

Patricia Alves de Almeida

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE MORTE CELULAR
INDUZIDOS POR SULFONAMIDAS SINTÉTICAS DERIVADAS
DE 2,4-DINITROBENZENOSULFONILA EM LINHAGENS DE
CÉLULAS DE LEUCEMIAS AGUDAS HUMANAS**

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

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

Florianópolis
2019

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

Almeida, Patricia Alves de
Avaliação dos mecanismos de morte celular
induzidos por sulfonamidas sintéticas derivadas de
2,4-dinitrobenzenosulfonila em linhagens de células
de leucemias agudas humanas / Patricia Alves de
Almeida ; orientadora, Maria Cláudia Santos da
Silva, 2019.
140 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Leucemias agudas. 3.
Sulfonamidas. 4. Apoptose. I. Silva, Maria Cláudia
Santos da. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III.
Titulo.

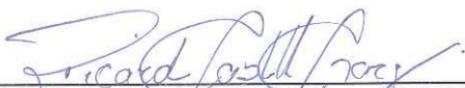
“Avaliação dos Mecanismos de Morte Celular Induzidos por Sulfonamidas Sintéticas Derivadas de 2,4 Dinitrobenzenosulfonila em Linhagens de Células de Leucemias Agudas Humanas”

POR

Patricia Alves de Almeida

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

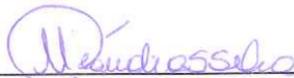
Banca Examinadora:



Prof(a). Dr(a). Ricardo Castillo Garcez (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Ariane Zamoner Pacheco de Souza (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Maria Cláudia Santos da Silva (UFSC – Orientador(a))



**Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC**

Florianópolis, 13 de março de 2019.

Dedico este trabalho ao amor da
minha vida, Diego.

*“Diante da vastidão do tempo e da
imensidão do universo, é um imenso
prazer para mim dividir um planeta e
uma época com você.”*

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Quando decidi iniciar o mestrado, já estava há quase dois anos trabalhando como farmacêutica em uma farmácia comercial. A notícia dessa mudança nos planos foi recebida pelos meus pais inicialmente com surpresa, entretanto, também com muito carinho e incentivo. Então, primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Cleusa e Jaime, por sempre me incentivarem a seguir o meu caminho, pelo estímulo a continuar estudando. Obrigada mãe por toda a ajuda, seja emprestando o carro nos dias em que os experimentos foram até mais tarde, seja com aquela comidinha pra trazer de marmita pro lab, por todo o carinho e por sua paixão pelos estudos, que sempre me motivou a continuar nesse caminho. Ao meu pai, meu maior exemplo de professor e pesquisador, uma pessoa que se dedica com muita paixão a lecionar e à pesquisa. Quem por vezes chama seus alunos de “filhos” e os apresenta a mim como “irmãos”. Obrigada por ser minha grande inspiração, e por todo o seu apoio.

Agradeço ao meu marido e amigo, Diego, por estar sempre presente em todos os momentos, por me apoiar em todas as horas, por me fazer sorrir nos momentos de desespero, por todo o amor e carinho incondicionais, sem os quais nada disso seria possível. Obrigada por acreditar em mim e por me incentivar a sonhar, mesmo nas horas mais difíceis. A vida é sempre mais iluminada por ter você ao meu lado.

Agradeço, também, ao meu irmão Eduardo, também pesquisador e professor apaixonado pelo que faz, e minha segunda grande inspiração por esse mundo. Ainda lembro como se fosse ontem, quando deveria ter uns 9 anos, das coletas de marisco para sua pesquisa onde eu ajudava a catalogar os criotubos para as análises e colocava no nitrogênio líquido, me achando “a cientista”. Agradeço por sempre me incentivar, pelas conversas, pelas dicas, e pelos bons momentos que sempre temos em família.

Ao meu irmão Daniel, não mais presente, mas que se estivesse aqui tenho certeza que estaria muito orgulhoso. Obrigada pela sua presença em minha vida, que apesar de breve, foi linda e nunca será esquecida. Seu sorriso sempre estará no meu coração.

Às minhas avós, Palmira e Maria, à minha madrinha Gisa e ao meu padrinho Cezar, por sempre me tratarem com muito carinho e por entenderem quando não pude estar presente por várias vezes em eventos da família.

Ao meu cachorro Pingo (vai ter agradecimento pro cachorro sim!), porque chegar em casa depois de um dia cheio e ser recebida toda

vez com uma festa por alguém que parece que não te vê há um mês não tem preço. Isso te faz sorrir e esquecer (pelo menos por breves momentos) dos prazos, dos experimentos que faltam terminar, e traz aconchego nas horas difíceis.

Gostaria de agradecer à toda equipe do LOEH, por me acolher nesse laboratório lindo e por me ensinar muito, muito mesmo! Em especial agradeço à Mari, que sempre se disponibilizou a me ajudar, pelas correções, pelas dicas, pela ajuda nos experimentos e na construção desse trabalho, pelos desabafos da vida...tenho certeza que tens um futuro lindo pela frente! À Íris, por toda ajuda e ensinamentos no mundo da citometria de fluxo, o qual é mesmo fascinante! À Laura e à Bruna, por toda a ajuda nos experimentos, pela força, pelas trocas de conhecimento e por manterem o humor nas sextas feiras à noite em que ficamos até tarde na citometria para analisar o ciclo celular; à Nati, por ser essa pessoa doce que encanta a todos e que está sempre disposta a ajudar, te desejo toda a felicidade agora que o Vicente chegou! Agradeço também à Amanda J., Amanda A., ao Sandro, Douglas, Dai, Carol, Bruna J. e Tanara; à Bia (obrigada pelas tranças nas sextas à tarde) e à Manu, por quem sempre tive um carinho muito grande desde que entrei no lab, obrigada por todas as conversas no cafezinho.

À equipe da Oncohematologia do HU, por compartilharem o seu espaço comigo nos dias de experimento, e por todo auxílio nesses dois anos.

Também agradeço aos funcionários do setor de Análises Clínicas do HU, que sempre deixaram o horário do cafezinho mais alegre, e principalmente ao Luis, por toda a ajuda com a autoclave nesse tempo; e também aos colaboradores da limpeza.

Agradeço ao Luiz Felipe Schmitz, e ao professor Ricardo José Nunes, do LEAT, pela síntese dos compostos utilizados nesse trabalho.

Obrigada aos membros da banca, professoras Ariane e Iara, e professor Ricardo, por aceitarem o convite para essa avaliação e pelas contribuições para com este trabalho.

À professora Ana Carolina, por me aceitar como aluna no estágio de docência, onde aprendi muito e recebi dicas valiosas sobre dar aulas. Guardarei esses ensinamentos para sempre comigo, e agradeço também por toda a disponibilidade nas inúmeras vezes que precisei, tanto na docência como nas dúvidas em relação a estatística. Obrigada por tornar a docência algo extremamente prazeroso, e pelas conversas nos intervalos da aula ou dos experimentos e nos encontros do lab.

À minha grande amiga e também pesquisadora Pri, que me ensinou muito nessa vida acadêmica desde os nossos tempos de IC, mas

principalmente, me mostrou que a amizade e a parceria são fundamentais no meio dessa loucura toda. Obrigada por ser inspiração e ombro, quando precisei.

Agradeço também à Rafa, quem eu também conheço desde os tempos de IC e que se tornou uma grande amiga que decidiu ir um pouquinho mais longe pra alcançar os seus objetivos, os quais tenho certeza que serão alcançados. És motivo de muita inspiração também. Continue a nadar!

Às minhas amigas de infância, Ana, Carol, Bru, Mana, Lé, Gabi, Cris, Vi e ao meu querido amigo Du, vocês são parte fundamental na minha vida e estarão sempre no meu coração. Obrigada por entenderem as minhas ausências e mesmo assim se fazerem presentes em minha vida, e principalmente agradeço por todos os momentos compartilhados, nossa amizade não tem igual!

À minha querida amiga Lisi, que o curso de Farmácia me deu de presente, obrigada por ser essa pessoa maravilhosa e cheia de luz, você me ajudou muito em tantas vezes que precisei. Também agradeço às outras amigas lindas que o curso de Farmácia me deu, Satomy, Natty, Fê e Laís, obrigada pelas conversas, pelas palavras de apoio e pelo bom humor que se mantém entre nós!

Ao Programa de Pós Graduação em Farmácia, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, por permitirem a realização e subsidiarem esse trabalho.

Agradeço, especialmente, à minha orientadora, professora Maria Cláudia, por acreditar em mim e me aceitar como aluna em seu laboratório. Obrigada pelo carinho e pelo apoio, por nutrir em seus alunos a paixão pela citometria de fluxo e pela pesquisa, pelo incentivo na busca por resultados melhores, seja na escrita ou na bancada, e por me proporcionar essa experiência incrível no mundo das leucemias. Os aprendizados aqui jamais serão esquecidos.

A todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho, espero que não tenha esquecido de ninguém, muito obrigada!

Quem me conhece bem sabe o quanto eu amo música, então finalizo meus agradecimentos citando um dos meus cantores preferidos.

*“Oh, I'm a lucky man, to count on both hands the ones I love.”
Eddie Vedder.*

RESUMO

As leucemias agudas (LAs) são doenças heterogêneas caracterizadas pela proliferação clonal de células hematopoiéticas na medula óssea e/ou nos tecidos linfóides. A principal estratégia de tratamento para as LAs é a quimioterapia, entretanto, esse tipo de terapia está associado a severas reações adversas e a altas taxas de recidiva, o que torna necessária a busca por novos compostos antileucêmicos. Nesse contexto, sulfonamidas são compostos com diversas atividades biológicas descritas na literatura, dentre as quais, a atividade antitumoral. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de uma série de sulfonamidas sintéticas sobre as células de linhagens de LAs humanas K562 (LMA) e Jurkat (LLA) e selecionar os compostos mais citotóxicos para a investigação dos seus principais mecanismos de morte celular. Após realizar a triagem de 17 sulfonamidas nas células K562, as três mais citotóxicas foram selecionadas para os ensaios posteriores, 1E68Y, 1E68R e 1E68DI. As três sulfonamidas causaram citotoxicidade dependente do tempo e da concentração, além de alterações morfológicas características de apoptose em ambas as linhagens celulares avaliadas. Além disso, nenhuma delas causou hemólise em eritrócitos saudáveis. A sulfonamida mais citotóxica para ambas as linhagens, 1E68DI, foi selecionada para a continuidade dos experimentos. O composto selecionado não foi citotóxico para células mononucleadas e apresentou alta seletividade para as linhagens de LA. A sulfonamida 1E68DI exerce seu efeito citotóxico por mecanismos distintos nas linhagens de leucemia avaliadas, pois causou bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, nas células K562, e na fase G0/G1, nas células Jurkat. Além disso, ao avaliar fatores envolvidos na ativação da apoptose, verificou-se que o composto causa a exposição de fosfatidilserina, associada aos eventos iniciais desse tipo de morte celular, somente nas células Jurkat. Ainda, com relação às células K562, os resultados demonstraram que a citotoxicidade da sulfonamida 1E68DI está associada à ativação tanto da apoptose extrínseca, devido ao aumento da expressão de FasR, como da apoptose intrínseca, pois houve redução do número de células com potencial mitocondrial intacto e aumento da expressão da proteína pró-apoptótica AIF nessa linhagem celular. Quanto às células Jurkat, alguns resultados demonstram apenas o envolvimento da apoptose intrínseca como um mecanismo de citotoxicidade do composto selecionado, pois além de reduzir o número de células dessa linhagem com potencial mitocondrial intacto, o mesmo causou uma redução na expressão da proteína antiapoptótica survivina.

A expressão das proteínas antiapoptótica Bcl-2 e pró-apoptótica Bax não sofreu alterações significativas em ambas as linhagens de LA avaliadas, enquanto que o aumento da expressão de caspase-3 ativada foi observado apenas na linhagem K562 após o tratamento com o composto. Os resultados obtidos com 1E68DI fornecem novas informações a respeito do mecanismo de citotoxicidade de sulfonamidas sobre células de linhagens leucêmicas e sugerem que esse composto pode ser um candidato promissor ao desenvolvimento de fármacos para o tratamento de LAs.

Palavras-chave: Leucemias agudas. Sulfonamidas. Apoptose.

ABSTRACT

Acute leukemias (ALs) are heterogeneous diseases characterized by the clonal proliferation of hematopoietic cells in the bone marrow and/or in lymphoid tissues. The main treatment strategy for ALs is chemotherapy; however, this kind of therapy is associated with severe adverse reactions and with high relapse rates, which makes the search for new antileukemic compounds a necessity. In this context, sulfonamides are compounds that have several biological activities described in the literature and, among them, the antitumor activity. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of a series of 17 synthetic sulfonamides in K562 (AML) and Jurkat (ALL) human AL cell lines and then select the most cytotoxic compounds for the investigation of their main cell death mechanisms. After screening in K562 cells, the three most cytotoxic compounds were selected for the subsequent assays: 1E68Y, 1E68R and 1E68DI. All three selected sulfonamides induced time and concentration-dependent cytotoxicity, as well as morphological changes suggestive of apoptosis in both K562 and Jurkat cell lines. In addition, none of them caused hemolysis in healthy erythrocytes. The most cytotoxic sulfonamide in both cell lines, 1E68DI, was selected for the following experiments. 1E68DI was not cytotoxic to mononuclear cells and showed a high selectivity for AL cell lines. Sulfonamide 1E68DI exerts its cytotoxic effect in leukemia cells by distinct mechanisms, as it caused cell cycle blockade at G2/M phase in K562 cells, and at G0/G1 phase in Jurkat cells. In addition, when evaluating the main factors involved in the activation of apoptosis, the compound caused phosphatidylserine exposure, which is associated with the early events of this type of cell death, only in Jurkat cells. Furthermore, regarding K562 cells, the results demonstrated that the cytotoxicity of sulfonamide 1E68DI is associated with the activation of both extrinsic apoptosis, due to an increased FasR expression, and intrinsic apoptosis, as we observed the loss of mitochondrial potential and an increased expression of the pro-apoptotic protein AIF. As for Jurkat cells, the results showed the involvement of intrinsic apoptosis only, with mitochondrial potential loss and a reduced expression of antiapoptotic protein survivin. The expression of the antiapoptotic and pro-apoptotic proteins Bcl-2 and Bax did not change neither in K562 nor in Jurkat cells after treatment with 1E68DI, whereas the increased expression of activated caspase-3 was observed only in K562 cells. The results obtained with 1E68DI provide new information about the cytotoxic mechanisms of sulfonamides in

leukemia cell lines and suggest that this compound may be a promising candidate for the development of new drugs for the treatment of ALs.

Keywords: Acute leukemias. Sulfonamides. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Hematopoiese normal	37
Figura 2 – Apoptose intrínseca e apoptose extrínseca	45
Figura 3 – Regulação do ciclo celular	47
Figura 4 – Estrutura do Prontosil®	50
Figura 5 – Estrutura da sulfanilamida	51
Figura 6 – Síntese das sulfonamidas derivadas do cloreto de 2,4-dinitrobenzenosulfonila	62
Figura 7 – Aminas utilizadas nas sínteses das sulfonamidas	62
Figura 8 – Triagem das 17 sulfonamidas sintéticas em células K562 ..	72
Figura 9 – Estruturas químicas das sulfonamidas selecionadas na triagem, 1E68Y, 1E68R e 1E68DI	73
Figura 10 – Curvas concentração e tempo-resposta para as sulfonamidas 1E68Y, 1E68R e 1E68DI sobre células de linhagem de LMA (K562)	76
Figura 11 – Curvas concentração e tempo-resposta para as sulfonamidas 1E68Y, 1E68R e 1E68DI sobre células de linhagem de LLA (Jurkat)	77
Figura 12 – Potencial hemolítico das sulfonamidas 1E68Y, 1E68R e 1E68DI	81
Figura 13 – Alterações morfológicas induzidas pelas sulfonamidas 1E68Y, 1E68R e 1E68DI em células K562 e Jurkat	83
Figura 14 – Avaliação da externalização dos resíduos de fosfatidilserina nas células K562 e Jurkat	85
Figura 15 – Efeito citotóxico da sulfonamida 1E68DI sobre células mononucleadas de indivíduos saudáveis	88
Figura 16 – Avaliação do efeito da sulfonamida 1E68DI sobre o potencial de membrana mitocondrial das células K562 e Jurkat	91
Figura 17 – Efeito da sulfonamida 1E68DI sobre as fases do ciclo celular das linhagens K562 e Jurkat	93
Figura 18 – Avaliação da expressão de AIF nas células K562 e Jurkat	98
Figura 19 – Avaliação da expressão de survivina nas células K562 e Jurkat	100
Figura 20 – Avaliação da expressão de Bax nas células K562 e Jurkat	101
Figura 21 – Avaliação da expressão de Bcl-2 nas células K562 e Jurkat	100
Figura 22 – Avaliação da expressão de FasR nas células K562 e Jurkat	105
Figura 23 – Avaliação da expressão de caspase-3 ativada nas células K562 e Jurkat	106

Figura 24 – Representação dos efeitos da sulfonamida 1E68DI sobre as células de LMA K562	112
Figura 25 – Representação dos efeitos da sulfonamida 1E68DI sobre as células de LLA Jurkat	113

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Medicamentos derivados de sulfonamidas	53
Quadro 2 – Citotoxicidade <i>in vitro</i> de sulfonamidas ou derivados	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de CI50 obtidos em células K562 após incubação com diferentes concentrações das sulfonamidas 1E68Y, 1E68R e 1E68DI por 12, 24 e 48 horas	77
Tabela 2 – Valores de CI50 obtidos em células Jurkat após incubação com diferentes concentrações das sulfonamidas 1E68Y, 1E68R e 1E68DI por 12, 24 e 48 horas	77
Tabela 3 – Cálculo do IS da sulfonamida 1E68DI nas células K562 e Jurkat em relação às células mononucleadas de indivíduos saudáveis	89
Tabela 4 – Efeito da sulfonamida 1E68DI sobre as fases do ciclo celular da linhagem K562	93
Tabela 5 – Efeito da sulfonamida 1E68DI sobre as fases do ciclo celular da linhagem Jurkat	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIF – Fator indutor de apoptose (do inglês, *Apoptosis inducing factor*)
- ANOVA – Análise de variância
- Apaf-1 – Fator ativador de protease apoptótica 1 (do inglês, *apoptotic peptidase activating factor 1*)
- ATP – Adenosina trifosfato
- Bad – Promotor de morte associado a Bcl-2 (do inglês, *Bcl-2-associated death promoter*)
- Bax – Proteína X associada a Bcl-2 (do inglês, *Bcl-2-associated X protein*)
- Bak – *Bcl-2 homologous antagonist/killer*
- Bcl-2 – Proteína-2 de linfoma de células B (do inglês, *B-cell lymphoma protein-2*)
- Bcl-XL – *B-cell lymphoma-extra large*
- Bcl-Xs – *Apoptosis regulator Bcl-X (isoform s)*
- Bcl-W – *BCL2 like 2*
- BE – Brometo de etídio
- Bfl-1 – Proteína A1 relacionada a Bcl-2 (do inglês, *Bcl-2-related protein A1*)
- Bid – *BH3 Interacting Domain Death Agonist*
- Bik – *BCL2 Interacting Killer*
- Bim – *Bcl-2-like protein 11*
- Bmf – *Bcl2 Modifying Factor*
- Bok – *Bcl-2 related ovarian killer*
- BSA – Albumina sérica bovina (do inglês, *Bovine serum albumin*)
- CDKs – Cinasas dependentes de ciclinas (do inglês, *cyclin dependent kinases*)
- CEPSH – Comitê de Ética de Pesquisa em Seres humanos
- CI50 – Concentração inibitória 50%
- CKI – Inibidores de CDK (do inglês, *cyclin-dependent kinase inhibitors*)
- CNMC – Comitê de Nomenclatura em Morte Celular
- DIABLO – Proteína de ligação direta a IAP com baixo ponto isoelétrico (do inglês, *Direct IAP Binding protein with low PI*)
- DISC – Complexo sinalizador indutor de apoptose (do inglês, *Death-inducing signaling complex*)
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*)
- DRM – Doença residual mínima
- DR3 – Receptor-3 de morte

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*)
EndoG – Endonuclease G
EPM – Erro padrão da média
FAB – Grupo franco-americano-britânico
FADD – *Fas-associated protein with death domain*
FasR – Receptor Fas (do inglês, *Fas receptor*)
FSC – *Forward Scatter*
G0 – *Gap 0*
G1 – *Gap 1*
G2 – *Gap 2*
HEPES – Ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N’-[2-etanosulfônico]
Hrk – *Activator Of Apoptosis Hrk* (Harakiri)
HU – Hospital Universitário
IAP – Proteína inibidora de apoptose (do inglês, *Inhibitor of apoptosis protein*)
INCA – Instituto Nacional do Câncer
IS – Índice de seletividade
LA – Leucemia aguda
LAcr – Laranja de acridina
LALA – Leucemia aguda de linhagem ambígua
LLA – Leucemia linfoblástica aguda
LLA-T – Leucemia linfoblástica aguda de células T
LMA – Leucemia mieloide aguda
LMC – Leucemia mieloide crônica
LOEH – Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias
M – Mitose
Mcl-1 – *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1*
MO – Medula óssea
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio
Noxa – *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – Tampão fosfato salino (do inglês, *Phosphate buffered saline*)
PI – Iodeto de propídio (do inglês, *Propidium iodide*)
PUMA – *p53 upregulated modulator of apoptosis*
RNA – Ácido ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic acid*)
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*
S – Síntese
SBF – Soro bovino fetal
SMAC – Segundo ativador de caspases derivado das mitocôndrias (do inglês, *Second mitochondria derived activator of caspases*)

SP – Sangue periférico

SSC – *Side Scatter*

tBid – Bid truncada (do inglês, *truncated Bid*)

TNF – Fator de necrose tumoral (do inglês, *Tumor necrosis factor*)

TRADD – *TNFR1 associated death domain protein*

TRAIL – Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (do inglês, *TNF-related apoptosis inducing ligand*)

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

WHO – World Health Organization
ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LISTA DE SÍMBOLOS

