos agem em proteínas da via intrínseca da apoptose, mas modulam proteínas diferentes. De um lado o venetoclax que inibe Bcl-2 e do outro lado o DSH64 que aumenta Bax.

Um fator determinante para que ocorra a apoptose intrínseca é a formação de poros na membrana mitocondrial externa, a qual é regulada pelo  $\Delta\Psi_m$  no espaço entre as duas membranas que circundam a mitocôndria. Assim, quando ocorre dano ou permeabilização da membrana mitocondrial externa, há perda do  $\Delta\Psi_m$  o que ocasiona a liberação de componentes presentes no espaço intermembrana como AIF, citocromo-c e a proteína SMAC/Diablo. A liberação desses componentes contribuirá para a formação do apoptossoma e ativação de caspases efetoras (-3, -6, -7), o que leva a conclusão da apoptose (CZABOTAR et al., 2014; GALLUZZI et al., 2018; SONG et al., 2015).

Na sequência do estudo do mecanismo de ação citotóxica do DSH64 o  $\Delta\Psi_m$  também foi avaliado, e, como é possível observar na Figura 25, após a incubação do

composto, na  $CI_{50}$  de 24h, com as células K562 não houve redução significativa do  $\Delta\Psi_m$  nessas células quando comparadas ao controle (células sem tratamento). Existe a possibilidade de que as alterações no  $\Delta\Psi_m$  seja um evento que ocorra posteriormente as 24h, pois como visto anteriormente existe um estímulo pró-apoptótico conduzido pelo aumento de Bax, ou que a apoptose esteja ocorrendo por uma via independente a essa. No entanto, um novo experimento com mais tempo de incubação, do que o utilizado nesse trabalho, pode avaliar melhor essa possibilidade. Essa proposta se justifica, pois, estudos relataram diminuição significativa do  $\Delta\Psi_m$  quando tratados com imidazopiridina DSH65, pelo período de 24h, em células Daudi (Oliveira Silva, 2021), e de um derivado de imidazopiridina CHEQ-2, pelo período de 48h, em células MCF-7, HepG2 e HT-29 (SONG et al., 2014b).

Em paralelo, foi avaliado o envolvimento da proteína AIF e da caspase efetora, caspase-3. Após 24h de incubação com a  $CI_{50}$  de 24h de DSH64 pode-se observar na Figura 28 que não houve aumento significativo da proteína AIF após o tratamento com DSH64, quando comparado com o controle (células sem tratamento). Isso corrobora os dados anteriores, visto que o AIF é liberado após a perda do  $\Delta\Psi_m$ , não observado no presente estudo. Assim como o  $\Delta\Psi_m$  é possível que o aumento de AIF seja detectado somente em tempos maiores de incubação do que o usado nesse estudo (24h). Entretanto, foi observado um aumento significativo da caspase-3 nas células K562 tratadas com DSH64 em relação ao controle (células sem tratamento). A caspase-3 está envolvida na fase final do processo de apoptose, e, é ativada tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca.

Como visto anteriormente, a apoptose extrínseca é ativada mediante perturbações no meio externo a célula, essas perturbações são captadas via receptores de morte, localizados na superfície celular, como por exemplo o receptor Fas (FasR). Esse receptor após ativado se liga a um receptor TNF, e, assim, se inicia a apoptose extrínseca. Após a interação dos receptores citados anteriormente, os DD serão recrutados, e em conjunto com as caspases- 8 e -10 comporão o complexo DISC que sinalizará a apoptose. Após a formação desse complexo a caspase-8 será clivada, o que levará a ativação das capases efetoras -3 e -7, que por fim levará a morte celular por apoptose. Neste estudo, foi observado que o composto DSH64 causou aumento significativo de  $2,91 \pm 0,26$  vezes do receptor Fas em células K562 tratadas com DSH64,

na sua  $CI_{50}$  de 24h, em relação a células sem tratamento (Figura 29). Esse resultado sugere que o mecanismo de citotoxicidade do DSH64 envolve a apoptose extrínseca.

As proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) são proteínas que estão presente em células neoplásicas, e visam suprimir a apoptose. Um exemplo de IAP, é a proteína survivina que é super expressa em inúmeras neoplasias, incluindo a LMA, e, está associada a progressão da doença, curta sobrevivência, quimiorresistência e a um prognóstico desfavorável (ADNAN-AWAD et al., 2019; SUN et al., 2013). Como pode ser observado na Figura 31, houve uma redução significativa da expressão de survivina em células K562 tratadas com DSH64 de 0,7 vezes, em comparação com células K562 sem tratamento. Como mencionado acima, a survivina encontra-se superexpressa na LMA e a sua inibição pode diminuir a resistência ao tratamento.

Por fim, foi avaliada a formação de eROS em células tratadas com DSH64. O estresse oxidativo é gerado, basicamente, pelo desequilíbrio entre moléculas pró-oxidantes e antioxidante dentro das células, o que leva a produção de eROS. Sabe-se que o aumento de eROS opera positivamente às duas vias da apoptose (ADNAN-AWAD et al., 2019; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016; SINHA et al., 2013). Neste estudo, foi possível verificar o aumento significativo de  $1,30 \pm 0,02$  na produção de eROS em células K562 tratadas com o composto DSH64 em relação a células controle sem tratamento (Figura 33). Esse resultado corrobora com outros dados deste trabalho que sugerem a indução da apoptose pelo composto DSH64. Outras imidazopiridinas mostraram aumentar eROS em células de tumores sólidos (CHOTA; GEORGE; ABRAHAMSE, 2021; SUNKARI et al., 2019b).

Vale ressaltar que, mesmo que as imidazopiridinas e seus análogos estejam em recentes pesquisas para aplicabilidade de fármacos antineoplásicos, não foi encontrado na literatura nenhum estudo que evidenciasse a citotoxicidade de uma imidazopiridina em células de LMA. Os resultados apresentados demonstram que a imidazopiridina DSH64 é citotóxica para células de linhagem de LMA devido a sua interação com diversas vias de sinalização intracelular. Isso gera inúmeras possibilidades de combinação do composto com as terapias utilizadas atualmente, como os medicamentos utilizados no “regime 7+3”, pois esse esquema medicamentoso combina a citarabina, um análogo da pirimidina que se intercala ao DNA (FARUQI; TADI, 2022) e uma antraciclina, que também é capaz de se intercalar ao DNA (RIVANKAR, 2014). Assim, o mecanismo de ação desses dois fármacos impede com que a célula se prolifere via



parada do ciclo celular, mecanismo esse não visualizado no tratamento com DSH64. No entanto, a imidazopiridina DSH64 atua em proteínas que não são alvos citotóxicos da citarabina nem da daunorrubicina, como o FasR, que tem sua expressão aumentada com o uso da DSH64 mas não é afetado por esses medicamentos (PING; ZHONGWEN; JUAN, 2001). Além disso, estudos relatam que após tratadas com citarabina e daunorrubicina, as células K562 apresentam aumento da proteína survivina (QIAN DING et al., 2009), no entanto, demonstrou redução após a incubação com o DSH64. Esses resultados podem sugerir um possível efeito sinérgico entre o DSH64 e os fármacos atualmente utilizados na clínica para tratamento da LMA. Isso pode aumentar a eficácia do tratamento, pois os compostos atuam em vias diferentes, além disso, pode ser uma alternativa para contornar a resistência a fármacos, apresentada por muitos pacientes.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- Dentre todos os 38 compostos, naturais e sintéticos, estudados neste estudo, a imidazopiridina DSH64 foi a que demonstrou melhores efeitos citotóxicos em células K562.
- É possível afirmar que o composto DSH64 apresentou citotoxicidade em K562 concentração e tempo dependentes com  $CI_{50}$  de 24h de  $51,88 \pm 2,85 \mu\text{M}$ ,  $CI_{50}$  de 48h  $19,68 \pm 0,81 \mu\text{M}$  e  $CI_{50}$  de 72h de  $7,88 \pm 0,28 \mu\text{M}$ .
- O DSH64 foi cerca de 2 vezes mais citotóxico em células de LMA K562 do que em células de fibroblasto humano HS-5 e não causou hemólise mesmo em concentrações 10 vezes superiores a  $CI_{50}$  de 24h em linhagem K562.
- O composto DSH64 não causou bloqueio significativo nas fases do ciclo celular de células K562.
- A morte celular causada pela imidazopiridina DSH64 foi sugestiva de apoptose, visto que foi visualizado alterações morfológicas sugestivas de apoptose por microscopia de fluorescência apesar de não haver aumento da externalização de resíduos de fosfatidilserina.