$\Delta\Psi_m$ – Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
2 REVISÃO DA LITERATURA	35
2.1 UM BREVE HISTÓRICO SOBRE AS LEUCEMIAS	35
2.2 LEUCEMIAS AGUDAS (LAs)	36
2.3 INDUÇÃO DA APOPTOSE COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA	40
2.4 REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA	46
2.5 SULFONAMIDAS COMO PROMISSORES FÁRMACOS ANTILEUCÊMICOS	49
2.6 O USO DE LINHAGENS CELULARES NA PESQUISA DE NOVOS FÁRMACOS	55
3 OBJETIVOS	59
3.1 OBJETIVO GERAL	59
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
4 MATERIAIS E MÉTODOS	61
4.1 ORIGEM DAS SULFONAMIDAS INVESTIGADAS	61
4.2 CULTIVO CELULAR	63
4.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO COLORIMÉTRICO DO MTT	63
4.4 TRIAGEM DAS 17 SULFONAMIDAS	64
4.5 CURVAS CONCENTRAÇÃO E TEMPO-RESPOSTA PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA 50 % (CI50)	64
4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO HEMOLÍTICO DAS SULFONAMIDAS SELECIONADAS	65

4.7 AVALIAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	66
4.8 AVALIAÇÃO DA EXTERNALIZAÇÃO DOS RESÍDUOS DE FOSFATIDILSERINA (FS)	66
4.9 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS MONONUCLEADAS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)	67
4.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS SULFONAMIDAS SELECIONADAS SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	68
4.11 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR	69
4.12 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA MORTE CELULAR POR APOPTOSE	69
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	71
5.1 TRIAGEM DAS 17 SULFONAMIDAS SINTÉTICAS	71
5.2 CURVAS CONCENTRAÇÃO E TEMPO-RESPOSTA PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA 50 % (CI50)	76
5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO HEMOLÍTICO DAS SULFONAMIDAS SELECIONADAS	80
5.4 AVALIAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	82
5.5 AVALIAÇÃO DA EXTERNALIZAÇÃO DOS RESÍDUOS DE FOSFATIDILSERINA (FS)	84
5.6 EFEITO DA SULFONAMIDA 1E68DI SOBRE CÉLULAS MONONUCLEADAS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS	87

5.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SULFONAMIDA 1E68DI SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	90
5.8 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR	92
5.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA MORTE CELULAR POR APOPTOSE	96
5.9.1 Efeito da sulfonamida 1E68DI sobre a proteína pró-apoptótica AIF	97
5.9.2 Efeito da sulfonamida 1E68DI sobre a proteína antiapoptótica survivina	99
5.9.3 Efeito da sulfonamida 1E68DI sobre a proteína antiapoptótica Bcl-2 e sobre a proteína pró-apoptótica Bax	100
5.9.4 Efeito da sulfonamida 1E68DI sobre a expressão do FasR	104
5.9.5 Efeito da sulfonamida 1E68DI sobre a expressão de caspase-3 ativada	105
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
7 COMPILAÇÃO DOS RESULTADOS	111
7.1 RESUMO GERAL	111
7.2 REPRESENTAÇÃO DOS EFEITOS DA SULFONAMIDA 1E68DI SOBRE AS CÉLULAS DE LMA K562	112
7.3 REPRESENTAÇÃO DOS EFEITOS DA SULFONAMIDA 1E68DI SOBRE AS CÉLULAS DE LLA JURKAT	113
8 PERSPECTIVAS	115
REFERÊNCIAS	117
ANEXO A	145

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), câncer ou neoplasia maligna são termos genéricos utilizados para caracterizar um grande grupo de doenças que apresentam em comum o crescimento desordenado de células anormais, as quais podem invadir tecidos adjacentes e causar metástase. Os dados mais recentes da OMS mostram que em 2015 ocorreram 8,8 milhões de mortes em decorrência do câncer, o que representa a segunda principal causa de morte no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2018).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) é a principal instituição responsável pela formulação, acompanhamento e implantação de políticas de atenção a pacientes oncológicos. Durante o percurso da história do câncer no país, houve, e ainda há, um grande esforço na área da medicina para tentar controlar a doença por meio da prevenção, apesar de existirem grandes dificuldades em alcançar a cura e altos custos associados aos tratamentos (BRASIL, 2007). Para os anos de 2018 e 2019, o INCA prevê cerca de 600 mil novos casos de neoplasias malignas por ano no Brasil (BRASIL, 2017). Esses dados epidemiológicos, juntamente com a situação econômica e social do Brasil e dos indivíduos acometidos pela doença, refletem a complexidade e os desafios que o câncer representa para a saúde pública brasileira (BRASIL, 2012).

A transformação maligna de células normais envolve uma série de eventos que ocorrem de maneira progressiva, os quais culminam no aparecimento do câncer. Dentre esses eventos, pode-se destacar a desregulação da transdução de sinais envolvidos nos processos de divisão e multiplicação celular, distúrbios no processo de morte celular regulada e falhas no processo de reparação do DNA (SALAZAR; SÁNCHEZ, 2014).

As neoplasias malignas podem ser divididas em dois grandes grupos, de acordo com o tecido de origem do tumor, em tumores sólidos e tumores hematológicos. Dentre as neoplasias hematológicas estão as leucemias, que se caracterizam pela proliferação clonal de células hematopoiéticas na medula óssea (MO) e/ou nos tecidos linfóides e por insuficiência funcional medular (GAVHANE et al., 2011; LADINES-CASTRO et al., 2016; MWIRIGI et al., 2017). As estimativas no Brasil para o biênio 2018-2019 são de 5940 casos de leucemias em homens e 4860 em mulheres, em cada ano. Esses valores correspondem à nona e à décima posição nos tipos de câncer mais frequentes, respectivamente, em indivíduos dos gêneros masculino e feminino no país (BRASIL,

2017). As leucemias podem ser divididas de acordo com a linhagem afetada em mieloides ou linfoides e, de acordo com o estágio de maturação das células, em agudas ou crônicas (DAVIS et al., 2014; ARBER et al., 2016; SWERDLOW et al., 2017).

O tratamento das leucemias agudas (LAs) é baseado, principalmente, na quimioterapia com fármacos citotóxicos, os quais costumam ser administrados de forma combinada (BRASIL, 2014; DAVIS et al., 2014; THOMAS; JEUNE, 2016) com o objetivo de induzir a morte regulada das células neoplásicas (RÉBÉ; GHIRINGHELLI, 2015; GALLUZZI et al., 2018). O esquema terapêutico utilizado atualmente para as LAs é realizado em etapas e tem o objetivo de induzir a morte dos blastos leucêmicos e de restaurar a hematopoiese normal (MWIRIGI et al., 2017). Apesar de ser a principal escolha de terapia para as LAs, os quimioterápicos disponíveis atualmente não são totalmente seletivos para as células malignas e também são citotóxicos para as células saudáveis (RÉBÉ; GHIRINGHELLI, 2015), o que resulta em uma série de efeitos adversos. Além disso, o desenvolvimento de resistência aos medicamentos e as altas taxas de recidivas são obstáculos a serem superados durante o tratamento das LAs, pois diminuem as opções terapêuticas disponíveis e podem agravar o quadro clínico do paciente (BRASIL, 2014; MWIRIGI et al., 2017).

Assim, considerando o grande número de novos casos de leucemia e as limitações dos tratamentos disponíveis, é importante a busca por novos compostos mais eficazes e seletivos para as células leucêmicas. Nesse sentido, as sulfonamidas compreendem uma classe de medicamentos cujo potencial farmacológico encontra-se em crescente investigação, tendo em vista que nos últimos anos foram descritas diversas atividades biológicas para seus derivados em estudos *in vivo*, *in silico* e, principalmente, *in vitro* com o uso de linhagens celulares. Dentre as diversas propriedades terapêuticas descritas na literatura para as sulfonamidas, destaca-se o seu potencial antitumoral (ALAOUI et al., 2017; DEBBABI et al., 2017). Em um estudo realizado anteriormente no Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) foi investigado o efeito citotóxico de uma sulfonamida derivada de 2,4-dinitrobenzenosulfonila em linhagens de células de LA e de mieloma múltiplo. O composto analisado reduziu a viabilidade celular das linhagens de neoplasias hematológicas avaliadas e também causou alterações características de indução de morte celular por apoptose (BIGOLIN, 2016).

Dessa forma, o alvo deste trabalho foi a busca por uma nova sulfonamida sintética que possua efeito citotóxico em células de linhagens de LAs humanas e que não seja citotóxica para células não tumorais, além da investigação dos principais mecanismos de morte celular envolvidos na citotoxicidade deste composto.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 UM BREVE HISTÓRICO SOBRE AS LEUCEMIAS

O termo leucemia (*Leukämie*) foi proposto pela primeira vez pelo médico polonês Rudolf Virchow em 1847 e significa “sangue branco” (do grego, “leuco” significa branco, e “emia”, sangue). Entretanto, relatos a respeito dessa enfermidade surgiram antes disso, em meados de 1800, quando o microscópio começou a ser utilizado com fins diagnósticos. Os primeiros relatos científicos foram feitos pelos médicos franceses Alfred Armand Louis, Marie Velpeau e Alfred François Donné, além do médico inglês John Hughes Bennett, que se referiu a esta alteração sanguínea como “leucocitemia”, e Rudolf Virchow. Esses relatos descreveram as primeiras observações a respeito da morfologia alterada de células sanguíneas associadas à sintomatologia apresentada pelos pacientes, as quais anos mais tarde foram reconhecidas como as primeiras descrições de leucemias (PILLER, 2001; ORTIZ-HIDALGO, 2013).

Ainda que muitos outros pesquisadores tenham participado das primeiras investigações a respeito dessas doenças que acometem as células sanguíneas e que, posteriormente, viriam a contribuir para o avanço nos conhecimentos biológicos das leucemias, vale ressaltar o papel do médico alemão Paul Ehrlich. Ehrlich, que era microbiologista, desenvolveu diversos corantes, entre eles alguns ácidos e básicos derivados de anilina, os quais permitiram demonstrar as principais características celulares e, assim, diferenciar os tipos de células sanguíneas. Esses corantes permitiram o início de uma nova era na medicina e, no caso das leucemias, possibilitaram a detecção de células alteradas em amostras de sangue periférico (SP). Além disso, ao final dos anos 1800, Ehrlich relatou que as leucemias eram originadas na MO e que poderiam ser divididas em linfóide e mieloide (JAY, 2001; ORTIZ-HIDALGO, 2013). Entre as importantes contribuições de Ehrlich para a medicina, destaca-se, também, o seu papel no desenvolvimento dos primeiros agentes precursores de quimioterápicos, o que faz com que ele seja considerado o “pai da quimioterapia” (CHUAIRE; CEDIEL, 2008).

Ao longo da história foram propostas diferentes formas de se classificar as leucemias, no entanto, a primeira classificação oficial foi realizada pelo grupo franco-americano-britânico (FAB), em 1976, que levou em consideração critérios morfológicos e citoquímicos (BENNETT et al., 1976; MUNIRAJ, 2015). A classificação da FAB foi

modificada em 1982 e 1991 (BENNETT et al., 1982; BENNETT et al., 1991) e, em 2001 a OMS publicou um documento com o intuito de acrescentar melhorias na classificação das leucemias proposta pela FAB, a qual passou a incluir características citogenéticas e imunológicas. Desde então, a classificação da OMS foi atualizada mais duas vezes, e é um documento utilizado em todo o mundo para auxiliar no diagnóstico não apenas das leucemias, mas, também, de outras neoplasias hematológicas. A última atualização proposta pela OMS foi realizada em 2016 e, em 2017, foi publicado o livro sob o título “Classificação da OMS de tumores de tecidos hematopoiéticos e linfoides” (do inglês, *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*), o qual inclui diversas informações sobre as características morfológicas, citoquímicas, imunofenotípicas e citogenéticas, bem como as características clínicas associadas a cada tipo de leucemia (JAFJE et al., 2001; MUNIRAJ, 2015; ARBER, 2016; SWERDLOW et al., 2017). Assim, atualmente, segundo a OMS, as leucemias são classificadas de acordo com o estágio de maturação em agudas ou crônicas e, de acordo com a linhagem acometida, em mieloides ou linfoides.

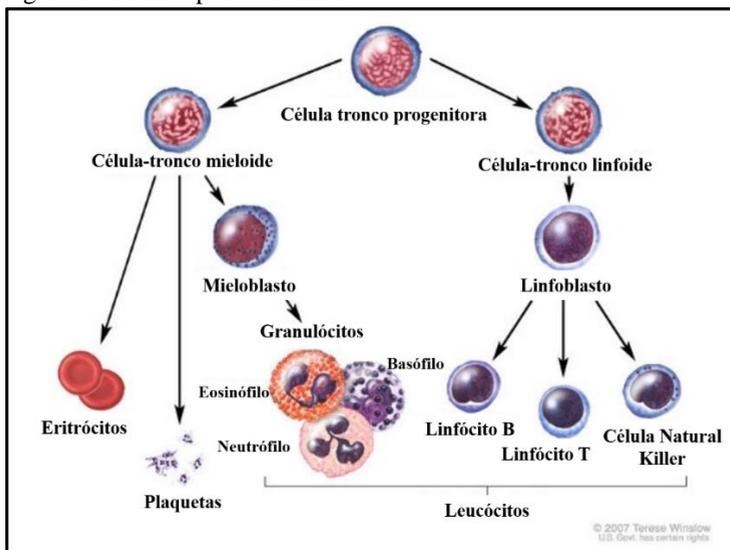
2.2 LEUCEMIAS AGUDAS (LAs)

Fisiologicamente, a hematopoiese ocorre a partir da diferenciação de células pluripotentes da MO a células progenitoras comprometidas com as linhagens mieloide ou linfoide (Figura 1). Nas LAs estão presentes diversas desordens genéticas que envolvem o descontrole da proliferação celular, a anormalidade dos processos de maturação e diferenciação celular e a manutenção da capacidade de autorrenovação durante o processo de hematopoiese (ROSE-INMAN; KUEHL, 2014; CHUNG; MA, 2017). Ao contrário das leucemias crônicas, que são caracterizadas pela produção exacerbada de células que mantém a capacidade de diferenciação (GREENBERG; PROBST, 2013), nas LAs a capacidade maturativa é perdida e, assim, ocorre o acúmulo de células imaturas (blastos) na MO e/ou no SP (MWIRIGI et al., 2017). Outra característica importante das LAs é que elas são originadas a partir de um único progenitor celular anormal (ROSE-INMAN; KUEHL, 2017).

De acordo com a OMS, as LAs são doenças heterogêneas divididas em três subtipos principais: leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia aguda de linhagem ambígua (LALA) (SWERDLOW et al., 2017). As causas exatas das disfunções genéticas que levam à transformação maligna das células

hematológicas não são totalmente conhecidas. Entretanto, alguns fatores de risco para o desenvolvimento das LAs são conhecidos, como, por exemplo, a exposição à radiação ionizante, o que pode resultar em mutação no DNA, deleções ou translocações. Outros fatores de risco incluem a exposição a benzeno e aqueles associados ao estilo de vida, como o sobrepeso e o tabagismo. As LAs também podem surgir como causa secundária a um tratamento quimioterápico para outro tipo de neoplasia maligna. Além disso, indivíduos com determinadas condições genéticas, como Síndrome de Down e anemia de Fanconi, ou condições autoimunes, como artrite reumatoide, possuem predisposição para o desenvolvimento de LAs (FIEGL, 2016). Os sintomas das LAs são normalmente inespecíficos e incluem febre, fadiga e perda de peso, além de hemorragias, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia (DAVIS et al., 2014; MWIRIGI et al., 2017; SWERDLOW et al., 2017).

Figura 1 – Hematopoiese normal.



Fonte: Adaptado de <https://www.teresewinslow.com/>

A LMA é uma doença clonal e heterogênea onde ocorre a proliferação celular descontrolada de células imaturas da linhagem mieloide. Como consequência da parada na maturação celular, ocorre o acúmulo de mieloblastos na MO e/ou SP com consequente redução das células normais na corrente sanguínea. Com a progressão da doença, as células saudáveis da MO são substituídas pelas células mieloides

imaturas, até que estas se acumulam e levam à insuficiência funcional da MO, o que, clinicamente, resulta em anemia, hemorragias e infecções (BRASIL, 2014; MEDINGER et al., 2016).

A LMA acomete principalmente indivíduos adultos e, em geral, quanto mais idoso o paciente, mais desfavorável é o prognóstico, principalmente naqueles com mais de 60 anos de idade. O protocolo quimioterápico para as LMAs não sofre alterações significativas há mais de 40 anos (MEDINGER et al., 2016) e consiste, basicamente, na administração de diferentes fármacos citotóxicos em duas fases. A primeira fase é denominada terapia de indução e tem como objetivo atingir a remissão completa, a qual é definida como menos de 5% de blastos na MO e ausência de blastos no SP, com contagem absoluta de neutrófilos maior que 1.000/ μL e contagem de plaquetas maior que 100.000/ μL . A seguir, é iniciada a segunda fase, denominada terapia de consolidação, a qual tem o intuito de evitar recidivas e eliminar a doença residual mínima (DRM) na MO. Nessa fase pode-se fazer uso de quimioterápicos ou ser realizado o transplante de células tronco hematopoiéticas da MO, entretanto, a busca por doadores compatíveis é um obstáculo importante a ser considerado. Finalmente, em alguns pacientes, pode ser iniciada uma terceira fase denominada terapia de manutenção, que tem como objetivo prolongar a remissão da doença e melhorar a sobrevida e o prognóstico (MUNKER, 2007; BRASIL, 2014; DÖHNER et al., 2015; RASHIDI et al., 2016; SAULTZ; GARZON, 2016). Os fármacos escolhidos e as doses utilizadas variam de acordo com a idade do paciente e, em geral, são utilizados diferentes tipos de antraciclinas, como a daunorrubicina e a idarrubicina, em combinação com um análogo de nucleosídeo, como a citarabina (BRASIL, 2014; DINARDO; CORTES, 2015; SAULTZ; GARZON, 2016).

As LLAs se originam a partir da transformação maligna de progenitores linfóides imaturos de células B ou T e podem ocorrer na MO, no SP ou em tecidos extramedulares. A maioria dos casos de LLA acomete crianças e adolescentes e, com menor frequência, a doença atinge pacientes adultos. Os principais sintomas da LLA incluem, além dos citados anteriormente, a linfadenopatia. A estratégia de tratamento contra as LLAs é baseada em três fases. A primeira delas, denominada indução da remissão, tem como objetivo diminuir o número de células leucêmicas. A segunda, chamada consolidação, busca manter a remissão e reduzir ou eliminar a DRM. Por fim, a terceira fase, ou manutenção, que pode durar de um a dois anos, tem como alvo reforçar o efeito alcançado nas fases anteriores e prevenir recidivas. Os pacientes pediátricos têm maiores chances de sucesso com o tratamento,

entretanto, terapias eficientes para pacientes adultos continuam sendo um desafio, já que os protocolos utilizados para esses pacientes foram obtidos a partir de mudanças realizadas na terapia aplicada nos pacientes pediátricos. Assim, são feitas diversas adaptações em um regime de quimioterapia pediátrica projetado há cerca de 50 anos (MUNKER; SAKHALKAR, 2007; LANG; WOJCIK; RIEGER, 2015; MEI et al., 2015; ARBER et al., 2016; PAUL; KANTARJIAN; JABBOUR, 2016; THOMAS; JEUNE, 2016; TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017). A terapia de indução em adultos com LLA consiste principalmente na administração de quatro ou cinco fármacos, que podem incluir vincristina, prednisona, antraciclinas, ciclofosfamida e L-asparaginase (USTWANI et al., 2016; THOMAS; JEUNE, 2016). A terapia de consolidação normalmente é feita com altas doses de metotrexato e 6-mercaptopurina, seguidas de vincristina, glicocorticoides e L-asparaginase, enquanto que na manutenção administra-se novamente metotrexato e 6-mercaptopurina e pode-se utilizar ou não vincristina e dexametasona (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013; MEI et al., 2015). O transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas é frequentemente descartado em pacientes idosos devido à presença de comorbidades. Além disso, esses pacientes são mais suscetíveis a reações adversas causadas pela toxicidade das altas doses dos medicamentos e tendem a desenvolver resistência à quimioterapia após a recidiva, fatores que podem contribuir para o insucesso do tratamento (PAUL; KANTARJIAN; JABBOUR, 2016; TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017).

Assim, existem diversas complicações clínicas associadas à quimioterapia. Por ser uma terapia que atua sistemicamente a nível celular sem ser específica, os quimioterápicos disponíveis atualmente são, em geral, citotóxicos também para células saudáveis. Células hematológicas não tumorais, como linfócitos, eritrócitos e granulócitos também são expostas à ação citotóxica dos quimioterápicos, o que pode provocar graves efeitos adversos, como, por exemplo, anemia, leucopenia, trombocitopenia ou neutropenia. Além disso, ocorre o comprometimento também de células não hematológicas, que incluem células pulmonares, cardíacas, hepáticas, neurológicas, gastrintestinais, entre outras (ANDRADE; SAWADA; BARICHELLO, 2013). Devido à imunossupressão causada pelos medicamentos utilizados no tratamento contra as LAs, os pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico são mais suscetíveis a infecções bacterianas, fúngicas e virais (CHANDRAN; HAKKI; SPURGEO, 2012; DAVIS et al., 2014), o que

pode aumentar significativamente a morbidade e mortalidade dos pacientes (CHANDRAN; HAKKI; SPURGEON, 2012).

Apesar dos grandes avanços na compreensão das características citogenéticas e moleculares das LAs, não houve progressos significativos no que diz respeito ao tratamento dessas neoplasias nas últimas décadas. As dificuldades enfrentadas no tratamento de pacientes com LAs, como o prognóstico desfavorável, as altas taxas de recidiva e a baixa seletividade dos quimioterápicos disponíveis, tornam necessária a busca por novas estratégias terapêuticas mais eficazes, específicas e que causem o mínimo de efeitos adversos ao paciente (DINARDO; CORTES, 2015; PAPADANTONAKIS; ADVANI, 2016; SAULTZ; GARZON, 2016). Assim, a busca por compostos citotóxicos que induzam morte celular regulada ou por bloqueio do ciclo celular são estratégias promissoras na pesquisa de novos agentes antileucêmicos.

2.3 INDUÇÃO DA APOPTOSE COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA

O termo apoptose foi introduzido pela primeira vez por Kerr e colaboradores em 1972 para descrever um tipo de morte celular programada que apresentava características específicas em relação a outros tipos de morte celular (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; SOLANO-GÁLVEZ et al., 2018). A apoptose é um processo fisiológico que regula o número de células total de um tecido, fundamental para a manutenção da homeostase. Além disso, a apoptose é o tipo de morte celular regulada mais bem estudada, a qual favorece a remoção de células danificadas como, por exemplo, aquelas que possuem mutações oncogênicas. Por outro lado, a inibição da apoptose provoca um desequilíbrio no balanço entre proliferação e morte celular, e, é, portanto, um importante mecanismo envolvido na manutenção do fenótipo maligno (KRUYT et al., 2008; WONG, 2011).

Por muito tempo a apoptose foi classificada como “morte celular programada”. Entretanto, na última publicação do Comitê de Nomenclatura em Morte Celular (CNMC) (2018), esse termo passou a ser utilizado para se referir a processos de morte celular regulada que ocorrem fisiologicamente. Assim, quando a apoptose é induzida por fármacos ou compostos em análise e não fisiologicamente, o termo adequado é “morte celular regulada”. Outros tipos de morte celular regulada são relatados na publicação do CNMC, entre eles: necroptose, ferroptose, piroptose, *parthanatos*, morte celular entóxica, morte celular NETóxica, morte celular dependente de lisossomo, morte celular

dependente de autofagia, morte celular imunogênica e necrose mediada pela transição da permeabilidade mitocondrial (GALLUZZI et al., 2018).

Segundo a literatura, a inibição da apoptose em células neoplásicas faz com que as mesmas sobrevivam por mais tempo e, assim acumulem mais mutações que podem favorecer a infiltração em outros tecidos e/ou interferir na diferenciação celular (PFEFFER; SINGH, 2018). Em contrapartida, vias de sinalização envolvidas na indução da apoptose estão associadas com os mecanismos mais bem-sucedidos dos tratamentos quimioterápicos, onde o grande enfoque é eliminar as células tumorais de forma regulada (KRUYT et al., 2008). Por esse motivo, compostos que provoquem a morte de células neoplásicas por apoptose são um alvo interessante na pesquisa de novos fármacos antitumorais.

De maneira geral, a apoptose é considerada um tipo de morte celular pouco imunogênico, e por muito tempo acreditou-se que a apoptose era imunologicamente silenciosa. Entretanto, alguns quimioterápicos, como as antraciclinas, são capazes de induzir um tipo de apoptose imunogênica considerada favorável, pois além de induzirem a morte das células malignas, estimulam o recrutamento de uma resposta imunológica do paciente para combater as células neoplásicas (LETAI et al., 2017; GALLUZZI et al., 2018; MONTICO et al., 2018). Por outro lado, existem agentes antitumorais que induzem outros tipos de morte celular regulada e que também ativam uma resposta inflamatória, como a autofagia, necroptose, *parthanatos*, piroptose, e ferroptose (KIM, 2017), citados anteriormente. É importante destacar que, em estudos *in vitro*, os estágios finais de apoptose podem causar alterações morfológicas características de necrose (necrose secundária), já que, normalmente, não há a presença de células fagocíticas para fazer a remoção dessas células ou dos seus fragmentos (BERGHE et al., 2009; GALLUZZI et al., 2018).

A apoptose pode ser iniciada por estímulos endógenos, por meio de sinalizações intracelulares, como, por exemplo, dano ao DNA celular; ou por estímulos exógenos, como os sinais indutores de morte mediados por células T citotóxicas em resposta a danos celulares, os quais estimulam receptores de morte presentes na membrana celular (BORYS et al., 2017). O processo de apoptose é regulado por uma cascata de proteínas (cisteína proteases) denominadas caspases, cuja função constitui-se basicamente na clivagem de diversas proteínas-alvo que podem ser ativadas ou inativadas (RANG et al., 2007; PFEFFER; SINGH, 2018). As caspases presentes nessa cascata são divididas em

dois grupos, as caspases iniciadoras, como a -8, a -9 e a -10, envolvidas no processo inicial da apoptose, e as caspases efetoras, como a -3, que está associada aos eventos finais e morfológicamente característicos de uma célula em apoptose (PORTT et al., 2011). Dentre eles, destacam-se a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA e do núcleo celular, a formação de *blebs* na membrana plasmática, os quais originarão os corpos apoptóticos, e alterações bioquímicas (PORTT et al., 2011; BORYS et al., 2017) que resultam em uma sinalização para resposta dos macrófagos (*in vivo*) devido à exposição de moléculas sinalizadoras na superfície das células apoptóticas (SAVITSKAYA; ONISHCHENKO, 2015; PFEFFER; SINGH, 2018). Dessas moléculas sinalizadoras, destaca-se a fosfatidilserina (FS), um fosfolipídio que normalmente se encontra no folheto interno da membrana plasmática das células eucarióticas e que durante a apoptose é exposto na superfície da célula, de onde emite um sinal para a fagocitose (“*eat me signal*”) (LEVENTIS; GRINSTEIN, 2010; SAVITSKAYA; ONISHCHENKO, 2015; SEGAWA; NAGATA, 2015; NAGATA et al., 2016). Já a fragmentação do DNA é mediada por endonucleases cuja função é clivar a cromatina em fragmentos de cerca de 180 pares de bases, um fenômeno que, quando acompanhado em gel de agarose, permite a visualização do “padrão em escada” característico de células em apoptose (MATASSOV et al., 2004).

Classicamente, de acordo com a literatura, duas vias estão envolvidas na morte celular por apoptose: a via extrínseca, ou dos receptores de morte, e a via intrínseca, ou mitocondrial (PFEFFER; SINGH, 2018). De acordo com o CNMC (2018), estas vias atualmente são tratadas como dois tipos de morte celular diferentes, a apoptose extrínseca e a apoptose intrínseca (GALLUZZI et al., 2018).

A apoptose extrínseca está associada principalmente à estimulação de receptores transmembrana conhecidos como receptores de morte, os quais possuem um domínio intracelular (domínio de morte) e um domínio extracelular para a ligação ao seu ligante específico. Desses receptores, destacam-se o fator de necrose tumoral (TNF), o receptor Fas (FasR, também denominado APO-1 ou CD95), o receptor-3 de morte (DR3) e o ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL). Quando um ligante específico se liga ao seu respectivo receptor de morte ocorre a formação de um sítio de ligação para diversas proteínas adaptadoras no domínio intracelular do receptor, entre elas, as proteínas TRADD (do inglês, TNFR1 associated death domain protein) e FADD (do inglês, Fas-associated protein with death domain). Essas proteínas, quando ligadas aos receptores, induzem, em conjunto com as

pró-caspases -8 e -10, a formação de um complexo supramolecular, denominado complexo de sinalização indutor de morte (DISC). Esse, por sua vez, inicia a ativação da pró-caspase-8, cuja forma ativada (caspase-8 – iniciadora) promove a ativação de caspases efetoras, como a caspase-3, o que inicia a morte celular (PORTT et al., 2011; WONG, 2011; GALLUZZI et al., 2018; SOLANO-GÁLVEZ et al., 2018).

Já a apoptose intrínseca é ativada principalmente por fatores intracelulares, como dano ao DNA, estresse oxidativo e alterações microtubulares, que resultam no aumento da permeabilidade das mitocôndrias e promovem a liberação de moléculas pró-apoptóticas do lúmen mitocondrial para o citosol (PORTT et al., 2011; WONG, 2011; SOLANO-GÁLVEZ et al., 2018). Assim, a mitocôndria tem um papel central na apoptose intrínseca. Essa organela é responsável pela produção de ATP pela fosforilação oxidativa resultante da conversão de energia estocada, por exemplo, na forma de carboidratos, em um gradiente eletroquímico, o que é mediado por uma cadeia transportadora de elétrons presente no folheto interno da membrana mitocondrial. Dessa maneira, o gradiente eletroquímico mitocondrial funciona como um armazenador de energia. Esse processo ocorre devido ao bombeamento de prótons que é gerado no folheto interno da membrana, o qual cria um diferencial de cargas (devido à presença das cargas positivas) responsável, portanto, pela manutenção do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (MITCHELL, 1961; BURKE, 2017). Danos às mitocôndrias podem causar uma dissipação do $\Delta\Psi_m$, com consequente perda das funções da organela e liberação de moléculas citotóxicas que promovem a morte celular (SOLANO-GÁLVEZ et al., 2018).

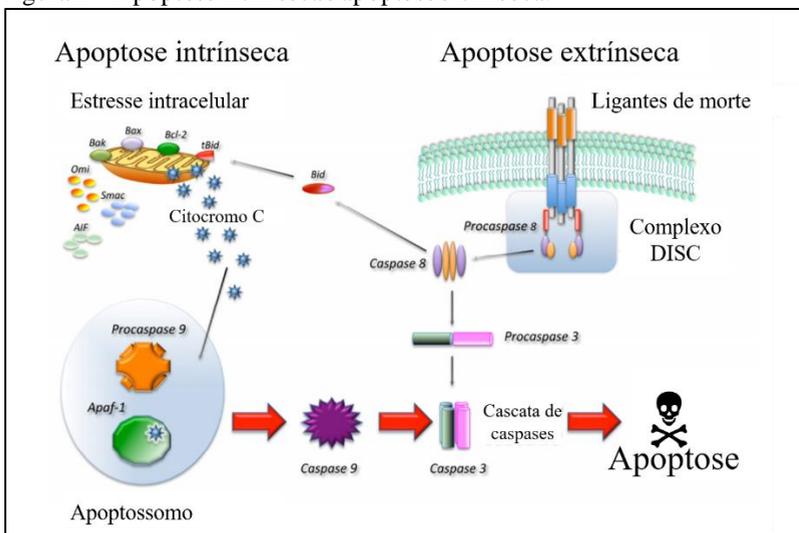
Segundo a literatura, proteínas da família Bcl-2 controlam o “ponto-chave” da apoptose intrínseca: a permeabilidade da membrana mitocondrial. Dessa família de proteínas destacam-se a proteína antiapoptótica Bcl-2 (proteína-2 de linfoma de células B), e as proteínas pró-apoptóticas Bax (proteína X associada a Bcl-2), Bak (do inglês, *Bcl-2 homologous antagonist/killer*) e Bok (do inglês, *Bcl-2 related ovarian killer*). Além dessas, existem muito mais proteínas integrantes da família Bcl-2, como Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1, Mcl-1 (antiapoptóticas), Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim, Hrk, PUMA, Noxa, Bmf (pró-apoptóticas), entre outras. As proteínas Bax, Bak e Bok são os membros efetores responsáveis pela permeabilização direta da membrana mitocondrial e podem ser ativadas por outras proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, como Bid, Bim, PUMA e Noxa, as quais interagem com Bax e/ou Bak de forma a produzir mudanças conformacionais em ambas e

consequente ativação das mesmas, e assim promovem a formação de poros na membrana mitocondrial de forma indireta. Além disso, as proteínas pró-apoptóticas interagem com membros antiapoptóticos de forma a inibir suas funções (DU et al., 2000; SHAMAS-DIN et al., 2013; COSENTINO; GARCÍA-SÁEZ, 2014; MOLDOVEANU et al., 2014; GALLUZZI et al., 2018; SOLANO-GÁLVEZ et al., 2018).

Como resultado da interação dessas proteínas pró e antiapoptóticas e da formação dos poros na membrana da mitocôndria, ocorre uma sinalização que afeta o $\Delta\Psi_m$ e, como consequência, ocorre o bloqueio ou a liberação de proteínas envolvidas na ativação das caspases, como o dímero Smac/Diablo e o citocromo c (GROSS; MCDONNELL; KORSMEYER, 1999; WONG, 2011; COSENTINO; GARCÍA-SÁEZ, 2014; HASSAN et al., 2014; PFEFFER; SINGH, 2018). Após a liberação do citocromo c, o mesmo forma um complexo com o fator-1 ativador de protease apoptótica (APAF-1), e ambos se ligam à pró-caspase 9, e, dessa forma, originam o apoptossoma. A formação do apoptossoma resulta na ativação da caspase iniciadora -9, a qual acaba por ativar uma caspase efetora (como as caspases -3 ou -7). Desse modo, a apoptose intrínseca e a apoptose extrínseca convergem na ativação de caspases efetoras, que são as responsáveis pela execução da morte celular (Figura 2) (PORTT et al., 2011; WONG, 2011; SOLANO-GÁLVEZ et al., 2018). Já o dímero Smac/Diablo atua na ativação das caspases e na indução da morte celular devido à sua capacidade de interagir de forma antagonista com proteínas inibidoras da apoptose (IAPs, do inglês, *inhibitor of apoptosis protein*) (GALLUZZI et al., 2018), entre as quais, a survivina. Além de sua função na inibição da apoptose, a survivina atua no controle do ciclo celular e na resposta ao estresse celular, e é altamente expressa em todos os tipos de tumores primários, o que é associado à resistência à apoptose induzida por quimioterápicos ou radioterapia. Assim, a survivina é considerada um preditor da agressividade tumoral e um biomarcador de mau prognóstico (NEOPHYTOU; CONSTANTINO, 2017).

Por outro lado, a dissipação do $\Delta\Psi_m$ pode promover a liberação de outras moléculas capazes de induzir a apoptose independentemente da ativação de caspases, como a endonuclease G (EndoG) e o fator indutor de apoptose (AIF). Como o AIF é liberado, o mesmo é translocado para o núcleo, onde promove a condensação da cromatina e consequentemente a morte celular (DYSHLOVOY et al., 2017; BANO; PREHN, 2018; SOLANO-GÁLVEZ et al., 2018).

Figura 2 – Apoptose intrínseca e apoptose extrínseca.



Fonte: Adaptado de Favaloro et al. (2012).

Adicionalmente a esses eventos, a caspase-8, citada anteriormente no processo de apoptose extrínseca, é capaz de promover a proteólise da proteína Bid para tBid (forma truncada e ativa de Bid), a qual é translocada para a membrana mitocondrial onde possibilita a ativação do complexo de poros de transição de permeabilidade, responsável, portanto, pelo início da permeabilização da mitocôndria. Assim, pode haver uma correlação entre apoptose intrínseca e extrínseca (SOLANO-GÁLVEZ et al., 2018).

Visto que a apoptose é um tipo de morte celular regulada e pouco imunogênica, compostos antileucêmicos que atuam na indução da apoptose em células neoplásicas estimulam a pesquisa por novos quimioterápicos mais efetivos e que causem menos efeitos adversos. Esses novos compostos, além de poderem ser administrados isoladamente, podem ser avaliados em combinação com terapias já estabelecidas (sinergismo), o que amplia as possibilidades de tratamento disponíveis. Isso é consideravelmente importante levando-se em consideração o grande número de pacientes que são resistentes aos tratamentos convencionais, e que eventualmente podem desenvolver recidiva, o que pode levar o paciente a óbito (WONG, 2011; PFEFFER; SINGH, 2018).

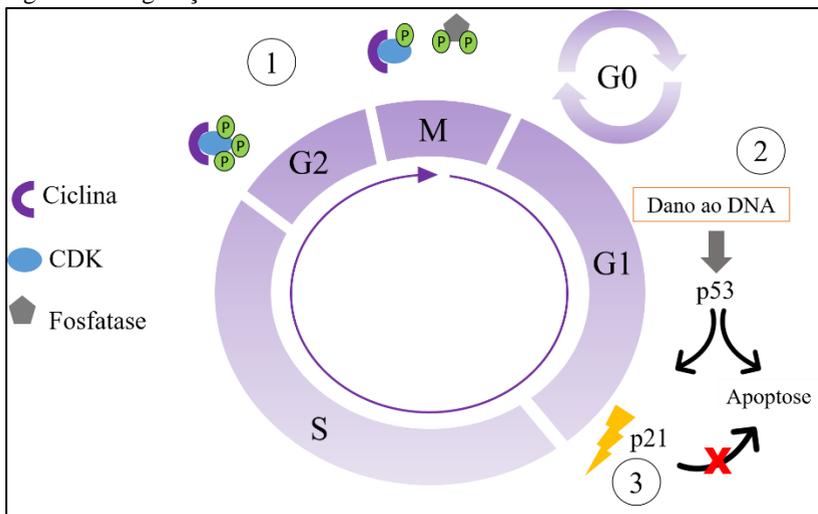
2.4 REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA

Fisiologicamente, a divisão de uma célula em duas células-filhas com material genético igualmente distribuído é um processo altamente regulado durante o ciclo celular (JINGWEN; YAOCHEN; GUOJUN, 2017). O ciclo celular pode ser dividido em duas fases, a intérfase, na qual a célula se prepara para a divisão, e a mitose (M), na qual a célula com DNA e cromossomos organizados se divide em duas células-filhas (citocinese). A mitose pode ainda ser dividida em cinco fases: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase. A intérfase, por sua vez, é dividida em G1 (*Gap1*, fase de crescimento e de pré-síntese do DNA), S (quando ocorre a replicação do DNA e a duplicação dos cromossomos) e G2 (*Gap2*, quando as células se preparam para a divisão por meio da síntese de RNA e proteínas). Nas fases G1 e G2 ocorre a checagem das condições intra e extracelulares antes da passagem para as fases seguintes do ciclo (BEHL; ZIEGLER, 2014; FUENTES-GARÍ et al., 2015; JINGWEN; YAOCHEN; GUOJUN, 2017). Após a intérfase, as células entram em quiescência (fase G0), o que representa um estágio reversível em que as células não estão em processo de divisão, mas possuem potencial para dividir (WILLIAMS; STOEBER, 2011; JINGWEN; YAOCHEN; GUOJUN, 2017). Todas essas etapas são importantes para a proliferação celular e, portanto, são essenciais para o crescimento, desenvolvimento e regeneração de tecidos (JINGWEN; YAOCHEN; GUOJUN, 2017) e também podem ser alvos de ação de novos compostos com potencial quimioterápico.

A progressão do ciclo celular (Figura 3) é regulada por proteínas denominadas ciclinas, cinases dependentes de ciclinas (CDKs) e fosfatases. As CDKs possuem um núcleo composto por serina/treonina catalíticas, o qual associa-se às subunidades reguladoras das ciclinas, e assim controlam a atividade de cinase e a especificidade do substrato. Enquanto as CDKs são responsáveis por fosforilar substratos específicos pela ligação com suas ciclinas específicas, de forma a promover a passagem da célula para a fase seguinte do ciclo celular, as mesmas são desfosforiladas pelas fosfatases. Essas proteínas atuam em conjunto nos pontos de checagem ao longo do ciclo celular para garantir que eventuais células que possuam danos ao DNA não se repliquem, e fornecem um intervalo (pelo bloqueio do ciclo celular), onde o DNA pode ser reparado. Por exemplo, os pontos de checagem permitem que células com DNA danificado na fase G1 não prossigam para a fase S, ou ainda, que danos adquiridos durante a fase S sejam reparados antes da

fase M. Além disso, é nos pontos de checagem que os cromossomos duplicados são corretamente alinhados no fuso mitótico e replicados de forma correta antes de se dividirem e gerarem células-filhas (WILLIAMS; STOEBER, 2011; LIM; KALDIS, 2013; SHERR; BARTEK, 2017; JINGWEN; YAOSHEN; GUOJUN, 2017). Entretanto, as CDKs podem ser negativamente reguladas pelas CKIs (proteínas inibidoras de CDK). As CKIs podem se ligar tanto às CDKs na forma livre como aos complexos de CDK e ciclina, e assim regulam a atividade das CDKs. A proteína p21 foi a primeira CKI a ser identificada, a qual pode levar ao bloqueio do ciclo celular entre as fases G1/S e G2/M. Além disso, a p21 apresenta uma função oncogênica, pois pode inibir a apoptose e assim favorecer a tumorigênese, além de inibir a replicação do DNA (KARIMIAN; AHMADI; YOUSEFI, 2016).

Figura 3 – Regulação do ciclo celular.



O ciclo celular é composto pelas fases M e intérfase (dividida em G1, S e G2) e é regulado pelas ciclinas, CDKs e fosfatases. A fase G0 representa as células em quiescência. As CDKs fosforilaram substratos específicos pela ligação com suas ciclinas específicas, de forma a promover a passagem da célula para a fase seguinte do ciclo celular, e são desfosforiladas pelas fosfatases (1); Danos ao DNA podem ativar a p53, a qual ativa a transcrição de p21, ou ainda a apoptose (2); a p21 pode levar a um bloqueio em G1/S e também inibir a apoptose (3).
Fonte: A autora.

Danos ao DNA podem alterar a progressão do ciclo celular e são provocados por diversas circunstâncias. Assim, causas intrínsecas, como a superexpressão de oncogenes e erros durante a replicação; ou extrínsecas, como a exposição a agentes carcinogênicos e radiação ionizante, causam danos que ativam os pontos de checagem com objetivo de manter as CDKs inativas até que o dano seja reparado. É importante destacar que, mesmo em condições fisiológicas, as células são submetidas diariamente a danos ao seu DNA, porém a maioria desses é reparada de forma a permitir a retomada do ciclo celular (PURVIS et al., 2012; BARNUM; O'CONNELL, 2014; WANG; SIMPSON; BROWN, 2015; SHALTIEL et al., 2015). Em determinadas situações de estresse (como o próprio dano ao DNA, ou dano ao fuso mitótico, situações de hipóxia e choque térmico), o gene supressor de tumor p53 é ativado, o que leva à tradução da proteína p53, que desempenha um papel importante nos pontos de checagem, principalmente na fase G1 do ciclo celular, quando promove a transcrição da proteína p21. A ativação de p53 pode desencadear outras respostas, como, por exemplo, o bloqueio do ciclo celular, o qual, se ocorrer de forma permanente, acaba por levar as células à senescência; ou ainda a indução da morte celular regulada, o que pode inibir a tumorigênese. Por outro lado, esse é o gene mais comumente mutado ou silenciado no câncer, o que é associado a mau prognóstico e pode afetar negativamente a resposta à quimioterapia (PURVIS et al., 2012; BARNUM; O'CONNELL, 2014; WANG; SIMPSON; BROWN, 2015).

Em geral, quando os danos ao DNA não podem ser reparados, são estimulados eventos intracelulares que levarão à morte regulada da célula danificada, o que pode ocorrer, por exemplo, por apoptose (VISCONTI; DELLA MONICA; GRIECO, 2016). Entretanto, muitas mutações oncogênicas podem bloquear a resposta ao dano de DNA e/ou os mecanismos de checagem durante o ciclo celular. Esses distúrbios nos mecanismos que controlam a progressão do ciclo celular em combinação com a supressão da apoptose permitem que células aberrantes continuem proliferando descontroladamente, e assim favoreçam a aneuploidia e a mitose catastrófica, o que contribui para o desenvolvimento de neoplasias (EVAN; VOUSDEN, 2001; WILLIAMS; STOEBER, 2011; JINGWEN; YAOCHEN; GUOJUN, 2017; SHERR; BARTEK, 2017).