- O composto DSH64 não reduziu significativamente o  $\Delta\psi_m$ , no entanto, houve aumento da expressão da proteína pró apoptótica Bax, da caspase -3 e do FasR, o que sugere o envolvimento da apoptose extrínseca.
- O DSH64 causou aumento da formação de EROs e diminuição significativa da proteína antiapoptótica survivina.

## REFERÊNCIAS

ABOU ZAHR, A.; BORTHAKUR, G. Emerging cell cycle inhibitors for acute myeloid leukemia. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 22, n. 2, p. 137–148, 3 abr. 2017a.

ABOU ZAHR, A.; BORTHAKUR, G. Emerging cell cycle inhibitors for acute myeloid leukemia. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 22, n. 2, p. 137–148, 3 abr. 2017b.

ADNAN-AWAD, S. et al. Prognostic Impact of WT-1 and Survivin Gene Expression in Acute Myeloid Leukemia Patients. **Clinical Laboratory**, v. 65, n. 04/2019, 2019.

AGGARWAL, V. et al. Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. 735, 13 nov. 2019.

BALL, S.; BORTHAKUR, G. Apoptosis targeted therapies in acute myeloid leukemia: an update. **Expert Review of Hematology**, v. 13, n. 12, p. 1373–1386, 1 dez. 2020a.

BALL, S.; BORTHAKUR, G. Apoptosis targeted therapies in acute myeloid leukemia: an update. **Expert Review of Hematology**, v. 13, n. 12, p. 1373–1386, 1 dez. 2020b.

BAZINET, A.; ASSOULINE, S. A review of FDA-approved acute myeloid leukemia therapies beyond ‘7 + 3’. **Expert Review of Hematology**, v. 14, n. 2, p. 185–197, 1 fev. 2021.

BEWERSDORF, J. P.; ABDEL-WAHAB, O. Translating recent advances in the pathogenesis of acute myeloid leukemia to the clinic. **Genes & Development**, v. 36, n. 5–6, p. 259–277, 1 mar. 2022.

BHATT, V. R. Personalizing therapy for older adults with acute myeloid leukemia: Role of geriatric assessment and genetic profiling. **Cancer treatment reviews**, v. 75, p. 52–61, maio 2019.

CARTER, B. Z. et al. Targeting MCL-1 dysregulates cell metabolism and leukemia-stroma interactions and resensitizes acute myeloid leukemia to BCL-2 inhibition. **Haematologica**, v. 107, n. 1, p. 58–76, 2022.

CHAN, P. M. Differential signaling of Flt3 activating mutations in acute myeloid leukemia: a working model. **Protein & Cell**, v. 2, n. 2, p. 108–115, 25 fev. 2011.

CHOTA, A.; GEORGE, B. P.; ABRAHAMSE, H. Interactions of multidomain pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins in cancer cell death. **Oncotarget**, v. 12, n. 16, p. 1615–1626, 3 ago. 2021.

CULP-HILL, R.; D'ALESSANDRO, A.; PIETRAS, E. M. Extinguishing the Embers: Targeting AML Metabolism. **Trends in Molecular Medicine**, v. 27, n. 4, p. 332–344, abr. 2021.

CZABOTAR, P. E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 49–63, 20 jan. 2014.