Alguns quimioterápicos utilizados na clínica atuam de forma indireta no ciclo celular, como a citarabina, um agente citotóxico antimetabólito, análogo de nucleosídeo, utilizado nos tratamentos da LMA e LLA, o qual inibe a síntese de DNA pela inibição da DNA

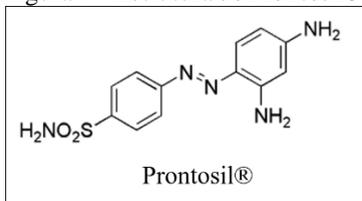
polimerase, e, assim, interfere na fase S (DEININGER, 2004). Há um grande interesse no desenvolvimento de terapias alvo-específicas, com enfoque, por exemplo, nas CDKs e nos pontos de checagem do ciclo celular. Muitas moléculas estão sendo avaliadas em estudos pré-clínicos e clínicos quanto à sua atividade farmacológica contra LMA, em modelos de monoterapia e terapias associadas a outros protótipos alvo-específicos ou em combinação com fármacos já estabelecidos clinicamente (ZAHR; BORTHAKUR, 2017).

Devido ao importante papel que desempenha durante o processo de tumorigênese, o ciclo celular pode ser um alvo terapêutico interessante no tratamento do câncer e, mais especificamente, das LAs, pois atua em pontos críticos de sinalização oncogênica. Assim, inibidores do ciclo celular podem ser administrados em monoterapia ou em combinação com outros fármacos (WILLIAMS; STOEBER, 2011; JINGWEN; YAOCHEN; GUOJUN, 2017).

2.5 SULFONAMIDAS COMO PROMISSORES FÁRMACOS ANTILEUCÊMICOS

Dentro do contexto do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas é fundamental destacar a importância dos medicamentos derivados das sulfonamidas, o que pode ser considerado o grande marco da industrialização da ciência e da medicina. Apesar de muitos creditarem à Fleming a “era dos antibióticos”, foi a descoberta do Prontosil® (4-[(2,4-Diaminofenil)azo] benzenosulfonamida) (Figura 4), um corante vermelho capaz de curar infecções bacterianas, que inicialmente marcou um momento decisivo na história da medicina em meados da década de 1930, onde iniciou-se uma revolução no tratamento de tais infecções. O Prontosil® foi o primeiro agente antimicrobiano a ser introduzido no mercado, em 1935, e é considerado o primeiro fármaco derivado de sulfonamida, ou sulfa, da história. O sucesso dessa nova terapia contribuiu para o início do que foi chamado de “era das drogas milagrosas”, onde o fármaco foi utilizado para tratar inúmeras infecções, como septicemia, pneumonia, meningite, gonorreia, infecções do trato urinário, entre muitas outras. Ainda que a síntese do Prontosil® seja creditada a Friedrich Mietzsch e Joseph Klarer, somente Gerhard Domagk foi laureado com o prêmio Nobel em 1939, pela descoberta do fármaco. Todos eles trabalharam juntos na indústria farmacêutica Bayer® (LESCH, 2007; BENTLEY, 2009; WAINWRIGHT; KRISTIANSEN, 2011).

Figura 4 – Estrutura do Prontosil®.

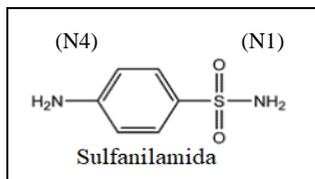


Fonte: Adaptado de Wainwright; Kristiansen (2011).

É evidente a relevância das sulfonamidas na medicina e na saúde pública, pois o uso difundido desses fármacos pela população foi rapidamente associado a uma redução da morbidade e da mortalidade características de doenças infecciosas. O fato de muitas “doenças antigas” não serem tão comuns na atualidade, se deve, em grande parte, à introdução do Prontosil® (WAINWRIGHT; KRISTIENSEN, 2011). Embora mais recentemente o uso de sulfonamidas em infecções bacterianas encontra-se reduzido devido ao desenvolvimento de diversos outros antibióticos, a introdução da combinação de trimetoprima e sulfametoxazol em meados da década de 1970, aumentou o uso de sulfonamidas no tratamento antimicrobiano, e este medicamento, em particular, é amplamente utilizado nos dias atuais (PETRI JUNIOR, 2011).

A sulfonamida mais simples estruturalmente é a sulfanilamida (Figura 5), também conhecida como *p*-aminobenzenosulfonamida, a qual é a molécula ativa do Prontosil® e de seus derivados, e, portanto a molécula base das sulfonamidas. Assim, o Prontosil® é considerado um pró-fármaco. Além do grupo sulfonil ligado ao grupo amino (ou grupo sulfonamídico) (SO₂NH₂), a estrutura básica das sulfonamidas apresenta um grupo amino (NH₂) na posição *para* do anel benzeno (MAREN, 1976; MIRIAN et al., 2011; WAINWRIGHT; KRISTIENSEN, 2011; KOLACZEK et al., 2014; TAČIĆ et al., 2017), onde foram feitas a maioria das substituições que levaram à descoberta de outros antimicrobianos e também fármacos com outras atividades farmacológicas (ANAND, 1983).

Figura 5 – Estrutura da sulfanilamida.



Fonte: Adaptado de Tačić et al. (2017).

O grupamento em N1 tem caráter lipofílico, o qual é responsável pela ligação às proteínas plasmáticas, assim, quanto maior a lipofilicidade da sulfonamida, maior será a eficiência do composto em se ligar a proteínas. Em antimicrobianos, o grupamento em N4 (*para*-NH₂) apresenta grande importância para a molécula, pois substituições nessa posição levam a uma perda na atividade antimicrobiana, exceto quando a intenção é produzir um pró-fármaco. Outras substituições podem levar à inatividade da molécula, tais como a acilação do grupo amino, a substituição do anel benzeno ou se o grupo sulfonamídico não estiver ligado ao anel benzeno (FUJITA; HANSCH, 1967; KOŁACZEK et al., 2014).

A atividade antibacteriana da sulfanilamida se deve à sua capacidade de inibir o ácido *para*-aminobenzoico (*p*ABA), por ser um análogo de tal estrutura. Assim a sulfanilamida inibe a enzima bacteriana diidropteroato sintase, a qual é essencial para a síntese do ácido fólico (WAINWRIGHT; KRISTIANSEN, 2011).

Contudo, a atividade das sulfonamidas vai além da sua ação antimicrobiana. A estrutura básica das sulfonamidas permite a inserção de diversos grupos funcionais, os quais originam outros fármacos com diferentes atividades farmacológicas, além de permitir a conjugação com outras moléculas. Essas características refletem a grande quantidade de alvos onde as sulfonamidas e seus derivados podem exercer o seu efeito. Particularmente, grande parte dessas múltiplas possibilidades farmacológicas se deve ao grupo SO₂NH-, o qual pode interagir com muitos componentes biomoleculares considerados alvos, como o DNA, RNA e aminoácidos (SUPURAN, 2017).

Assim, pouco tempo depois da introdução do Prontosil® no mercado, iniciaram-se modificações na molécula original, o que levou à geração de novos fármacos ou classes de fármacos, e ampliou-se a aplicação dos mesmos em outras doenças, como lepra, diabetes, hipertensão e doenças cardíacas. As modificações a partir da estrutura

do Prontosil® ampliaram sua aplicação até mesmo na medicina veterinária e na descoberta de novos herbicidas (LESCH, 2007). No Quadro 1 podem ser observados alguns fármacos derivados de sulfonamidas. Mais recentemente, estudos demonstraram potencial atividade antimalárica (BHATI, 2017), contra doença de Alzheimer (BAG et al., 2015), antimicrobiana (DEBBABI et al., 2017) e antitumoral (ALAOUI et al., 2017; DEBBABI et al., 2017). Além disso, outra atividade farmacológica das sulfonamidas, notavelmente relatada na literatura, é a inibição de anidrases carbônicas (GHORAB et al., 2016; CUMAUGLU et al., 2014), como a do tipo II, que está associada a diversas doenças como epilepsia, glaucoma, fibrose cística e leucemias (SALEEM et al., 2016), bem como as isoformas IX e XII, que estão associadas a tumores (SHAH; RIVERA; ASHFAQ, 2013; MOJZYCH et al., 2014). Outra característica das sulfonamidas é o seu efeito sinérgico com outros fármacos. A trimetoprima é um dos medicamentos que exibe maior atividade sinérgica quando utilizada com uma sulfonamida (sulfametoxazol), cuja combinação tem efeito antimicrobiano (PETRI JUNIOR, 2011).

Quadro 1 – Medicamentos derivados de sulfonamidas.

Classe de medicamento	Exemplos
Antimicrobianos	Sulfanilamida, sulfametoxazol, sulfizoxazol, sulfametrol, sulfatiazol, sulfapiridina, sulfadiazina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfadimetoxina, sulfametoxipiridazina, sulfacloropiridazina, sulfaleno, sulfaquinoxalino, sulfacetamida de sódio, sulfaguanidina, sulfasalazina, eritromicina, mafenida
Anti-inflamatórios (inibidores de COX-2)	Celecoxibe, valdecoxibe, rofecoxibe
Diuréticos	Acetazolamida, dorzolamida, metazolamida, clortiazida, clortalidona, clopamida, hidroclorotiazida, indapamida, furosemida
Hipoglicemiantes	Tolbutamida, gliclazida, glipizida, acetoexamida, tolazamida, glicotiazida, clorpropamida, glimidina, glibenclamida
Antivirais	Amprenavir, fosamprenavir
Anticonvulsivantes	Topiramato, zonisamida
Anti-hipertensivo	Sotalol
Anti-hiperprostático	Tamsulosina
Antimaláricos	Sulfadoxina, sulfadiazina, sulfaleno
Inibidor de fosfodiesterase	Sildenafil

Fonte: Maren (1976); Scozzafava et al. (2003); Supuran et al. (2004); Boechat et al. (2011); Petri Junior (2011); Deeming; Russell; Willis (2014); Tačić et al. (2017).

Assim, levando em consideração as diversas possibilidades de variações estruturais das sulfonamidas e a consequente ampliação de suas atividades biológicas, nos últimos anos diversos estudos

demonstraram a atividade citotóxica e antineoplásica desses compostos ou de substâncias que contenham sulfonamidas em sua estrutura sobre diferentes linhagens de neoplasias malignas. Segundo Pingaew et al. (2015), a atividade citotóxica de uma série de sulfonamidas a base de 1,4-naftoquinona foi descrita em linhagens de células humanas de colangiocarcinoma, carcinoma hepatocelular e carcinoma pulmonar. O efeito antitumoral de derivados de sulfonamida também foi constatado em linhagem de câncer de fígado humano (GHORAB et al., 2016), em linhagens de câncer de pulmão de células não pequenas e melanoma (SŁAWIŃSKI; BRZOZOWSKI, 2006) e em linhagens de câncer de mama (GHORAB et al., 2016). O Quadro 2 apresenta alguns tipos de neoplasias malignas nos quais sulfonamidas apresentaram atividade citotóxica *in vitro* em estudos publicados recentemente.

Quadro 2 – Citotoxicidade *in vitro* de sulfonamidas ou derivados.

Origem da linhagem de câncer avaliada no estudo	Composto utilizado	Referência
Colorretal	Derivados de sulfonamida à base de quinazolina	Al-Obeed et al. (2018)
Cérvix	Sulfonamidas derivadas de iminas e aminas	Koyuncu et al. (2018)
Pâncreas	Derivados de sulfonamida à base de quinolina	Yurttas et al. (2018)
Melanócitos	Complexo trans-sulfonamida-platina	Agudo-López et al. (2017)
Fígado, mama, cólon e próstata	Derivados de tiouréia e sulfonamida	Ghorab et al. (2017)
Células escamosas de boca	Derivados de benzenosulfonamida	Gul et al. (2017)
Ovário	Complexos sulfonamida-azobenzeno de platina	Samper et al. (2017)
Fígado, mama e pâncreas	Derivados de carbazol sulfonamida	Sun et al. (2017)
Cólon	Derivados de hidroxamato de cinamil sulfonamida	Reddy et al. (2016)
Mama e pulmão	Derivados de sulfonamida à base de cromona	Awadallah et al. (2015)

Existem diversos mecanismos de ação descritos para as sulfonamidas como compostos antitumorais, e dentre eles encontram-se a interrupção do ciclo celular na fase G1, o rompimento dos microtúbulos, a inibição da angiogênese e a indução da síntese de proteínas pró-apoptóticas (GHORAB et al., 2016). Ainda, a atividade antiproliferativa, indutora da apoptose e capacidade de interrupção do ciclo celular, de híbridos de sulfonamida e cromeno, foi relatada em linhagem de câncer de mama humano (GHORAB et al., 2016).

No entanto, apesar de a atividade citotóxica das sulfonamidas e seus derivados ser amplamente relatada em diversos tipos de tumores sólidos, existem poucos estudos recentes que avaliam o efeito dessa classe de compostos em neoplasias hematológicas e, mais especificamente, em LAs. Alguns dos estudos disponíveis na literatura sugerem uma atividade citotóxica das sulfonamidas em algumas linhagens leucêmicas, como, por exemplo, em linhagem e modelo murinos de LLA (NOVOTNY et al., 2006), linhagens humanas de LLA (PINGAEW et al., 2015; BIGOLIN, 2016), linhagem de leucemia promielocítica humana (OKSUZOGLU et al., 2016) e linhagens de LMA humana (MADÁCSI et al., 2013; MARZANO et al., 2013; BIGOLIN, 2016). Contudo, a maioria desses estudos relatados na literatura apresenta pouca ou nenhuma informação a respeito dos mecanismos de citotoxicidade induzidos pelas sulfonamidas nas células leucêmicas. Assim, a investigação de vias envolvidas na morte celular, como a apoptose intrínseca e extrínseca, e do bloqueio do ciclo celular, são importantes ferramentas que podem auxiliar na compreensão dos mecanismos antileucêmicos induzidos por sulfonamidas ou seus derivados.

2.6 O USO DE LINHAGENS CELULARES NA PESQUISA DE NOVOS FÁRMACOS

A complexidade e a diversidade dos distúrbios que caracterizam as neoplasias malignas demonstram como o câncer é uma doença heterogênea. Existem diferentes tipos de tumores, cada um deles com uma histopatologia característica, além de inúmeras variações genéticas e sintomas clínicos associados a diferentes tipos de câncer. Assim, são inúmeros os desafios envolvidos na compreensão dessa doença, bem como no desenvolvimento de novas terapias e na elucidação dos mecanismos de ação dos quimioterápicos disponíveis (FERREIRA; ADEGA; CHAVES, 2013). Por esse motivo, há um grande investimento financeiro em estudos pré-clínicos e clínicos na tentativa de

compreender os efeitos de novos compostos com potencial para se tornarem novos fármacos antitumorais (WILDING; BODMER, 2014).

Os estudos pré-clínicos com modelos biológicos têm como objetivo englobar as principais características moleculares do câncer, assim como as possíveis respostas terapêuticas do composto que está sendo avaliado. Entretanto, nem sempre isso é possível e, nesse sentido, as linhagens celulares derivadas de neoplasias humanas possibilitam um modelo experimental acessível utilizado amplamente no desenvolvimento de novos quimioterápicos (IORIO et al., 2016).

Iorio et al. (2016) em seu artigo intitulado “Um Panorama das Interações Farmacogenômicas no Câncer” (do inglês, *A Landscape of Pharmacogenomic Interactions in Cancer*) revelou os resultados de um estudo onde foram avaliados diversos aspectos do câncer (mutações somáticas, hipermetilação) em um total de 11.289 amostras tumorais de 29 tipos de tumor. O trabalho foi realizado com o objetivo de definir um catálogo com informações clínicas relevantes a respeito de alterações oncogênicas relacionadas aos diferentes tipos de câncer. Essas alterações oncogênicas foram analisadas como possíveis preditivos da sensibilidade a fármacos em 1001 linhagens celulares diferentes, com 265 compostos antineoplásicos. Nesse estudo foram levados em consideração os seguintes parâmetros: (1) até que ponto as linhagens celulares recapitulam as alterações oncogênicas; (2) quais alterações oncogênicas são associadas à sensibilidade a fármacos; (3) se determinadas combinações de múltiplas alterações esclarecem melhor a sensibilidade a fármacos; e (4) a contribuição relativa dos dados moleculares na previsão da resposta ao medicamento. Os resultados desse estudo revelaram que as linhagens celulares recapitulam fielmente as alterações oncogênicas relacionadas aos tumores avaliados, e que muitas delas também apresentam sensibilidade/resistência aos fármacos testados, o que reforça a importância do uso de linhagens celulares na avaliação da resposta a fármacos (IORIO et al., 2016).

Ainda que existam algumas limitações no uso experimental de linhagens celulares, tais como a perda de grande parte da heterogeneidade presente em um tumor primário ou a ausência de componentes imunológicos, os quais podem ser adicionados ao cultivo, a investigação do efeito citotóxico em linhagens celulares é uma ferramenta importante para o desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos, pois possibilita a aplicação de testes para avaliar os mecanismos de resistência e sensibilidade de agentes quimioterápicos e, consequentemente, o desenvolvimento de moléculas mais efetivas e específicas. Além disso, os estudos com células *in vitro* possibilitam

avaliar os mecanismos reguladores da proliferação celular, vias celulares envolvidas, mecanismos implicados na apoptose, entre outros fatores importantes associados a neoplasias. De fato, a investigação de novos fármacos antineoplásicos em linhagens celulares é comumente realizada antes de se partir para modelos *in vivo*, os quais também apresentam limitações, principalmente pela quantidade proibitiva de animais que seria necessária para determinados testes (FERREIRA et al., 2013; WILDING; BODMER, 2014). Assim, nos últimos anos há uma tendência em reduzir o sofrimento dos animais utilizados experimentalmente e, nesse contexto, o foco é, principalmente, a substituição de animais por técnicas baseadas no cultivo celular ou de tecidos (SRIVASTAVA et al., 2018).

No presente trabalho foram utilizadas duas linhagens de LAs humanas – K562 (LMA secundária a leucemia mieloide crônica (LMC)) e Jurkat (LLA). Por serem células neoplásicas de origem hematológica, essas linhagens são cultivadas em suspensão, ou seja, não necessitam de uma superfície aderente para o seu cultivo, assim, não requerem métodos enzimáticos para realizar subcultivos, o que pode ser feito de maneira mais rápida e menos traumática para as células em comparação com o cultivo de células aderentes (FRESHNEY, 2016).

As células K562 são uma linhagem mieloblástica isolada em 1970, a partir de uma efusão pleural de uma paciente de 53 anos de idade com LMC em crise blástica terminal. As células malignas haviam se acumulado também em outros órgãos, onde formaram massas tumorais. Os blastos presentes nessa linhagem são altamente indiferenciados e são derivados de um clone de células malignas com alta capacidade proliferativa. Devido à agressividade e extensão do infiltrado maligno, sugeriu-se que havia uma alteração acentuada das células leucêmicas originais. Além disso, as células K562 apresentam positividade para o gene de fusão BCR-ABL, o qual possui alta atividade de tirosina cinase e é capaz de causar distúrbios em várias vias de sinalização e provocar aumento da proliferação celular, bloqueio na diferenciação e resistência à morte (LOZZIO; LOZZIO, 1975; EPSTEIN et al., 1988; KANG et al., 2016).

Já as células Jurkat (inicialmente chamadas de JM, iniciais do paciente) compreendem uma linhagem de linfoblastos isolados do SP de um paciente de 14 anos de idade com LLA do subtipo T em sua primeira recidiva, em 1976 (SCHNEIDER; SCHWENK; BORNKAMM, 1977).

Com intuito de descobrir novos agentes antileucêmicos, ambas as linhagens são amplamente utilizadas em estudos de citotoxicidade de

diversos compostos, como por exemplo compostos naturais de origem marinha (YUAN et al., 2017), extratos naturais ou compostos isolados de origem vegetal (ESMAEILBEIG; KOUHPAYEH; AMIRGHOFAN, 2015; MAIORAL et al., 2018), lipopeptídios bacterianos (ZHAO et al., 2018), compostos sintéticos (BUBNIAK et al., 2017; CABRERA et al., 2015; MAIORAL et al., 2017; MURAKAMI et al., 2017; STEFANES et al., 2018) ou ainda o sinergismo com fármacos já estabelecidos (DU et al., 2017), entre outros tipos de compostos.

No LOEH, as linhagens K562 e Jurkat são utilizadas para investigar o potencial antileucêmico de diversos compostos, tanto de origem natural, como sintéticos. Entre os compostos sintéticos, estão as imidas cíclicas, sulfonil-hidrazonas e as sulfonamidas (MACHADO et al., 2013; BIGOLIN, 2016). Assim, neste trabalho foi investigado o efeito citotóxico de novas sulfonamidas sintéticas sobre as linhagens K562 e Jurkat, e os mecanismos envolvidos na indução da morte dessas células, de forma a contribuir com informações relevantes a respeito da atividade antileucêmica desta classe de fármacos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito citotóxico de uma série de sulfonamidas sintéticas sobre as células de linhagens de LAs humanas K562 (LMA) e Jurkat (LLA) e selecionar os compostos mais citotóxicos para a investigação dos seus principais mecanismos de morte celular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a triagem de 17 sulfonamidas sintéticas em células de LMA K562 e selecionar aquelas com maior potencial citotóxico;
- Determinar o efeito citotóxico das sulfonamidas selecionadas em relação à concentração e ao tempo de incubação sobre as linhagens de LMA K562 e de LLA Jurkat e calcular a concentração inibitória 50% (CI50);
- Avaliar se as sulfonamidas selecionadas induzem morte celular por apoptose nas células K562 e Jurkat;
- Verificar o efeito das sulfonamidas selecionadas sobre células do SP de indivíduos considerados saudáveis: pela capacidade de causar lise em eritrócitos humanos e também pela avaliação da citotoxicidade em células mononucleadas humanas;
- Determinar o índice de seletividade da sulfonamida de menor CI50 nas células K562 e Jurkat em comparação às células mononucleadas;
- Analisar o efeito da sulfonamida com menor CI50 sobre o ciclo celular das células de LAs K562 e Jurkat;
- Investigar se a citotoxicidade da sulfonamida selecionada envolve os seguintes fatores reguladores de apoptose: potencial de membrana mitocondrial, proteína antiapoptótica Bcl-2, proteína pró-apoptótica Bax, receptor Fas (FasR), fator indutor de apoptose (AIF) e caspase-3 nas células K562 e Jurkat.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

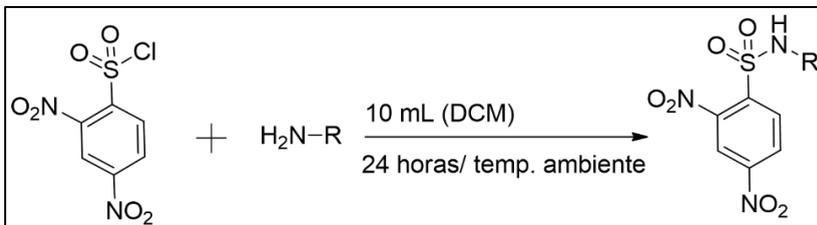
4.1 ORIGEM DAS SULFONAMIDAS INVESTIGADAS

Uma série de 17 sulfonamidas derivadas do cloreto de 2,4-dinitrobenzenosulfonila, denominada série **IE68**, foi sintetizada pelo doutorando Luiz Felipe Schmitz de Souza, do Laboratório de Estrutura e Atividade (LEAT) do Departamento de Química da UFSC, coordenado pelo Prof. Dr. Ricardo José Nunes, e gentilmente cedidas ao Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH).

Todos os reagentes utilizados na síntese das sulfonamidas foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (Brasil), e sintetizados conforme descrito por Oliveira et al. (2014). Brevemente, para a síntese dos compostos (Figura 6) foi adicionado 1 mmol (266,62 mg) de cloreto de 2,4-dinitrobenzenosulfonila com 2 mmol de diferentes aminas previamente selecionadas (Figura 7). Os reagentes foram colocados sob agitação magnética durante 24 horas em temperatura ambiente com 10 mL de diclorometano (DCM) como solvente. Para formar as sulfonamidas derivadas das aminas (DI) e (3A114), foram necessários 2 mmol de cloreto 2,4-dinitrobenzenosulfonila e 1 mmol das respectivas aminas. Todas as reações foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada (CCD). Em seguida, evaporou-se o DCM, adicionou-se 10 mL de metanol e verteu-se a solução sobre gelo. Os precipitados foram filtrados e secos em estufa a 50°C.

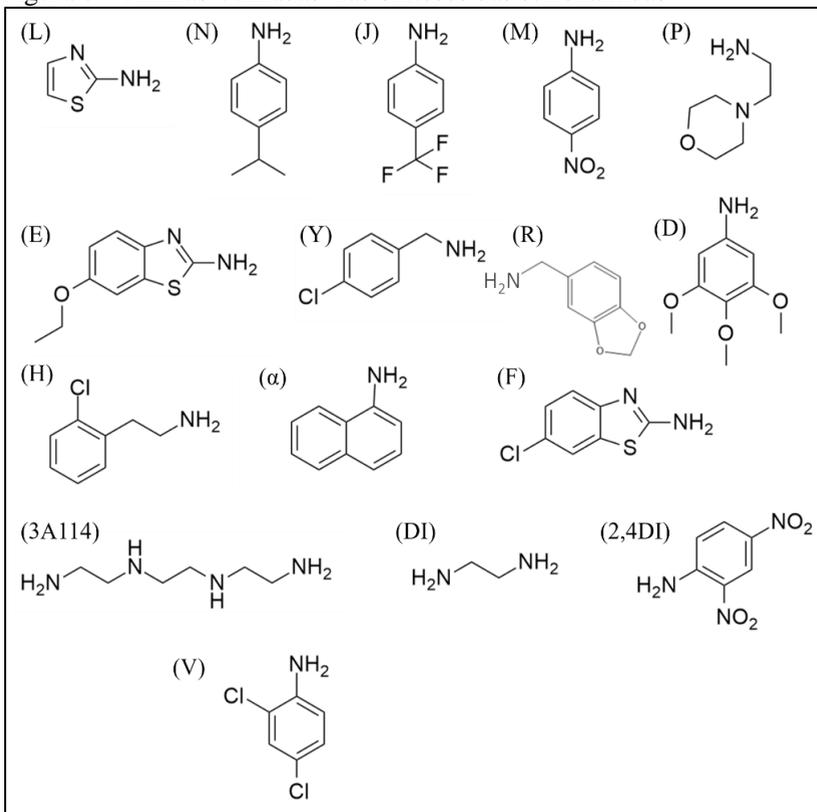
Após a síntese química, as 17 sulfonamidas foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 10 mM para o preparo das respectivas soluções estoque (SE), e armazenadas a 4°C para a realização dos experimentos.

Figura 6 – Síntese das sulfonamidas derivadas do cloreto de 2,4-dinitrobenzenosulfonila.



Fonte: A autora.

Figura 7 – Aminas utilizadas nas sínteses das sulfonamidas.



Fonte: A autora.

4.2 CULTIVO CELULAR

Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens de células de LAs de origem humana: K562 (LMA) e Jurkat (LLA-T). Ambas as linhagens foram cedidas pelo Prof. Dr. Alberto Orfao, do *Cientro de Investigación del Cancer* da Universidade de Salamanca. As células foram mantidas em frascos plásticos de cultura celular em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂ e cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, pH 7,2, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado, acrescido de 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Todos os reagentes citados acima foram adquiridos da Gibco® (Brasil).

A cada 48 horas, as células foram repicadas em cabine de segurança biológica. Para cada experimento, a suspensão celular foi centrifugada a 300 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspenso em meio de cultura para a contagem de células viáveis pelo método de exclusão com Azul de Trypan (TENNANT, 1964). Foram utilizadas nos experimentos apenas amostras com pelo menos 90% de viabilidade.

4.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO COLORIMÉTRICO DO MTT

A viabilidade celular das linhagens de LA K562 e Jurkat após incubação com as sulfonamidas incluídas neste estudo foi determinada pelo ensaio colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este método é baseado na redução do sal de MTT, de coloração amarela, a formazana, de coloração roxa, pela ação das mitocôndrias metabolicamente ativas. Assim, o precipitado de formazana gerado é proporcional à atividade mitocondrial e reflete a viabilidade celular da amostra (MOSMANN, 1983).

Após cada protocolo experimental, as placas contendo as células incubadas com as sulfonamidas foram centrifugadas a 300 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se novo meio de cultura contendo 10% (v/v) de solução de MTT (5 mg/ml em PBS). A seguir, as placas com as células foram incubadas por três horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. O precipitado de formazana produzido foi dissolvido em 100 µL de solução de álcool isopropílico/HCl 0,04 N, e as densidades ópticas foram detectadas em espectrofotômetro *Microwell Systems* (Organon Teknika, Belgium) no comprimento de onda de 540 nm. A densidade óptica dos grupos

controle (células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular.

4.4 TRIAGEM DAS 17 SULFONAMIDAS

Inicialmente foi realizada a triagem das 17 sulfonamidas em células K562 a fim de selecionar os compostos mais citotóxicos. As células foram semeadas a uma densidade de 5×10^4 células por poço em placas de 96 poços, e incubadas por 24 horas com RPMI (grupo controle, células sem tratamento), RPMI acrescido de 2% de DMSO (veículo) e RPMI acrescido de $100 \mu\text{M}$ de cada uma das 17 sulfonamidas sintetizadas. Após o período de incubação, foi realizado o ensaio do MTT conforme descrito anteriormente. As três sulfonamidas que apresentaram a maior redução da viabilidade celular foram selecionadas para a realização de curvas de concentração e tempo-resposta e avaliação do tipo de morte celular por microscopia de fluorescência em células K562 e Jurkat, e para avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos de indivíduos saudáveis.

4.5 CURVAS CONCENTRAÇÃO E TEMPO-RESPOSTA PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA 50 % (CI50)

Curvas de concentração e tempo-resposta foram realizadas com o objetivo de determinar a concentração necessária dos compostos para reduzir a viabilidade das células em 50% em diferentes períodos de tempo. Para tanto, as células K562 e Jurkat foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas com RPMI (grupo controle, células sem tratamento), RPMI acrescido de 2% de DMSO (veículo) e RPMI acrescido de 1 a $100 \mu\text{M}$ das três sulfonamidas selecionadas, por 12, 24 e 48 horas. As densidades celulares semeadas em cada poço para as linhagens K562 e Jurkat foram: 1×10^5 e 2×10^5 (12 horas), 5×10^4 e 1×10^5 (24 horas), $2,5 \times 10^4$ e 5×10^4 (48 horas), respectivamente. Após cada período de incubação, as células foram submetidas ao ensaio colorimétrico do MTT, conforme descrito anteriormente. Para calcular as CI50, os gráficos gerados a partir dos valores em porcentagem da viabilidade celular versus a concentração foram plotados, e foi realizada a análise de regressão linear dos mesmos utilizando-se o *software GraphPad Prism 5*.

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO HEMOLÍTICO DAS SULFONAMIDAS SELECIONADAS

O teste de hemólise é realizado com a finalidade de avaliar se um determinado fármaco ou protótipo poderá ser administrado com segurança por via endovenosa, pois avalia a capacidade do composto em induzir lise em eritrócitos saudáveis (CHOI et al., 2011). Assim, a atividade hemolítica das três sulfonamidas selecionadas foi avaliada em amostras de SP de quatro voluntários não fumantes e considerados saudáveis (adaptado de BUBNIAK et al., 2017; MAIORAL et al. 2017), conforme o Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da UFSC (CEPSH n°2.838.107/2018) (Anexo A).

As amostras de SP foram coletadas por punção venosa em tubo contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e centrifugadas a 300 x g por 10 minutos. Os sobrenadantes contendo o plasma e a camada de leucócitos foram descartados e os eritrócitos foram lavados duas vezes com solução salina (NaCl 0,9%) e ressuspendidos para obter uma dispersão estoque. A absorbância da dispersão estoque foi lida em espectrofotômetro a 540 nm e a diluição foi ajustada até obter-se valores entre 1.800 e 2.200.

Para cada amostra foram preparados três tubos conforme descrito a seguir. Assim, a 50 µL da dispersão estoque de eritrócitos foram adicionados:

950 µL de salina (controle negativo, considerado como 100% de integridade da membrana eritrocitária);

950 µL de água (controle positivo, considerado como 0% de integridade da membrana eritrocitária);

950 µL de salina contendo concentrações crescentes das três sulfonamidas selecionadas, as quais variaram entre 5 a 125 µM, de acordo com as CI50 obtidas das curvas de concentração e tempo-resposta de 24 horas para cada composto.

As amostras foram incubadas em termobloco sob agitação leve (100 x g) por uma hora a 37°C e, em seguida, centrifugadas a 150 x g por cinco minutos. A seguir, 100 µL do sobrenadante de cada amostra foram transferidos para placas de 96 poços e a leitura foi realizada em espectrofotômetro *Microwell Systems* (Organon Teknika, Belgium) a 540 nm. Os experimentos foram realizados em duplicata e comparados com o controle negativo.

Para calcular a taxa de hemólise foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{Taxa de hemólise} = \frac{Dt - Dcn}{Dcp - Dcn} \times 100$$

Onde:

Dt = densidade óptica do teste;

Dcn = densidade óptica do controle negativo;

Dcp = densidade óptica do controle positivo.

4.7 AVALIAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Neste ensaio para a observação da morfologia celular por microscopia de fluorescência são utilizados dois corantes fluorescentes: laranja de acridina (LAcr) e brometo de etídio (BE). O corante LAcr é permeável à membrana citoplasmática intacta das células e se intercala ao DNA celular conferindo fluorescência verde. Já o BE é impermeável a membranas intactas, e é capaz de se intercalar ao DNA fragmentado das células que apresentam lise de membrana, conferindo-lhes fluorescência laranja. Assim, é possível diferenciar por microscopia de fluorescência as células viáveis de células em apoptose e necrose (ROGER et al., 1996).

As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/ poço) foram semeadas em placas de seis poços e incubadas por 12 horas com RPMI (grupo controle, células sem tratamento) e RPMI acrescido das três sulfonamidas selecionadas na triagem. Para cada sulfonamida, foram utilizadas as concentrações determinadas pelas curvas de concentração e tempo-resposta em 24 horas (CI₅₀_{24h}). Após o período de incubação, as células foram centrifugadas a $300 \times g$ por 10 minutos, lavadas com PBS e o sedimento celular foi ressuspenso em uma solução de BE (5 µg/ml) e LAcr (10 µg/ml) na proporção 1:1. Em seguida, foram transferidos 15 µL das suspensões celulares para lâminas de vidro, as quais foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-FLA), usando objetiva de 40x.

4.8 AVALIAÇÃO DA EXTERNALIZAÇÃO DOS RESÍDUOS DE FOSFATIDILSERINA (FS)

Um dos primeiros sinais do processo apoptótico é a externalização dos resíduos de fosfatidilserina (FS) na membrana

plasmática celular, os quais se ligam a Anexina V, e, dessa forma, é possível identificar e quantificar as células apoptóticas (KOOPMAN et al., 1994; VAN ENGELAND et al., 1998).

A partir desta etapa experimental, a sulfonamida que obteve os menores valores de CI50 foi selecionada para os ensaios seguintes. Neste trabalho foi utilizado o kit de Anexina V conjugada ao fluorocromo FITC (BD Pharmingen®, USA). Brevemente, as células K562 e Jurkat (1×10^6 células/ poço) foram incubadas por 12 horas em placas de seis poços com RPMI (grupo controle, células sem tratamento) e RPMI acrescido do composto selecionado, com sua CI50_{24h}. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas duas vezes a 300 x g por 10 minutos e ressuspensas em 1 mL de PBS. Foram adicionados 5 µL de Anexina V conjugada a FITC em 100 µL dessa suspensão, em seguida as células foram gentilmente agitadas em agitador de tubos e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente sob abrigo da luz. Após o período de incubação, foram adicionados 400 µL de PBS e as células foram analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems*). Foram adquiridos 10.000 eventos e os *doublets* foram retirados utilizando-se as características de *FSC High* e *FSC Area*. Os dados gerados foram analisados no *software Infinicyt* versão 1.7 (Cytognos®).

4.9 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS MONONUCLEADAS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

A avaliação da citotoxicidade em células mononucleadas permite determinar se um composto é mais seletivo para células tumorais do que para células não tumorais (MACHANA et al., 2011; PEÑA-MORÁN et al., 2016).

Assim, a sulfonamida selecionada foi avaliada quanto ao efeito citotóxico em células mononucleadas de SP de três voluntários não fumantes e considerados saudáveis, conforme o Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da UFSC (CEPSH nº2.838.107/2018).

As amostras foram coletadas por punção venosa em tubo contendo EDTA e processadas em até 30 minutos após a coleta. Inicialmente, diluiu-se cada amostra de SP em tampão fosfato-salino (PBS) na proporção 1:2. Em seguida, cada amostra diluída foi colocada sobre *Ficoll-Hypaque* (densidade 1.077 g/m³, Sigma-Aldrich®, EUA) e centrifugada a 300 x g por 30 minutos. Após a separação das células pelo gradiente de densidade, o plasma foi descartado e a interfase

contendo as células mononucleadas foi transferida para um novo tubo cônico. As células mononucleadas foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspendidas em RPMI para a contagem de células viáveis pelo método de exclusão com Azul de Trypan. Foram utilizadas apenas amostras que obtiveram pelo menos 90% de células viáveis. As células foram semeadas a uma densidade de $7,5 \times 10^5$ células por poço em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas com RPMI (grupo controle, células sem tratamento), RPMI acrescido de DMSO (veículo) e RPMI acrescido do composto selecionado, nas concentrações de 1, 2,5, 5 e 10 μM . Após o período de incubação, as células foram submetidas ao ensaio do MTT para avaliar a viabilidade, conforme descrito anteriormente, e a densidade óptica do grupo controle foi considerada como 100% de viabilidade celular. Para calcular a $\text{CI}_{50_{24\text{h}}}$ do composto nas células mononucleadas, os gráficos gerados a partir dos valores em porcentagem da viabilidade celular versus a concentração foram plotados, e foi realizada análise de regressão linear dos mesmos utilizando-se o *software GraphPad Prism 5*. Para determinar o IS do composto, foi calculada a razão entre a $\text{CI}_{50_{24\text{h}}}$ das células mononucleadas e a $\text{CI}_{50_{24\text{h}}}$ das linhagens de leucemia, conforme a equação a seguir (MACHANA et al., 2011; PEÑA-MORÁN et al., 2016):

$$IS = \frac{\text{CI}_{50_{24\text{h}}} \text{ células mononucleadas}}{\text{CI}_{50_{24\text{h}}} \text{ linhagens de leucemia}}$$

4.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS SULFONAMIDAS SELECIONADAS SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Para avaliar o efeito da sulfonamida selecionada sobre o potencial de membrana mitocondrial das células K562 e Jurkat, foi utilizado o kit *MitoView 633* (Biotium®, USA). Nesse kit o corante fluorescente de coloração vermelha é permeável à membrana mitocondrial onde se acumula em células viáveis emitindo fluorescência, o que permite a avaliação da integridade do potencial mitocondrial.

As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/ poço) foram incubadas por 12 horas em placas de seis poços com RPMI (grupo controle, células sem tratamento) e RPMI acrescido do composto selecionado, com sua $\text{CI}_{50_{24\text{h}}}$. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas a $300 \times g$ por 10 minutos e lavadas com PBS. O sobrenadante foi

descartado e o sedimento celular foi ressuspensionado em 300 μ L de solução de *MitoView* diluído em PBS (1:10.000) segundo as recomendações do fabricante. Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos em geladeira, centrifugadas e ressuspensionadas em PBS para a aquisição no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems*). Foram adquiridos 10.000 eventos e os *doublets* foram retirados utilizando-se as características de *FSC High* e *FSC Area*. Os dados gerados foram analisados no *software Infinicyt* versão 1.7 (Cytognos®).

4.11 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

Para avaliar se os mecanismos de citotoxicidade induzidos pela sulfonamida selecionada envolvem o bloqueio do ciclo celular, as células K562 e Jurkat (1×10^6 células/ poço) foram incubadas por 24 horas em placas de seis poços com RPMI (grupo controle, células sem tratamento) e RPMI acrescido do composto selecionado, com sua respectiva CI50_{24h}. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS, fixadas com etanol 70% e mantidas por 30 minutos em geladeira. Para reduzir ligações inespecíficas, as células foram lavadas com solução de PBS e albumina sérica bovina (BSA) a 2% e centrifugadas a 300 x g. A seguir, as células foram ressuspensionadas em 500 μ L de iodeto de propídio (IP) com RNase (*PI/RNase solution kit*) (Sigma-Aldrich®, USA) e mantidas sob o abrigo da luz durante 15 minutos, em temperatura ambiente, conforme as instruções do fabricante. Por fim, as células foram analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems*). Foram adquiridos 10.000 eventos com *gate* no canal PE (510-595 nm) e os *doublets* foram retirados utilizando-se as características de *FSC High* e *FSC Area*. Os dados gerados foram analisados no *software Infinicyt* versão 1.7 (Cytognos®).

4.12 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA MORTE CELULAR POR APOPTOSE

As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/ poço) foram incubadas por 12 horas (para avaliação de Bax, Bcl-2, Survivina, AIF e FasR) ou 24 horas (para avaliação de Caspase-3 ativada) em placas de seis poços com RPMI (grupo controle, células sem tratamento) e RPMI acrescido do composto selecionado, com sua respectiva CI50_{24h}. Para a avaliação da expressão de proteínas intracelulares, após o período de incubação, as

células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 100 μ L do reagente fixador/permeabilizante do kit *BD Fix/Perm* (BD Biosciences, USA). Posteriormente, as células foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente e, após o período de incubação, foram lavadas com PBS e ressuspensas em 100 μ L de tampão de lavagem (kit *BD Fix/Perm*) acrescido de cada anticorpo conjugado ao seu respectivo fluorocromo (anti-Bax-PerCP (Santa Cruz Biotechnology®, USA), anti-Bcl-2-FITC (EXBIO Praha® a. s., Czech Republic), anti-Survivina-PE (Santa Cruz Biotechnology®, USA), anti-AIF-FITC (Santa Cruz Biotechnology®, USA) e anti-Caspase-3 ativada-V450 (BD Biosciences®, USA)), seguida de nova incubação por mais 15 minutos. Para avaliar a expressão da proteína de membrana FasR, após o período de incubação com a sulfonamida as células foram lavadas, ressuspensas em 100 μ L de PBS com anticorpo anti-FasR conjugado a PE (EXBIO Praha® a. s., Czech Republic), e incubadas por 15 minutos, conforme as instruções do fabricante. Por fim, todas as amostras foram lavadas com PBS, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos celulares foram ressuspensos em 400 μ L de PBS para análise no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems*). Foram adquiridos 10.000 eventos e os *doublets* foram retirados utilizando-se as características de *FSC High* e *FSC Area*. Os dados gerados foram analisados no *software Infinicyt* versão 1.7 (Cytognos®).

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados obtidos foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) e repetidos pelo menos duas vezes de forma independente. Em todas as análises foi adotado um nível de significância mínimo de 5% em relação aos grupos controle e as análises estatísticas foram realizadas no *software GraphPad Prism 5*. Para os ensaios de citotoxicidade das sulfonamidas nas linhagens K562 e Jurkat, nas células mononucleadas e nos eritrócitos, foi realizada análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, complementadas pelo pós-teste de Bonferroni. Na análise do efeito das sulfonamidas sobre o ciclo celular das linhagens K562 e Jurkat, foi realizada análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de pós-teste de Tukey. Para avaliar alterações no potencial de membrana mitocondrial, na exposição de resíduos de FS e na expressão de proteínas envolvidas na apoptose, foi utilizado o teste *t* de Student.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 TRIAGEM DAS 17 SULFONAMIDAS SINTÉTICAS

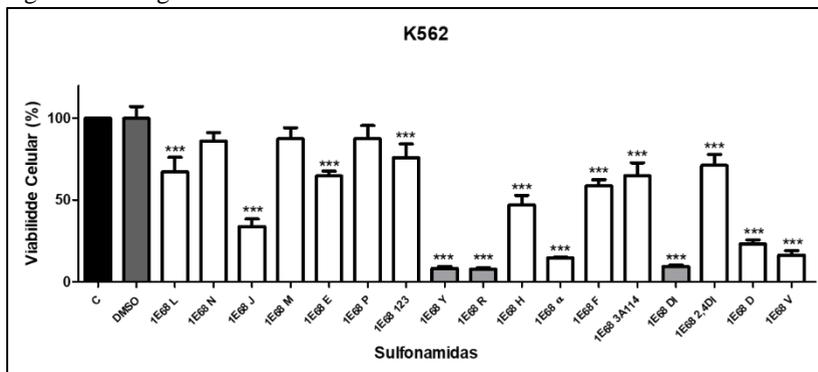
As sulfonamidas foram os primeiros antimicrobianos de uso sistêmico a serem introduzidos no mercado, em meados da década de 1930. O sucesso obtido no tratamento de inúmeras infecções levou à investigação de novas sulfonamidas ao longo da história e, conseqüentemente, à descoberta de diversas outras atividades farmacológicas para esta classe de fármacos, incluindo ação diurética, antimalárica, antitumoral, entre outras (LESCH, 2007; ALAOUÍ et al., 2017; BHATI, 2017; DEBBABI et al., 2017; SUPURAN, 2017). Alguns dos estudos publicados na literatura relatam a atividade citotóxica de sulfonamidas em linhagens celulares de leucemias humanas, entretanto, existem poucas informações a respeito dos mecanismos de citotoxicidade exercidos pelas sulfonamidas sobre estas neoplasias (MADÁCSI et al., 2013; MARZANO et al., 2013; PINGAEW et al., 2015; BIGOLIN, 2016; OKSUZOGLU et al., 2016). Em um trabalho realizado anteriormente no LOEH foi demonstrada a atividade citotóxica de uma sulfonamida sintética (*N*-(3,3-difenilpropil)-2,4-dinitrobenzenosulfonamida) sobre linhagens de neoplasias hematológicas humanas, dentre as quais, as linhagens de LMA K562 e de LLA Jurkat. O composto investigado reduziu a viabilidade das linhagens de neoplasias hematológicas analisadas e induziu alterações características de apoptose nas mesmas (BIGOLIN, 2016). Considerando os resultados promissores obtidos por Bigolin (2016), para o presente estudo foi sintetizada uma série de 17 sulfonamidas derivadas de 2,4-dinitrobenzenosulfonila, cujo potencial citotóxico foi investigado nas linhagens de LAs humanas K562 e Jurkat.