DAHAN-FARKAS, N. et al. 6-Substituted imidazo[1,2-a]pyridines: Synthesis and biological activity against colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4573–4583, set. 2011.

DAVER, N.; VENUGOPAL, S.; RAVANDI, F. FLT3 mutated acute myeloid leukemia: 2021 treatment algorithm. **Blood Cancer Journal**, v. 11, n. 5, p. 104, 27 maio 2021.

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, mar. 2018.

DINARDO, C. D.; PERL, A. E. Advances in patient care through increasingly individualized therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 16, n. 2, p. 73–74, 2 fev. 2019.

DÖHNER, H.; WEI, A. H.; LÖWENBERG, B. Towards precision medicine for AML. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 18, n. 9, p. 577–590, 18 set. 2021.

FERRETTI, E. et al. Direct inhibition of human acute myeloid leukemia cell growth by IL-12. **Immunology Letters**, v. 133, n. 2, p. 99–105, out. 2010.

FRÖHLING, S. et al. *CEBPA* Mutations in Younger Adults With Acute Myeloid Leukemia and Normal Cytogenetics: Prognostic Relevance and Analysis of Cooperating Mutations. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 4, p. 624–633, 15 fev. 2004.

GABRIELLI, B.; BROOKS, K.; PAVEY, S. Defective cell cycle checkpoints as targets for anti-cancer therapies. **Frontiers in pharmacology**, v. 3, p. 9, 2012.

GALADARI, S. et al. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 104, p. 144–164, mar. 2017.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, 23 mar. 2018.

GUO, Y. et al. The efficacy and adverse events of venetoclax in combination with hypomethylating agents treatment for patients with acute myeloid leukemia and

myelodysplastic syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Hematology**, v. 25, n. 1, p. 414–423, 1 jan. 2020.

HAN, D.; WILLIAMS, E.; CADENAS, E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. **Biochemical Journal**, v. 353, n. 2, p. 411–416, 15 jan. 2001.

HAN, Y. et al. Th17 cells and interleukin-17 increase with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. **Cancer Science**, v. 105, n. 8, p. 933–942, 11 ago. 2014.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

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, jun. 2020.

JAMMAL, N. et al. Cell cycle inhibitors for the treatment of acute myeloid leukemia: a review of phase 2 & 3 clinical trials. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 25, n. 4, p. 491–499, 1 out. 2020.

JIANG, Y. et al. The imidazopyridine derivative X22 prevents diabetic kidney dysfunction through inactivating NF- $\kappa$ B signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 525, n. 4, p. 877–882, maio 2020.

KALE, J.; OSTERLUND, E. J.; ANDREWS, D. W. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 1, p. 65–80, 17 jan. 2018.

KARIMDADI SARIANI, O. et al. Pathogenic and therapeutic roles of cytokines in acute myeloid leukemia. **Cytokine**, v. 142, p. 155508, jun. 2021.

KASER, E. C. et al. The role of various interleukins in acute myeloid leukemia. **Medical Oncology**, v. 38, n. 5, p. 55, 9 maio 2021.

KAYSER, S.; LEVIS, M. J. Updates on targeted therapies for acute myeloid leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 196, n. 2, p. 316–328, 4 jan. 2022.

KHATUN, S. et al. Imidazopyridine, a promising scaffold with potential medicinal applications and structural activity relationship (SAR): recent advances. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–24, 15 nov. 2021a.

KHATUN, S. et al. Imidazopyridine, a promising scaffold with potential medicinal applications and structural activity relationship (SAR): recent advances. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–24, 15 nov. 2021b.

KISHTAGARI, A.; LEVINE, R. L.; VINY, A. D. Driver mutations in acute myeloid leukemia. **Current Opinion in Hematology**, v. 27, n. 2, p. 49–57, mar. 2020.

KLEPIN, H. D. et al. Geriatric assessment among older adults receiving intensive therapy for acute myeloid leukemia: Report of CALGB 361006 (Alliance). **Journal of Geriatric Oncology**, v. 11, n. 1, p. 107–113, jan. 2020.