Moléculas com potencial atividade antineoplásica podem ser investigadas pela realização de testes de triagem em diversas linhagens celulares, as quais fornecem um modelo acessível e alternativo ao uso de animais (KAZI et al., 2015; SRIVASTAVA et al., 2018). Assim, inicialmente foi avaliado o efeito das 17 sulfonamidas sintéticas sobre a linhagem de células de LMA K562, por essa ser considerada uma linhagem celular resistente (LOZZIO; LOZZIO, 1975). Foi utilizada uma concentração fixa de 100 µM de cada sulfonamida, as quais foram incubadas por 24 horas com as células K562, com objetivo de verificar quais eram citotóxicas para estas células.

Conforme pode ser observado na Figura 8, dentre as 17 sulfonamidas incluídas neste estudo, 14 delas reduziram

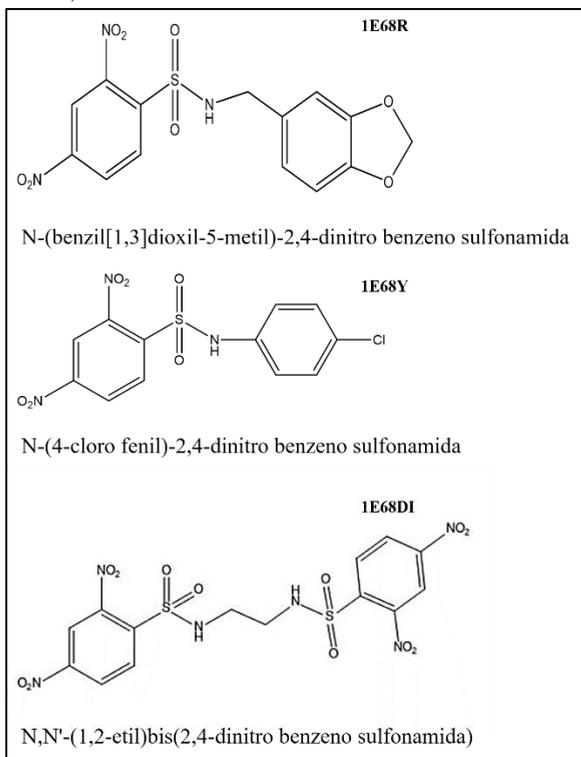
significativamente a viabilidade celular da linhagem de LMA K562. Dessas 14, as três sulfonamidas mais citotóxicas (Figura 9) foram selecionadas para a continuidade dos experimentos: 1E68Y, 1E68R e 1E68DI, as quais reduziram a viabilidade celular em 91,68%, 92,17% e 90,54%, respectivamente. Vale ressaltar que todas as três sulfonamidas selecionadas na triagem são inéditas.

Figura 8 – Triagem das 17 sulfonamidas sintéticas em células K562.



As células K562 (5×10^4 células/poço) foram incubadas com $100 \mu\text{M}$ de cada uma das 17 sulfonamidas por 24 horas. Após o período de incubação foi realizado o ensaio do MTT para avaliar a viabilidade celular. Cada ponto representa média \pm EPM de pelo menos três experimentos independentes. ***Diferença significativa com relação ao grupo controle, $p \leq 0,001$, ANOVA de uma via seguida de pós teste de Bonferroni.

Figura 9 – Estruturas químicas das sulfonamidas selecionadas na triagem, 1E68Y, 1E68R e 1E68DI.



Fonte: A autora.

Segundo a literatura, a solubilidade de um fármaco é uma característica essencial para a sua biodisponibilidade, pois está associada ao grau de absorção do mesmo e à sua ligação ao sítio ativo (BARAKAT, 2017) e, de maneira geral, a solubilidade está relacionada também à lipofilicidade da molécula (YAMAMOTO; IKEDA, 2016). Na Figura 9 pode-se observar que os três substituintes que geraram as sulfonamidas selecionadas contêm um anel benzênico em sua estrutura (além daquele ligado ao grupo sulfonamídico), o qual é responsável por aumentar a lipofilicidade das moléculas devido ao seu caráter não-polar (THOMAS, 2007). A lipofilicidade de uma molécula está associada à intensidade da mesma em penetrar membranas celulares e à capacidade de ligação a proteínas, que em sua maioria apresentam natureza hidrofóbica (ARNOTT; PLANEY, 2012). Por outro lado, grupos

funcionais que aumentam a hidrofiliçidade das moléculas também podem ampliar a ligação das mesmas ao alvo farmacológico, principalmente quando estes grupamentos apresentam a capacidade de formar ligações de hidrogênio, as quais, ao contrário das moléculas lipofílicas, aumentam a solubilidade dos compostos em meio aquoso (THOMAS, 2007; HARROLD; ZAVOD, 2013). Nesse sentido, ainda na Figura 9 pode-se observar que todos os três compostos selecionados na triagem possuem amidas secundárias em sua estrutura, as quais são conhecidas por sua capacidade de interagir com sítios ativos por meio de ligações de hidrogênio (PATRICK; SPENCER, 2009).

Ao analisar as estruturas químicas das três sulfonamidas selecionadas na triagem, 1E68Y, 1E68R e 1E68DI, o que difere entre elas são as substituições feitas no nitrogênio do grupo sulfonamídico. Assim, esses substituintes podem contribuir para a atividade citotóxica das diferentes sulfonamidas.

Com relação ao composto 1E68R, a substituição no nitrogênio do grupo sulfonamídico foi feita por um grupamento 1,3-benzodioxol (um radical metilenodioxo ligado ao anel benzeno), cuja estrutura está presente em alguns fármacos como a podofilotoxina, a qual possui efeito antimetabólico (SACKETT, 1993). A presença de um grupamento benzodioxol pode melhorar o perfil farmacocinético e farmacodinâmico de um candidato a fármaco, pois gera compostos com propriedades lipofílicas mais adequadas e com caráter aceptor de ligações de hidrogênio (DE-SÁ-JÚNIOR et al., 2013). O radical metilenodioxo é um heterociclo, devido à presença dos heteroátomos de oxigênio, o qual é capaz de interagir com sítios de ligação por meio de ligações hidrofóbicas e, no caso dos átomos de oxigênio, podem interagir com ligações de hidrogênio. O metotrexato é um exemplo de fármaco antileucêmico que possui um heterociclo em sua estrutura, o qual é responsável por formar ligações de hidrogênio que interagem com o sítio ativo (THOMAS, 2007; PATRICK; SPENCER, 2009). Além disso, a atividade citotóxica de compostos aromáticos com presença de heterociclos em suas estruturas foi demonstrada recentemente em células K562 (ZHANG et al., 2016).

Quanto à sulfonamida 1E68Y, a substituição no nitrogênio do grupo sulfonamídico foi realizada com um radical clorobenzeno. O átomo de cloro pertence à família dos halogênios, e, de acordo com a literatura, a inserção de grupamentos halogenados resulta em moléculas mais lipofílicas. Assim, átomos de halogênio são usados para melhorar a penetração do fármaco em membranas lipídicas. Além disso, os grupos halogênicos aromáticos, como é o caso do clorobenzeno, são muito

menos reativos que os grupos halógenos alifáticos. Ainda, a inserção de um átomo de cloro pode prevenir a oxidação de anéis aromáticos, pois o cloro é um forte acceptor de elétrons (THOMAS, 2007). A atividade antileucêmica de compostos com clorobenzeno em sua estrutura já foi relatada em estudo pré-clínico com modelos murinos de LMA (BAVETSIAS et al., 2012) e em estudos *in vitro* com linhagens humanas de LLA (BORYCZKA et al., 2010).

A síntese do composto 1E68DI deu origem a uma dissulfonamida, cuja molécula resultante, além de apresentar dois grupamentos sulfonamídicos, possui quatro grupamentos nitro (NO₂), os quais apresentam diversas atividades farmacológicas descritas na literatura, como antimicrobiana, antiparasitária, fungicida e antineoplásica. O grupo nitro possui uma forte capacidade de atração de elétrons, o que facilita a interação com proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos e enzimas. Além disso, o grupo nitro pode sofrer redução enzimática, o que dá origem a espécies reativas que podem provocar efeitos biológicos (NEPALI; LEE; LIU, 2018). O efeito antineoplásico de compostos que contêm grupamentos nitro em sua estrutura pode ocorrer por diversos mecanismos, como pela inibição da topoisomerase (SINGH et al., 2003), alquilação do DNA (ZHU et al., 2011) ou inibição da polimerização da tubulina (ZHENG et al., 2016). A citotoxicidade *in vitro* de compostos com substituintes nitro já foi demonstrada em linhagens de LMA (TAVAKOLFAR et al., 2016) e LLA (BORKOVA et al., 2016). É importante ressaltar que as três sulfonamidas selecionadas na triagem possuem grupamentos nitro em sua estrutura, pois para a síntese de 1E68Y e 1E68R, foi utilizado 1 mmol de cloreto de 2,4-dinitrobenzenosulfonila e para a síntese de 1E68DI, foram utilizados 2 mmol desse reagente. Assim, por este motivo a sulfonamida 1E68DI apresenta o dobro de grupamentos nitro em comparação aos outros dois compostos selecionados. Apesar de todas essas informações a respeito das sulfonamidas 1E68Y, 1E68R e 1E68DI, acredita-se que são necessários estudos adicionais para estabelecer com maior segurança uma relação entre a estrutura e a atividade dos compostos selecionados. Isso porque as considerações levantadas neste estudo são iniciais e baseadas apenas na comparação das estruturas dos compostos investigados com conhecimentos já estabelecidos na literatura para os grupamentos funcionais presentes nessas moléculas.

Ao considerar os resultados promissores encontrados na triagem para as sulfonamidas 1E68Y, 1E68R e 1E68DI, com redução de mais de 90% na viabilidade celular da linhagem K562 na concentração de 100 µM, na sequência foi avaliada a citotoxicidade dos três compostos

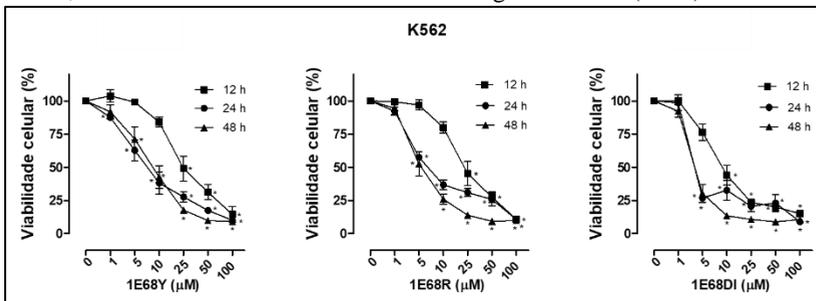
selecionados com relação ao tempo de incubação e à concentração dos mesmos sobre as linhagens de LA K562 e Jurkat.

5.2 CURVAS CONCENTRAÇÃO E TEMPO-RESPOSTA PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA 50 % (CI50)

Para determinar a citotoxicidade de um composto sobre determinado tipo de célula, é necessário realizar curvas de concentração e tempo-resposta com diferentes concentrações dos compostos e em diferentes períodos de incubação dos mesmos com as células incluídas no estudo. A partir dos dados obtidos, pode-se calcular a CI50, que representa a concentração da substância citotóxica necessária para induzir a morte de 50% da população analisada (SRIVASTAVA et al., 2018).

Assim, para determinar a CI50 dos compostos selecionados na triagem, foram realizadas curvas com diferentes concentrações (1-100 μM) das sulfonamidas 1E68Y, 1E68R e 1E68DI, em células K562 e Jurkat, em períodos de 12, 24 e 48 horas. Conforme pode ser observado nas Figuras 10 e 11, as três sulfonamidas reduziram a viabilidade celular de maneira dependente do tempo e da concentração em ambas as linhagens de LAs avaliadas, cujas CI50 podem ser visualizadas nas Tabelas 1 e 2.

Figura 10 – Curvas concentração e tempo-resposta para as sulfonamidas 1E68Y, 1E68R e 1E68DI sobre células de linhagem de LMA (K562).

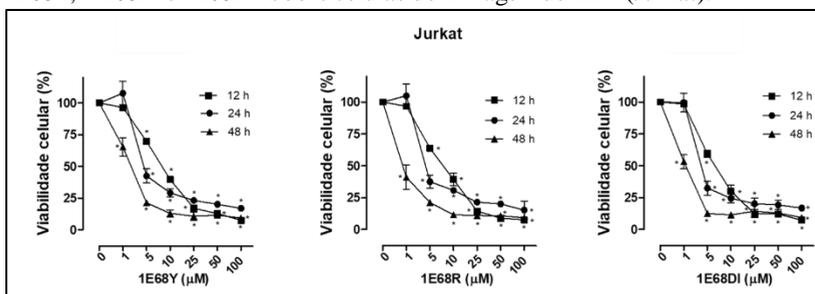


As células K562 foram incubadas com diferentes concentrações (1-100 μM) das sulfonamidas 1E68Y, 1E68R e 1E68DI por 12 (1×10^5 células/poço) ou 48 horas ($2,5 \times 10^4$ células/poço). Após o período de incubação foi realizado o ensaio do MTT para avaliar a viabilidade celular. Cada ponto representa média \pm EPM de pelo menos dois experimentos independentes. *Diferença significativa com relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, ANOVA de duas vias seguida de pós teste de Bonferroni.

Tabela 1 – Valores de CI50 obtidos em células K562 após incubação com diferentes concentrações das sulfonamidas 1E68Y, 1E68R e 1E68DI por 12, 24 e 48 horas.

Período de Incubação	CI50 (μM)		
	1E68Y	1E68R	1E68DI
12 horas	29,0 \pm 1,36	24,8 \pm 1,10	10,72 \pm 0,62
24 horas	7,9 \pm 0,44	8,1 \pm 0,45	4,4 \pm 0,66
48 horas	7,9 \pm 0,50	5,0 \pm 0,38	3,0 \pm 0,44

Figura 11 – Curvas concentração e tempo-resposta para as sulfonamidas 1E68Y, 1E68R e 1E68DI sobre células de linhagem de LLA (Jurkat).



As células Jurkat foram incubadas com diferentes concentrações das sulfonamidas 1E68Y, 1E68R e 1E68DI por 12 (2×10^5 células/poço), 24 (1×10^5 células/poço) ou 48 horas (5×10^4 células/poço). Após o período de incubação foi realizado o ensaio do MTT para avaliar a viabilidade celular. Cada ponto representa média \pm EPM de pelo menos dois experimentos independentes. *Diferença significativa com relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, ANOVA de duas vias seguida de pós teste de Bonferroni.

Tabela 2 – Valores de CI50 obtidos em células Jurkat após incubação com diferentes concentrações das sulfonamidas 1E68Y, 1E68R e 1E68DI por 12, 24 e 48 horas.

Período de Incubação	CI50 (μM)		
	1E68Y	1E68R	1E68DI
12 horas	8,0 \pm 0,40	7,1 \pm 0,39	6,0 \pm 0,45
24 horas	5,9 \pm 0,58	5,4 \pm 0,57	4,3 \pm 0,53
48 horas	1,7 \pm 0,44	0,8 \pm 1,49	1,1 \pm 1,80

Como pode ser observado nas Figuras 10 e 11 e nas Tabelas 1 e 2, de forma geral, o efeito citotóxico dos três compostos foi mais efetivo para a células Jurkat do que para as células K562. Sabe-se que as células K562 são originadas de uma LMA secundária a LMC e são positivas para o gene de fusão BCR-ABL, o qual está associado a aumento da proliferação celular, bloqueio na diferenciação e resistência à morte induzida pelo tratamento (LOZZIO; LOZZIO, 1975). Já a linhagem Jurkat, é originada de uma LLA-T em sua primeira recidiva (SCHNEIDER; SCHWENK; BORNKAMM, 1977). A diferença entre as doenças e a agressividade do gene BCR-ABL explica porque a linhagem K562 pode ser considerada mais resistente do que a linhagem Jurkat. De fato, diversos estudos que avaliaram a citotoxicidade de compostos nessas duas linhagens demonstraram que há uma tendência em se obter maiores valores de CI50 em células K562 do que em células Jurkat (BIGOLIN, 2016; BUBNIAK et al., 2017; MAIORAL et al., 2017).

Dentre os três compostos analisados, os valores de CI50 mais baixos foram obtidos com a sulfonamida 1E68DI (1,1 a 10,7 μM) em ambas as linhagens de LAs incluídas no estudo, o que pode estar associado à estrutura química dessa molécula. A sulfonamida 1E68DI contém quatro grupamentos nitro em sua estrutura, ou seja, dois a mais do que nas sulfonamidas 1E68R e 1E68Y. Sabe-se que o grupo nitro pode ser biorreduzido e produzir espécies reativas capazes de causar danos às células por estresse oxidativo, e a atividade antileucêmica com efeitos indutores de apoptose de compostos nitroaromáticos já foi relatada nas células de LLA Jurkat (SOARES et al., 2009; LOPES et al., 2015). Entretanto, não foram encontrados estudos que relatam a atividade antitumoral de compostos nitroaromáticos que sejam derivados de sulfonamida. Além da presença dos grupos nitro, a sulfonamida 1E68DI apresenta dois grupamentos sulfonamídicos (um a mais do que nas sulfonamidas 1E68R e 1E68Y), cada um ligado a um anel benzênico e, de acordo com a literatura, vários compostos derivados de sulfonamidas com um anel aromático em sua estrutura possuem atividade inibidora da anidrase carbônica, e, por esse motivo, são potenciais candidatos a fármacos para o tratamento de diversos tipos de câncer (AL-SAID et al., 2011). Além disso, o grupo sulfonamídico pode interagir com diversos alvos farmacológicos, como o DNA e aminoácidos (SUPURAN, 2017). Dessa forma, a presença de grupos nitro em maior quantidade, assim como os dois grupamentos sulfonamídicos em 1E68DI, podem contribuir para que sua atividade citotóxica seja mais acentuada com relação às outras duas sulfonamidas

selecionadas na triagem. Entretanto, são necessários estudos adicionais para estabelecer com maior segurança a relação entre a estrutura química dessas sulfonamidas e sua respectiva ação citotóxica para as linhagens K562 e Jurkat.

Na literatura são relatados diferentes limiares de CI50 para determinar se um composto apresenta atividade citotóxica ou não sobre a linhagem que está sendo avaliada. Entretanto, de forma geral, os compostos de maior impacto farmacológico apresentam valores de CI50 inferiores a 10 μM (HUGHES et al., 2011; KAMAL et al., 2011). O composto 1E68DI apresentou CI50 inferiores ou muito próximas a 10 μM para ambas as linhagens de LAs avaliadas no presente estudo, o que confirma seu potencial citotóxico.

Doungsoongnuen et al. (2011) avaliaram o efeito de análogos de sulfonamidas em uma linhagem de LLA-T (MOLT-3) e observaram a CI50 entre 15 e 34 $\mu\text{g/mL}$. Nesse estudo as células (1×10^4 por poço) foram incubadas com os compostos investigados por 72 horas. Já Pingaew et al. (2015) investigaram a ação citotóxica de 1,4 naftoquinonas conjugadas a sulfonamidas na mesma linhagem de LLA-T (MOLT-3) (1×10^4 a 2×10^4 células por poço por 48 horas) e observaram que a mais promissora apresentou CI50 de 1,37 μM . No estudo de Oksuzoglu et al. (2016) foi analisada a atividade antitumoral de sulfonamidas derivadas de benzoxazol em uma linhagem humana de leucemia promielocítica aguda (HL-60), e os compostos estudados apresentaram CI50 entre 0,5 e 25 μM . O estudo utilizou $7,5 \times 10^3$ células por poço, as quais foram incubadas com os compostos por 48 horas. Kamal et al. (2011), avaliaram os efeitos de sulfonamidas conjugadas com pirimidinas substituídas por anilino sobre células de LMA (K562) e os resultados demonstraram valores de CI50 entre 0,2 e 10 μM , em um protocolo onde foram utilizadas 1×10^4 células por poço, incubadas com os compostos por 24 horas. Ainda com relação à linhagem K562, Reddy et al. (2013) avaliaram a citotoxicidade de uma série de análogos de sulfonamidas de (E)-N-aril-2-diariletileno sobre essa linhagem ($2,5 \times 10^4$ células incubadas por 96 horas com os compostos) e os valores de CI50 apresentados variaram de 0,003 a 100 μM . Como pode ser observado, em todos os estudos mencionados acima a quantidade de células plaqueadas é inferior à utilizada no presente trabalho. A quantidade de células, o tempo de incubação com as mesmas e a estrutura molecular dos compostos analisados são fatores que parecem influenciar de forma direta na determinação de valores de CI50. De fato, como mostram as Tabelas 1 e 2, o aumento do tempo de incubação com os compostos resulta numa tendência em diminuir os valores de CI50. No presente

trabalho foram plaqueadas entre $2,5 \times 10^4$ a 2×10^5 células por poço em cada experimento, dependendo da linhagem e do tempo de incubação das células com as sulfonamidas, o que corresponde a pelo menos duas vezes mais do que o utilizado na maioria dos estudos citados anteriormente. Ainda assim, o composto 1E68DI apresentou valores de CI50 inferiores ou muito próximos a $10 \mu\text{M}$ em todas as condições avaliadas apesar do grande número de células utilizadas nos experimentos em comparação a outros estudos. Nesse sentido, é importante ressaltar que, em função da alta capacidade proliferativa das células neoplásicas, uma característica das LAs, em geral é observado um grande número de células leucêmicas na MO (ROSE-INMAN; KUEHL, 2014; MWIRIGI et al., 2017). Por esse motivo, neste estudo optou-se por utilizar um alto número de células das linhagens K562 e Jurkat para avaliar de forma mais fidedigna os efeitos dos compostos. Assim, este resultado sugere que a sulfonamida 1E68DI pode ser mais citotóxica do que as sulfonamidas investigadas recentemente na literatura em modelos de LAs.

Considerando as dificuldades encontradas nos tratamentos de LAs, tais como o desenvolvimento de resistência aos quimioterápicos, as altas taxas de recidiva e os severos efeitos adversos devido às altas doses de fármaco administradas, os resultados obtidos com as curvas de concentração e tempo-resposta são considerados baixos e bastante promissores, pois indicam que os compostos avaliados possuem atividade citotóxica em baixas concentrações.

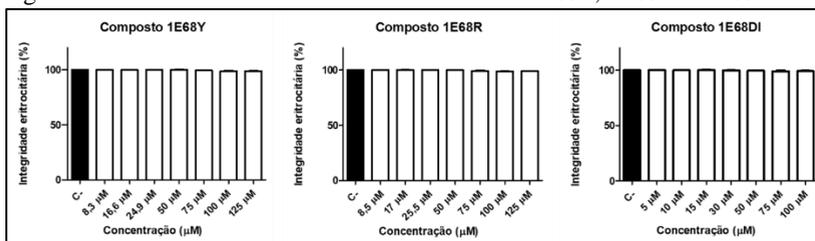
5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO HEMOLÍTICO DAS SULFONAMIDAS SELECIONADAS

Para averiguar se um novo composto potencialmente citotóxico poderá futuramente ser administrado de forma segura por via endovenosa, é importante avaliar a capacidade de hemólise *in vitro* como um resultado preliminar. Segundo a literatura, o teste de hemólise avalia a capacidade da molécula analisada de induzir a ruptura da membrana de eritrócitos saudáveis, com consequente liberação de hemoglobina (BEDNARCZUK et al., 2010; ALENCAR et al., 2015; PEREIRA et al., 2016).

Neste estudo, os eritrócitos de voluntários saudáveis foram incubados com concentrações crescentes dos compostos selecionados na triagem, 1E68Y, 1E68R e 1E68DI, as quais iniciaram a partir dos respectivos valores de CI50_{24h} obtidos na linhagem K562. Esses valores foram escolhidos como concentrações iniciais por ter sido nessa

linhagem que se obteve os maiores valores de CI50. A partir dos dados das taxas de hemólise, os gráficos foram plotados em função da porcentagem de integridade eritrocitária. Conforme pode ser observado na Figura 12, em comparação ao controle negativo, nenhuma das três sulfonamidas causou hemólise significativa, visto que a integridade eritrocitária foi próxima a 100% para todos os compostos nas concentrações avaliadas.

Figura 12 – Potencial hemolítico das sulfonamidas 1E68Y, 1E68R e 1E68DI.



Os eritrócitos foram incubados com concentrações crescentes de cada sulfonamida, a partir dos valores obtidos nas curvas de concentração e tempo-resposta de 24 horas em K562 de cada uma, e foi realizado o teste de hemólise. A taxa de hemólise foi calculada para cada composto e foi feita comparação com os controles negativos, representados pelos eritrócitos incubados com salina e considerados como 100% de integridade da membrana eritrocitária. Para análise estatística foi realizada ANOVA de uma via seguida de pós teste de Bonferroni. Foram considerados significativos valores $comp \leq 0,05$.

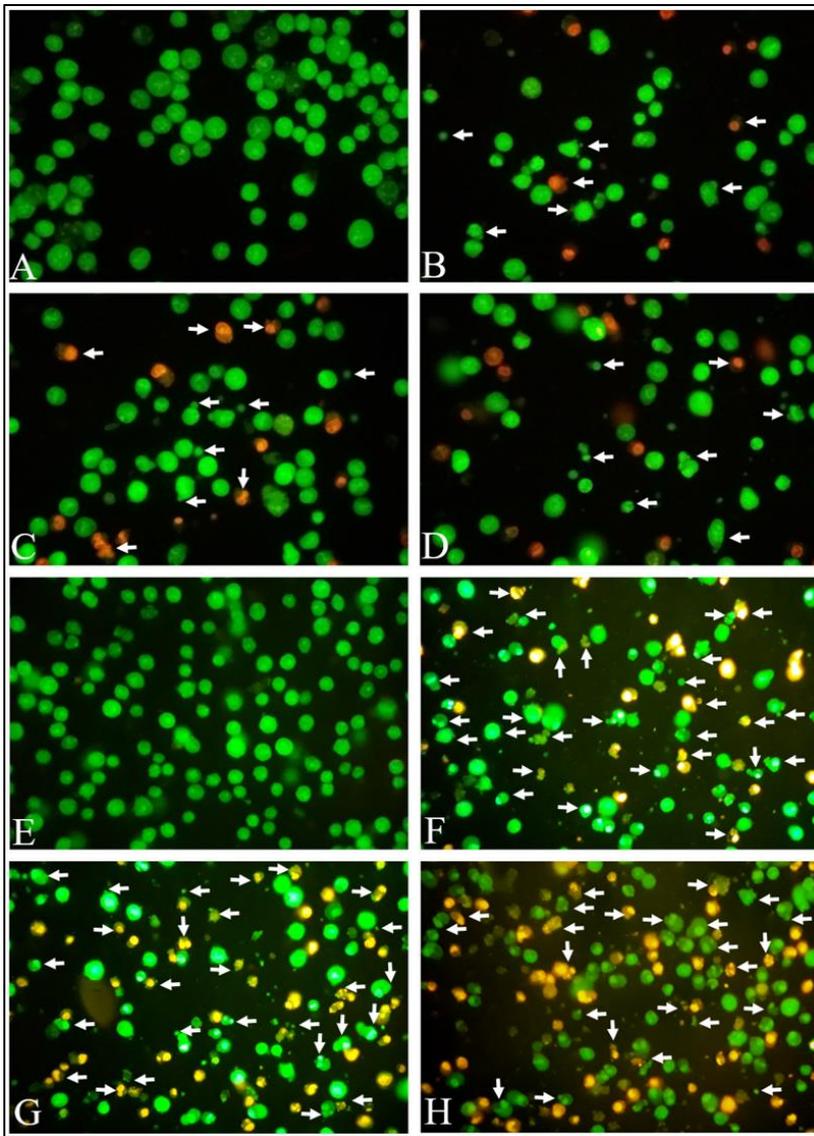
Como muitos dos quimioterápicos utilizados atualmente nos tratamentos das LAs são administrados por via endovenosa, a análise do efeito hemolítico de novos compostos com potencial atividade antileucêmica *in vitro* é um dado preliminar de extrema importância para experimentos futuros. Além disso, os tratamentos disponíveis atualmente contra as LAs não são seletivos para as células leucêmicas e causam inúmeros efeitos adversos aos pacientes, os quais incluem danos aos eritrócitos. Assim, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que as novas sulfonamidas avaliadas possuem biocompatibilidade com eritrócitos saudáveis. Além disso, os dados apresentados indicam que poderão ser administradas altas doses dos compostos selecionados em futuros estudos, por exemplo, em modelos experimentais pré-clínicos murinos.

5.4 AVALIAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Segundo a literatura, uma série de alterações na morfologia celular ocorre em células em processo de morte, como, por exemplo, por apoptose ou necrose. Essas alterações podem ser visualizadas com o uso de corantes fluorescentes específicos como aqueles que se intercalam ao DNA das células, os quais permitem visualizar as alterações morfológicas por microscopia de fluorescência (CUMMINGS; SCHNELLMANN, 2004). Assim, o uso dos corantes fluorescentes LAcr e BE permite detectar alterações morfológicas tais como a perda da integridade da membrana, a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA, a formação de corpos apoptóticos e a formação de *blebs* (protuberâncias) de membrana, e, dessa forma, indicam se a citotoxicidade de determinado composto é característica de morte celular por apoptose (KASIBHATLA, 2006; PORTT et al., 2011; WU, 2015; BORYS et al., 2017).

Neste estudo, os corantes LAcr e BE foram utilizados para avaliar as alterações morfológicas causadas nas células K562 e Jurkat pelas sulfonamidas 1E68Y, 1E68R e 1E68DI, selecionadas na triagem. Para isso, as células foram incubadas por 12 horas com os compostos nas respectivas CI50_{24h} obtidas em cada linhagem. Conforme pode ser visualizado na Figura 13, Painéis A-H, as células leucêmicas nos grupos controle apresentaram morfologia uniforme (tamanho celular homogêneo, membranas íntegras) com células coradas em verde. Já naquelas tratadas com as três sulfonamidas, pode-se observar que as mesmas provocaram alterações morfológicas características de apoptose tardia, como a formação de corpos apoptóticos e perda da integridade da membrana com ou sem condensação da cromatina, a qual permite a coloração alaranjada conferida pelo BE. Características compatíveis com apoptose inicial também podem ser observadas nas células com membranas íntegras, coradas em verde, com condensações da cromatina, ou formação de *blebs*. Algumas células também apresentaram tamanho reduzido, o que pode estar associado à apoptose. Células com características morfológicas de apoptose estão sinalizadas na Figura 13 com setas brancas.

Figura 13 – Alterações morfológicas induzidas pelas sulfonamidas 1E68Y, 1E68R e 1E68DI em células K562 e Jurkat.



As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço) foram incubadas por 12 horas com as seguintes concentrações de cada composto: 8,3 e 6,5 μM (1E68Y), 8,5 e 6,0 μM (1E68R) e 5 μM (1E68DI – em ambas as linhagens), respectivamente. Após o período de incubação as células foram coradas com solução de BE/LAcR

na proporção 1:1. Os grupos controle são representados pelas células sem tratamento. As imagens foram observadas na magnitude de 400X. Setas brancas indicam células com características de apoptose. **A** – Controle K562; **B** – Células K562 incubadas com a sulfonamida 1E68Y; **C** – Células K562 incubadas com a sulfonamida 1E68R; **D** – Células K562 incubadas com a sulfonamida 1E68DI; **E** – Controle Jurkat; **F** – Células Jurkat incubadas com a sulfonamida 1E68Y; **G** – Células Jurkat incubadas com a sulfonamida 1E68R; **H** – Células Jurkat incubadas com a sulfonamida 1E68DI.

Peng, Zhang e Xiao (2004) relataram que o celecoxibe, um fármaco derivado de sulfonamida, também causou alterações morfológicas típicas de apoptose em células de linhagem de câncer colorretal humano (HT-29), tais como encolhimento celular, condensação nuclear, fragmentação de DNA e formação de corpos apoptóticos. Suthar et al. (2013) observaram alterações morfológicas causadas por uma benzenosulfonamida também em células de adenocarcinoma colorretal humano (COLO-205). As alterações incluíram retração celular e condensação e fragmentação nucleares. Koyuncu et al. (2018) avaliaram o efeito de derivados de sulfonamidas em diferentes tipos de linhagens humanas de câncer, e observaram alterações morfológicas características de apoptose em células HeLa (adenocarcinoma de cervix), como a fragmentação nuclear. No estudo realizado por Bigolin (2016) no LOEH, também foram observadas características de apoptose provocadas por uma benzenosulfonamida em células K562 e Jurkat. Com exceção desse estudo, não foram encontrados outros trabalhos na literatura que relatam alterações morfológicas provocadas por sulfonamidas em células de LAs. Assim, os resultados obtidos neste trabalho contribuem com informações complementares a respeito das alterações morfológicas provocadas por sulfonamidas em células de LAs humanas.

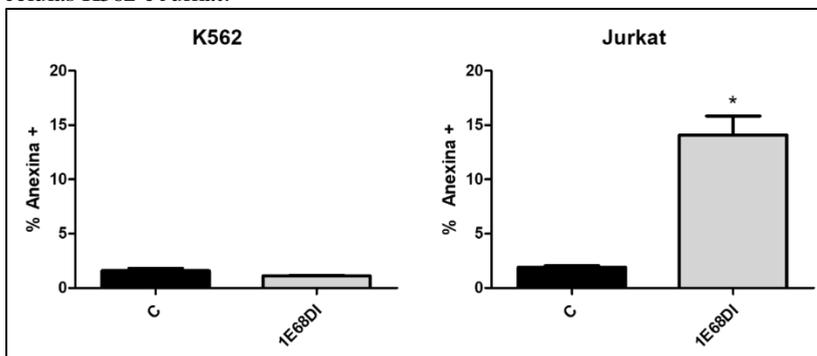
5.5 AVALIAÇÃO DA EXTERNALIZAÇÃO DOS RESÍDUOS DE FOSFATIDILSERINA (FS)

Sabe-se que a externalização dos resíduos de FS na membrana celular é um dos primeiros sinais emitidos pela célula para iniciar o processo de apoptose. Os resíduos de FS normalmente se encontram distribuídos de forma assimétrica na parte interna da membrana plasmática, onde estimulam a função de várias proteínas de sinalização intracelular. Durante a apoptose, os resíduos de FS são translocados da parte interna para a parte externa da membrana plasmática e, assim,

ficam expostos, de forma que a Anexina V, que possui alta afinidade por FS, consegue se ligar. A identificação de células apoptóticas por meio da marcação das mesmas com Anexina V conjugada a fluorocromo é provavelmente o ensaio de detecção de apoptose mais utilizado experimentalmente (VANCE; TASSEVA, 2013; TELFORD; TAMUL; BRADFORD, 2016).

A partir dessa etapa, para os ensaios seguintes foi utilizado apenas o composto 1E68DI, pois este obteve a menor $CI_{50_{24h}}$ em ambas as linhagens celulares avaliadas. Assim, neste trabalho foi utilizado o kit de Anexina V conjugada ao fluorocromo FITC para avaliar o efeito apoptótico da sulfonamida 1E68DI sobre as células K562 e Jurkat. Na Figura 14 pode-se observar que, com relação ao controle, as células Jurkat apresentaram positividade significativa (aumento de $12,20 \pm 1,75\%$) para marcação com Anexina V após serem tratadas e incubadas com 1E68DI. Por outro lado, não houve diferença significativa nas células K562, quando comparadas ao seu respectivo controle.

Figura 14 – Avaliação da externalização dos resíduos de fosfatidilserina nas células K562 e Jurkat.



As células K562 e Jurkat (1×10^6 células por poço) foram incubadas por 12 horas na ausência (grupo controle), e na presença do composto 1E68DI na sua respectiva $CI_{50_{24h}}$. A porcentagem de células positivas para Anexina V foi determinada por citometria de fluxo conforme o kit de Anexina V conjugada a FITC. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos dois experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo software *Infinicyt* versão 1.7 (Cytognos®). *Diferença estatística em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, teste *t* de Student.

Haritunians et al. (2008) avaliaram o efeito de uma sulfonamida em várias linhagens de neoplasias hematológicas e demonstraram que em 24 e 48 horas de incubação com o composto não houve diferença significativa para marcação com Anexina V nas células HL-60/LMA, U937/LMA, MD901/linfoma difuso de grandes células B, Reh/LLA-B e Jeko-1/linfoma de células do manto. Entretanto, quando o composto foi incubado por 72 horas com as mesmas linhagens, as células HL60, Reh e MD901 apresentaram um aumento de 3,3 a 4,5 vezes na porcentagem de células positivas para Anexina V. Assim, considerando que há outros indicadores de apoptose nas células K562, como as alterações morfológicas, o fato de não haver marcação positiva para Anexina V nessas células no presente estudo pode ser devido a uma limitação metodológica quanto ao tempo de incubação do composto com essa linhagem. Dessa forma, é possível que seja necessário ajustar o período de incubação das células com 1E68DI para que ocorra a ligação de Anexina V aos resíduos de FS.

Por outro lado, Fadeel et al. (1999) demonstraram que a externalização de FS não é um fenômeno obrigatório durante a apoptose, apesar de ser um evento predominantemente dependente da ativação de caspases. De acordo com a literatura, enzimas do tipo flipase são responsáveis por manter os resíduos de FS dentro das células, enquanto que outro tipo de enzimas, as *scramblases* provocam a exposição de FS na superfície das células durante a apoptose. As *scramblases* são ativadas pela caspase-3 durante a apoptose, enquanto que as flipases são inativadas, o que promove a exposição de FS. Entretanto, existem flipases que são resistentes à ação das caspases, o que leva a uma falha na exposição de FS na superfície celular. Isso indica que a ação das caspases sobre as flipases é essencial para que ocorra a exposição dos resíduos de FS (NAGATA et al., 2016). Ainda, de acordo com a literatura, o estímulo apoptótico leva à ativação da caspase-3, a qual (1) interage com proteínas que estimulam a formação de um complexo responsável por promover a exposição dos resíduos de FS, e (2) inibe a atividade de enzimas que promovem a exposição de FS, o que consequentemente leva à inibição da exposição desses resíduos na membrana das células. Assim, a apoptose intrínseca ou extrínseca nem sempre é acompanhada da exposição de FS (FADEEL et al., 1999; GALLUZZI et al., 2018).

Liu et al. (2017) avaliaram o efeito de difenilpirimidinas sintetizadas com a introdução de uma sulfonamida em uma linhagem de linfoma de células B (Ramos) e observaram que um dos compostos induziu a apoptose nessas células. Já Glavaš-Obrovac et al. (2017)

observaram que um composto derivado de um complexo de cobre e sulfonamida causou apoptose em células K562 pela exposição significativa dos resíduos de FS. Ainda, Ling et al., (2018) investigaram o efeito de quinolonas com uma porção sulfonamida em células de linhagem de LLA-B humana (KOPN-8), e demonstraram que os compostos utilizados no estudo causaram o aumento de células em apoptose tardia e inicial. Todos os estudos citados acima detectaram a apoptose nas células pela exposição dos resíduos de FS marcados com Anexina V.

Assim, apesar de o protocolo experimental utilizado neste estudo não ter demonstrado a exposição dos resíduos de FS nas células K562, a indução da apoptose como um mecanismo citotóxico causado por 1E68DI nessa linhagem não pode ser descartada, visto que o composto causou alterações morfológicas características de apoptose inicial e tardia nas células K562. Além disso, a marcação significativa de células Jurkat Anexina V positivas evidencia o envolvimento da indução da apoptose como um mecanismo de citotoxicidade provocado pelo composto 1E68DI nessa linhagem de LLA. É importante ressaltar que as leucemias são doenças heterogêneas (STIEHL; LUTZ; MARCINIAK-CZOCHRA, 2016), e por isso cada linhagem pode responder de forma diferente aos estímulos provocados pela sulfonamida analisada.

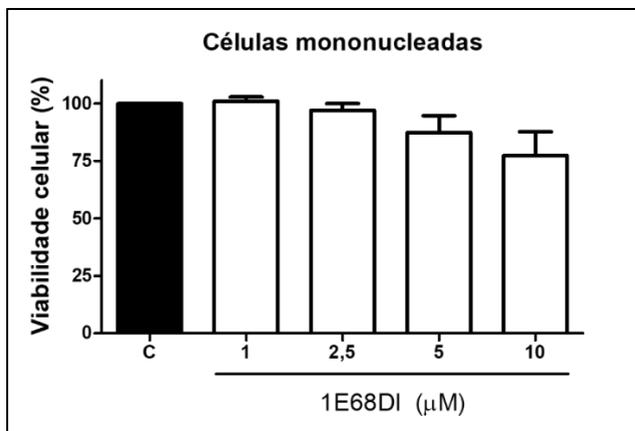
5.6 EFEITO DA SULFONAMIDA 1E68DI SOBRE CÉLULAS MONONUCLEADAS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

A avaliação da citotoxicidade das moléculas candidatas a fármacos antineoplásicos em células não tumorais é uma análise de extrema importância para a investigação de novos compostos. Essa avaliação possibilita analisar a biocompatibilidade dos compostos com células saudáveis, e, além disso, permite calcular o IS das moléculas investigadas com relação às células tumorais incluídas no estudo. Assim, quando a citotoxicidade é seletiva para a linhagem tumoral analisada e não seletiva para células saudáveis, é possível que o composto provoque poucos efeitos adversos se administrado em um tratamento quimioterápico e aumente a sobrevida do paciente (WILDING; BODMER, 2014; LÓPEZ-LÁZARO, 2015; PEÑA-MORÁN et al., 2016).

Assim, a fim de avaliar a citotoxicidade de 1E68DI sobre células não tumorais, células mononucleadas de três indivíduos saudáveis foram incubadas por 24 horas com 1-10 μM do composto e, após o período de incubação, a viabilidade foi avaliada pelo método do MTT. Na Figura

15, pode-se observar que não houve redução significativa na viabilidade celular das células mononucleadas após o tratamento com a sulfonamida selecionada, em diferentes concentrações, em relação ao controle sem tratamento. A partir dos valores de absorbância obtidos com as diferentes concentrações de 1E68DI foi possível calcular a $CI_{50_{24h}}$ nas células mononucleadas, cujo valor foi de $\approx 37,53 \pm 2,73 \mu\text{M}$. Esse valor foi mais de oito vezes superior aos encontrados nas células de LAs K562 e Jurkat incubadas com 1E68DI ($4,4 \pm 0,66$ e $4,3 \pm 0,53$, respectivamente, conforme demonstrado nas Tabelas 1 e 2) pelo mesmo período (24 horas). Sabe-se que os tratamentos quimioterápicos são associados a efeitos adversos graves devido à não seletividade dos fármacos para as células tumorais, logo, a quimioterapia acaba por afetar também as células saudáveis dos pacientes (LÓPEZ-LÁZARO, 2015). Assim, a partir dos dados obtidos com as células mononucleadas, foi calculado o IS da sulfonamida 1E68DI, pela razão entre a $CI_{50_{24h}}$ das células mononucleadas e a $CI_{50_{24h}}$ das linhagens de LMA K562 e de LLA Jurkat (Tabela 3).