LAGUNAS-RANGEL, F. A. et al. Acute Myeloid Leukemia-Genetic Alterations and Their Clinical Prognosis. **International journal of hematology-oncology and stem cell research**, v. 11, n. 4, p. 328–339, 1 out. 2017.

MARCUCCI, G. et al. Age-Related Prognostic Impact of Different Types of *DNMT3A* Mutations in Adults With Primary Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 7, p. 742–750, 1 mar. 2012a.

MARCUCCI, G. et al. Age-Related Prognostic Impact of Different Types of *DNMT3A* Mutations in Adults With Primary Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 7, p. 742–750, 1 mar. 2012b.

MARTÍNEZ-URBINA, M. A. 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**, v. 45, n. 3, p. 1211–1219, mar. 2010.

MARTNER, A. et al. Immunotherapy with histamine dihydrochloride for the prevention of relapse in acute myeloid leukemia. **Expert Review of Hematology**, v. 3, n. 4, p. 381–391, 10 ago. 2010.

MENON, S. S. et al. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. **Clinica Chimica Acta**, v. 491, p. 39–45, abr. 2019.

MOLDOVEANU, T. et al. Many players in BCL-2 family affairs. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 3, p. 101–111, mar. 2014.

MUKHERJEE, S.; SEKERES, M. A. Novel Therapies in Acute Myeloid Leukemia. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 35, n. 6, p. 150955, dez. 2019.

NAKASE, K.; KITA, K.; KATAYAMA, N. IL-2/IL-3 interplay mediates growth of CD25 positive acute myeloid leukemia cells. **Medical Hypotheses**, v. 115, p. 5–7, jun. 2018.

NEWELL, L. F.; COOK, R. J. Advances in acute myeloid leukemia. **BMJ**, p. n2026, 6 out. 2021.

NISHIOKA, C. et al. MicroRNA-9 plays a role in interleukin-10-mediated expression of E-cadherin in acute myelogenous leukemia cells. **Cancer Science**, v. 108, n. 4, p. 685–695, abr. 2017.

PADMAKUMAR, D. et al. A concise review on the molecular genetics of acute myeloid leukemia. **Leukemia Research**, v. 111, p. 106727, dez. 2021.

PANUZZO, C. et al. Landscape of Tumor Suppressor Mutations in Acute Myeloid Leukemia. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 3, p. 802, 16 mar. 2020.

PAPADAKIS, G. et al. Synthesis of New Imidazopyridine Nucleoside Derivatives Designed as Maribavir Analogues. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 19, 3 out. 2020.

PATEL, S. et al. Novel imidazopyrimidines-based molecules induce tetramerization of tumor pyruvate kinase M2 and exhibit potent antiproliferative profile. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 170, p. 106112, mar. 2022.

PELCOVITS, A.; NIROULA, R. **Acute Myeloid Leukemia: A Review**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://seer.cancer.gov/statfacts/>>.

PFEFFER, C.; SINGH, A. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 448, 2 fev. 2018.

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, dez. 2020.

POTTER, M.; NEWPORT, E.; MORTEN, K. J. The Warburg effect: 80 years on. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n. 5, p. 1499–1505, 15 out. 2016.

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

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, 27 set. 2019.

ROSE-INMAN, H.; KUEHL, D. Acute Leukemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 31, n. 6, p. 1011–1028, dez. 2017.

ROWE, J. M. The “7+3” regimen in acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 107, n. 1, p. 3, 2022.

SAMI, S. A. et al. Current and Future Molecular Targets for Acute Myeloid Leukemia Therapy. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 21, n. 1, p. 3, 13 jan. 2020.

SAXENA, K.; KONOPLEVA, M. An expert overview of emerging therapies for acute myeloid leukemia: novel small molecules targeting apoptosis, p53, transcriptional regulation and metabolism. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 29, n. 9, p. 973–988, 1 set. 2020a.

SAXENA, K.; KONOPLEVA, M. An expert overview of emerging therapies for acute myeloid leukemia: novel small molecules targeting apoptosis, p53, transcriptional regulation and metabolism. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 29, n. 9, p. 973–988, 1 set. 2020b.

SAYEED, I. BIN et al. Design, synthesis and biological evaluation of imidazopyridine-propenone conjugates as potent tubulin inhibitors. **MedChemComm**, v. 8, n. 5, p. 1000–1006, 1 maio 2017.

SHERR, C. J.; BARTEK, J. Cell Cycle–Targeted Cancer Therapies. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 1, n. 1, p. 41–57, 6 mar. 2017.

SHORT, N. J. et al. Advances in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: New Drugs and New Challenges. **Cancer Discovery**, v. 10, n. 4, p. 506–525, 1 abr. 2020.

SINHA, K. et al. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 7, p. 1157–1180, 30 jul. 2013.

SONG, I. S. et al. Mitochondria as therapeutic targets for cancer stem cells. **World journal of stem cells**, v. 7, n. 2, p. 418–27, 26 mar. 2015.

SONG, Y. et al. Discovery and characterization of novel imidazopyridine derivative CHEQ-2 as a potent CDC25 inhibitor and promising anticancer drug candidate. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 82, p. 293–307, jul. 2014a.

SONG, Y. et al. Discovery and characterization of novel imidazopyridine derivative CHEQ-2 as a potent CDC25 inhibitor and promising anticancer drug candidate. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 82, p. 293–307, jul. 2014b.

SUN, W.-X. et al. [Expression of survivin in patients with acute myeloid leukemia]. **Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi**, v. 21, n. 5, p. 1099–104, out. 2013.

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



SUNKARI, S. et al. Synthesis and biological evaluation of new bisindole-imidazopyridine hybrids as apoptosis inducers. **Bioorganic Chemistry**, v. 87, p. 484–494, 1 jun. 2019b.

TALLMAN, M. S. et al. Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 17, n. 6, p. 721–749, jun. 2019.

TAO, Q. et al. Regulatory T cells-derived IL-35 promotes the growth of adult acute myeloid leukemia blasts. **International Journal of Cancer**, v. 137, n. 10, p. 2384–2393, 15 nov. 2015.

THIEDE, C. et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). **Blood**, v. 107, n. 10, p. 4011–4020, 15 maio 2006.

VANDA, D.; ZAJDEL, P.; SOURAL, M. Imidazopyridine-based selective and multifunctional ligands of biological targets associated with psychiatric and neurodegenerative diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 181, p. 111569, nov. 2019.

VIJAY, V. et al. Interleukin-8 blockade prevents activated endothelial cell mediated proliferation and chemoresistance of acute myeloid leukemia. **Leukemia Research**, v. 84, p. 106180, set. 2019.

WANG, J. et al. Elevated IL-35 in bone marrow of the patients with acute myeloid leukemia. **Human Immunology**, v. 76, n. 9, p. 681–686, set. 2015.

WANG, J.-J.; LEI, K.-F.; HAN, F. **Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments.** [s.l.: s.n.].

WELCH, J. S. Patterns of mutations in TP53 mutated AML. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 31, n. 4, p. 379–383, dez. 2018.

WENZEL, E. S.; SINGH, A. T. K. Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 32, n. 1, p. 1–5, [s.d.].

WILHELMSON, A. S.; PORSE, B. T. CCAAT enhancer binding protein alpha (CEBPA) biallelic acute myeloid leukaemia: cooperating lesions, molecular mechanisms and clinical relevance. **British Journal of Haematology**, v. 190, n. 4, p. 495–507, 21 ago. 2020.

WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **The Journal of Pathology**, v. 226, n. 2, p. 352–364, jan. 2012.

WOJCICKI, A. V. et al. Metabolomics in acute myeloid leukemia. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 130, n. 4, p. 230–238, ago. 2020a.

WOJCICKI, A. V. et al. Metabolomics in acute myeloid leukemia. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 130, n. 4, p. 230–238, ago. 2020b.

YADAV, A. R.; MOHITE, S. K. Cancer-A silent killer: An overview. **Asian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 3, p. 213, 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