Figura 15 – Efeito citotóxico da sulfonamida 1E68DI sobre células mononucleadas de indivíduos saudáveis.



As células mononucleadas de três indivíduos saudáveis ($7,5 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas com 1, 2,5, 5 e 10 μM da sulfonamida 1E68DI por 24 horas e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT. O grupo controle (células sem tratamento) foi considerado como 100% de viabilidade celular, a partir das médias de densidade óptica. Para análise estatística foi realizada ANOVA de uma via seguida de pós teste de Bonferroni. Foram considerados significativos valores $\text{comp} \leq 0,001$.

Tabela 3 – Cálculo do IS da sulfonamida 1E68DI nas células K562 e Jurkat em relação às células mononucleadas de indivíduos saudáveis.

Linhagem celular	Índice de seletividade
K562	≈ 8,5
Jurkat	≈ 8,7

Segundo a literatura, compostos que apresentam $IS > 3$ são considerados com alta seletividade para as células avaliadas (PRAYONG; BARUSRUX; WEERAPREEYAKUL, 2008; DAHAM et al., 2015). Dessa forma, considerando os valores de IS observados com as células K562 e Jurkat (8,5 e 8,7 respectivamente), a sulfonamida 1E68DI apresenta alta seletividade para as linhagens de LA em comparação às células mononucleadas.

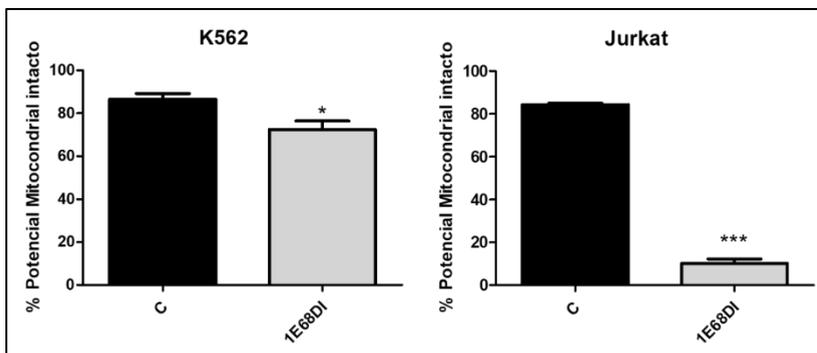
No estudo realizado anteriormente no LOEH por Bigolin (2016), a sulfonamida avaliada na concentração de 13 μM reduziu significativamente (cerca de 70%) a viabilidade das células mononucleadas, e o paclitaxel (10 μM), um fármaco antineoplásico já utilizado na clínica, reduziu cerca de 60% a viabilidade das mesmas células. Assim, os resultados do presente trabalho sugerem que 1E68DI poderia ser administrado com maior segurança por via endovenosa, por exemplo, em estudos *in vivo*, pois não houve citotoxicidade para as células não tumorais avaliadas (células mononucleadas), mesmo quando essas foram incubadas com o dobro da $CI_{50_{24h}}$ das células tumorais. Ainda, vale ressaltar que 1E68DI não provocou hemólise, conforme demonstrado na Figura 12, o que reforça a biocompatibilidade dessa sulfonamida com células saudáveis. Além disso, o composto avaliado foi seletivo para as linhagens de LAs, o que sugere, possivelmente, uma redução nos efeitos adversos relacionados ao tratamento. Esses resultados são bastante relevantes, visto que os tratamentos atuais contra as LAs não são seletivos para as células tumorais e, por esse motivo, estão associados a efeitos adversos graves, tanto com relação às células hematológicas (como anemia, hemorragia e pré-disposição a infecções) como para as células não hematológicas, os quais podem levar a alterações metabólicas, disfunções reprodutivas, reações alérgicas, além de citotoxicidade a vários tecidos (cardíaco, renal, hepático, gastrointestinal, entre outros) (ANDRADE; SAWADA; BARICHELLO, 2013; MEDINGER et al., 2016). Reações adversas severas estão relacionadas ao aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes com LA (VAGACE; GERVASINI, 2011), o que reforça a importância do desenvolvimento de agentes antileucêmicos mais eficazes e seletivos para as células malignas.

5.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SULFONAMIDA 1E68DI SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

A mitocôndria tem um papel central na fisiologia celular, principalmente pela função de gerar energia na forma de ATP pela fosforilação oxidativa. Esse processo ocorre devido à presença de uma cadeia transportadora de elétrons presente na membrana mitocondrial, a qual gera um gradiente eletroquímico por meio de uma série de reações redox. Assim, este gradiente eletroquímico é responsável por conduzir a síntese de ATP e gerar o $\Delta\Psi_m$, o qual representa um ponto chave para avaliar a função da mitocôndria (SAKAMURU; ATTENE-RAMOS; XIA, 2016). Danos à mitocôndria podem causar dissipação do $\Delta\Psi_m$ com consequente aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação de moléculas pró-apoptóticas, o que caracteriza o envolvimento dessa organela na apoptose intrínseca (BURKE, 2017).

Dessa forma, com o objetivo de continuar a investigação de mecanismos envolvidos com a ativação da apoptose, em seguida foi avaliado o efeito de 1E68DI sobre o $\Delta\Psi_m$ das células de LAs K562 e Jurkat. Após 12 horas de incubação com 1E68DI nas respectivas $CI_{50_{24h}}$ houve uma redução significativa do $\Delta\Psi_m$ de ambas as linhagens avaliadas (redução de 16,31% em K562 e 88,03% em Jurkat), como pode ser observado na Figura 16.

Figura 16 – Avaliação do efeito da sulfonamida 1E68DI sobre o potencial de membrana mitocondrial das células K562 e Jurkat.



As células K562 e Jurkat (1×10^6 células por poço) foram incubadas por 12 horas na ausência (grupo controle), e na presença do composto 1E68DI na sua respectiva $CI_{50_{24h}}$. A porcentagem de células com potencial mitocondrial íntegro foi determinada por citometria de fluxo após a execução do teste com o kit *MitoView*. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos dois experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems*) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7 (Cytognos®). Foram considerados significativos em relação aos grupos controle valores com *** $p \leq 0,001$ e * $p \leq 0,05$, teste *t* de Student.

Koyuncu et al. (2018) avaliaram o efeito de sulfonamidas inibidoras de anidrases carbônicas em células de carcinoma de cérvix HeLa e demonstraram que um dos compostos avaliados induziu a redução do $\Delta\Psi_m$ nessa linhagem de células. Da mesma forma, Saha et al. (2016) avaliaram o envolvimento de sulfonamidas na indução de apoptose em diversas linhagens de câncer humano, e demonstraram que um dos compostos também reduziu o $\Delta\Psi_m$ de células HeLa. Haritunians et al. (2008) avaliaram o efeito de sulfonamidas em células de neoplasias hematológicas e demonstraram que houve redução do $\Delta\Psi_m$ em células de LMA (HL-60), LLA-B (Reh), nas células de linfoma difuso de grandes células B (MD901) e na linhagem de linfoma de células do manto (Jeko1). Bigolin (2016) também demonstrou que uma sulfonamida foi capaz de reduzir o $\Delta\Psi_m$ nas linhagens K562 e Jurkat.

Na literatura existem poucos estudos que relatam o envolvimento da mitocôndria no efeito citotóxico de sulfonamidas em células de LAs. Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo fornecem informações relevantes a respeito dos mecanismos de citotoxicidade das

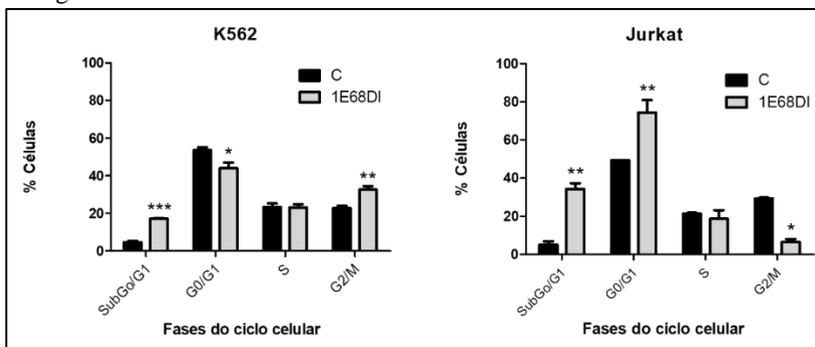
sulfonamidas em células leucêmicas e indicam que a mitocôndria é um potencial alvo de ação para essa classe de compostos. Assim, sugere-se que a citotoxicidade do composto avaliado pode estar associada à ativação da apoptose intrínseca.

5.8 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

O ciclo celular é um processo altamente regulado, responsável pela divisão de uma célula em duas células-filhas com material genético igualmente distribuído, e está implicado no controle do crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular. Por outro lado, a desregulação do ciclo celular tem um papel central na tumorigênese, quando ocorre a transformação de células normais em células malignas. Assim, várias moléculas inibidoras do ciclo celular funcionam como agentes antitumorais, as quais podem ser utilizadas individualmente ou em combinação com fármacos citotóxicos ou alvo-específicos (BAI et al., 2017), além disso, representam uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos fármacos antileucêmicos.

Neste trabalho, foi avaliado o efeito da sulfonamida 1E68DI sobre as fases do ciclo celular das linhagens de LMA K562 e de LLA Jurkat. Os resultados demonstrados na Figura 17 e nas Tabelas 4 e 5 mostram que 1E68DI causou um aumento significativo de células na fase sub G0/G1 em ambas as linhagens, o que caracteriza um aumento da morte celular provocada pelo composto. Esses dados corroboram os resultados apresentados anteriormente (Tabelas 1 e 2 e Figuras 8 e 9), os quais demonstram a citotoxicidade causada pelo composto em ambas as linhagens de LAs. Assim, com intuito de incluir na avaliação do efeito de 1E68DI somente as células que se encontravam em ciclo, os dados foram reanalisados e as células na fase sub G0/G1 (células mortas) foram desconsideradas. Ainda na Figura 17 e nas Tabelas 4 e 5, pode-se observar que 1E68DI provocou um aumento significativo de células K562 na fase G2/M e um aumento significativo de células Jurkat na fase G0/G1, quando comparados aos seus respectivos controles, o que caracteriza um bloqueio nessas fases do ciclo celular. Na linhagem K562 a porcentagem de células na fase G2/M aumentou de $22,79 \pm 1,27\%$ (controle) para $32,59 \pm 1,97\%$ (células tratadas com 1E68DI). Com relação à linhagem Jurkat, a porcentagem de células na fase G0/G1 aumentou de $49,34 \pm 0,10\%$ (controle) para $74,50 \pm 6,40\%$ (células tratadas com 1E68DI).

Figura 17 – Efeito da sulfonamida 1E68DI sobre as fases do ciclo celular das linhagens K562 e Jurkat.



As células K562 e Jurkat (1×10^6 células por poço) foram incubadas por 24 horas na ausência (grupo controle), e na presença do composto 1E68DI na sua respectiva $CI_{50_{24h}}$. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi determinada por citometria de fluxo conforme recomendações do fabricante do kit *PI/RNase solution*. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos dois experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems*) e avaliadas pelo software *Infinicyt* versão 1.7 (Cytognos®). Foram considerados significativos em relação aos grupos controle valores com * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$, ANOVA de uma via seguida de pós teste de Tukey.

Tabela 4 – Efeito da sulfonamida 1E68DI sobre as fases do ciclo celular da linhagem K562.

	Médias (% de células \pm EPM)	
	Controle	1E68DI
Sub G0/G1	4,68 \pm 0,68	17,32 \pm 0,24
*G0/G1	53,66 \pm 1,58	44,09 \pm 2,94
*S	23,46 \pm 1,87	23,22 \pm 1,69
*G2/M	22,79 \pm 1,27	32,59 \pm 1,97

* Dados reanalisados desconsiderando-se células nas fases sub G0/G1 (células mortas).

Tabela 5 – Efeito da sulfonamida 1E68DI sobre as fases do ciclo celular da linhagem Jurkat.

Médias (% de células ± EPM)		
	Controle	1E68DI
Sub G0/G1	5,05 ± 1,84	34,38 ± 2,88
*G0/G1	49,34 ± 0,10	74,50 ± 6,40
*S	21,40 ± 0,44	18,63 ± 4,61
*G2/M	29,27 ± 0,53	6,58 ± 1,48

* Dados reanalisados desconsiderando-se células na fase sub G0/G1 (células mortas).

Na literatura existem estudos que relatam o efeito de sulfonamidas ou de seus derivados sobre as fases do ciclo celular de diferentes linhagens tumorais. Fortin et al. (2011) demonstraram que uma série de compostos derivados de sulfonamida bloquearam a progressão do ciclo celular na fase G2/M de uma linhagem de células de melanoma humano (M21), o que levou à interrupção da polimerização do heterodímero de tubulina, com conseqüente ruptura do citoesqueleto e morte celular por *anoikis*, um tipo específico de apoptose intrínseca iniciada pela perda de integrina (FORTIN et al., 2011; GALLUZZI et al., 2018). Com relação a neoplasias hematológicas, Yoshimatsu et al. (1997) analisaram o efeito antitumoral de uma sulfonamida e constataram que o composto avaliado era um agente antimetabólico, pois causou bloqueio na fase G2/M de células de linhagem de linfoma murino (P388), com ação antiproliferativa sobre a tubulina. Já Kamal et al. (2011) investigaram o efeito citotóxico de uma série de sulfonamidas sobre células K562 e observaram que os compostos mais promissores induziram o bloqueio das células na fase G1 do ciclo, o que está associado à indução da morte celular por apoptose (FRAKER et al., 1995; KAMAL et al., 2011). No estudo realizado no LOEH por Bigolin (2016), foi observado que a sulfonamida considerada a mais promissora induziu um bloqueio na fase G2/M de células de linhagem de mieloma múltiplo humano, entretanto, a mesma sulfonamida não causou alterações significativas nas fases do ciclo celular das linhagens K562 e

Jurkat, quando comparadas aos seus respectivos controles. Ainda, Ling et al. (2018) demonstraram que um dos compostos investigados em seu estudo, o qual continha uma porção sulfonamida, foi capaz de bloquear a fase G0/G1 de células de linhagem de LLA (KOPN-8).

Assim, os resultados obtidos neste trabalho com a sulfonamida 1E68DI corroboram os dados apresentados em outros estudos, os quais relatam a inibição da progressão do ciclo celular com bloqueio nas fases G0/G1 e G2/M após o tratamento das células avaliadas com diferentes sulfonamidas. Sabe-se que o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M está associado, principalmente, a distúrbios na montagem dos microtúbulos (RAJA et al., 2014), enquanto que o bloqueio em G0/G1 pode afetar a fase de pré-síntese do DNA (JINGWEN; YAOCHEM; GUOJUN, 2017).

Muitos quimioterápicos utilizados na clínica tem seu efeito farmacológico associado ao bloqueio das fases do ciclo celular. A citarabina, utilizada tanto no tratamento da LMA como da LLA, é reconhecida por sua capacidade de bloquear as células de LAs na fase S do ciclo celular. Já a doxorrubicina, que também pode ser administrada nos tratamentos contra LMA ou LLA, pode causar danos ao DNA e inibir a sua replicação, o que está associado ao bloqueio das fases G1, S ou G2, para que ocorra o reparo do DNA nos pontos de checagem (WANG et al., 2017). Outros quimioterápicos, como os inibidores da topoisomerase, que incluem o etoposídeo e a camptotecina, são conhecidos por bloquear o ciclo celular na fase G2/M, o que também causa a ativação do ponto de checagem em resposta ao dano ao DNA. Da mesma forma, os alcaloides derivados da vinca, como o paclitaxel, também são capazes de bloquear a progressão do ciclo celular na fase G2/M pela modulação da polimerização da tubulina (GROSCHER; BUSHMAN, 2005). Além disso, o indisulam, também denominado E7070, é um derivado de sulfonamida conhecido por bloquear o ciclo celular na fase G1 das células da linhagem P388 (linfoma murino) (OZAWA et al., 2001). Recentemente o efeito do indisulam foi avaliado em um estudo clínico de fase II em pacientes com LMA recidivante/refratária e síndrome mielodisplásica de alto risco, onde o composto foi administrado em combinação com os fármacos antileucêmicos idarrubicina e citarabina. Os resultados desse estudo demonstraram que a combinação do indisulam com os fármacos antileucêmicos foi eficaz e bem tolerada pelos pacientes, e que essa combinação provocou uma melhora de 35% na taxa de resposta ao tratamento. Entretanto, no estudo não foi avaliado o efeito do indisulam no ciclo celular das células dos pacientes incluídos na investigação (ASSIF et al., 2018).

Até o momento não foram encontrados estudos que correlacionem a presença de grupos funcionais específicos que fazem parte da estrutura da sulfonamida 1E68DI com sua atividade na regulação do ciclo celular de células leucêmicas. No entanto, em um estudo publicado recentemente, foi relatado que um composto derivado de nitrobenzoato apresentou atividade sobre a montagem dos microtúbulos, o que causou o bloqueio da fase G2/M do ciclo celular de células de carcinoma epidermoide humano (A431). Esse estudo demonstrou que, entre outros grupamentos funcionais presentes na molécula investigada, o grupo nitro foi capaz de interagir com sítios de ligação presentes na tubulina (ZHENG et al., 2016). Nesse sentido, considerando que a sulfonamida 1E68DI possui quatro grupos nitro em sua estrutura, é possível que esses grupamentos estejam implicados no bloqueio do ciclo celular na fase G2/M observado nas células de LMA K562. No entanto, são necessários estudos adicionais para corroborar essa hipótese, tais como os estudos que envolvem métodos de modelagem molecular. Com relação ao bloqueio do ciclo celular observado nas células de LLA Jurkat, não foram encontrados estudos que demonstrassem uma interação entre grupamentos nitro com sítios ativos associados ao bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1.

Assim, a sulfonamida 1E68DI representa uma molécula bastante promissora para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento das LAs, pois além de ativar mecanismos envolvidos na indução da morte celular por apoptose nas células de linhagem de LA K562 e Jurkat, é capaz de inibir diferentes fases do ciclo celular de cada linhagem. Isso sugere que o composto age por mecanismos diferentes nas duas linhagens de LA avaliadas, o que é um resultado esperado, considerando a heterogeneidade dessas neoplasias.

5.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA MORTE CELULAR POR APOPTOSE

A apoptose é provavelmente o tipo de morte celular mais investigado na literatura, e está envolvida em diversos processos biológicos, como a diferenciação celular, a renovação de células normais e a remoção de células alteradas ou nocivas (MISHRA et al., 2018). Assim, os mecanismos apoptóticos são fundamentais para a manutenção da homeostase dos tecidos; entretanto, a disfunção ou inibição da apoptose pode ser responsável pela tumorigênese, pois o acúmulo de células anormais resulta do desequilíbrio entre a

proliferação e a morte celular (PAPALIAGKAS et al., 2007; LETAI, 2017; PFEFFER; SINGH, 2018).

As terapias atuais contra diversos tipos de câncer incluem fármacos direcionados a vias envolvidas na ativação da apoptose, e cada anormalidade encontrada na ativação dessas vias pode ser um alvo específico para o tratamento do câncer. Assim, a restauração da sinalização envolvida na ativação da apoptose é uma das áreas mais estudadas na pesquisa de terapias antineoplásicas (MISHRA et al., 2018), e é um alvo promissor para o desenvolvimento de novos agentes antileucêmicos. Nesse sentido, sabe-se que existem diversas proteínas responsáveis pela ativação, regulação e execução de eventos necessários para conduzir a morte celular por apoptose (PAPALIAGKAS et al., 2007; LETAI, 2017; PFEFFER; SINGH, 2018). Durante a apoptose intrínseca, proteínas da família Bcl-2, como a proteína pró-apoptótica Bax e a proteína antiapoptótica Bcl-2, controlam a formação de poros na membrana mitocondrial, o que afeta o $\Delta\Psi_m$ e, como consequência, ocorre o bloqueio ou liberação de proteínas envolvidas na ativação das caspases, como, por exemplo, a caspase-3. A ativação das caspases, por sua vez, pode resultar no bloqueio da atividade de proteínas que inibem a apoptose, tal como a survivina, uma IAP (COSENTINO; GARCÍA-SÁEZ, 2014; NEOPHYTOU; CONSTANTINOU, 2017; GALLUZZI et al., 2018; SOLANO-GÁLVEZ et al., 2018). Por outro lado, a dissipação do $\Delta\Psi_m$ pode provocar a liberação de proteínas capazes de induzir a apoptose independentemente da ativação das caspases, como o AIF (DYSHLOVOY et al., 2017; BANO; PREHN, 2018; SOLANO-GÁLVEZ et al., 2018). Já na apoptose extrínseca destaca-se o envolvimento dos receptores de morte, como o FasR, o qual atua na ativação de caspases que promovem a morte celular (GALLUZZI et al., 2018; SOLANO-GÁLVEZ et al., 2018). Assim, com objetivo de investigar alguns mecanismos de morte celular causados pela sulfonamida 1E68DI, neste trabalho foi avaliado o efeito da mesma sobre a expressão das proteínas Bax, Bcl-2, survivina, AIF, FasR e caspase-3 ativada nas linhagens de LA K562 e Jurkat.

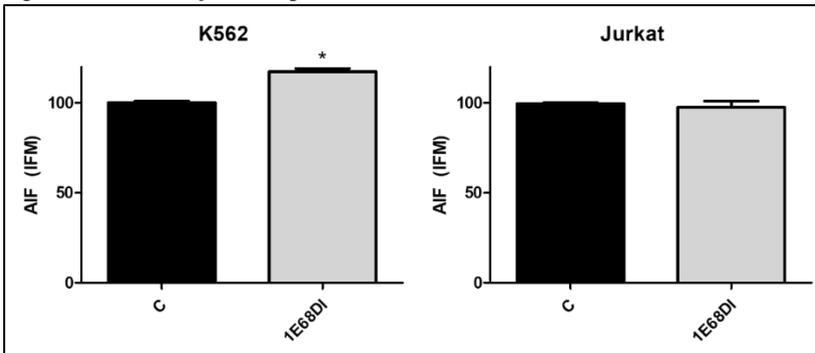
5.9.1 Efeito da sulfonamida 1E68DI sobre a proteína pró-apoptótica AIF

Durante a apoptose intrínseca, a dissipação do $\Delta\Psi_m$ provoca a liberação de diversas proteínas para o citosol. Entre as proteínas pró-apoptóticas encontra-se o AIF, o qual é responsável pela condensação da cromatina quando é translocado para o núcleo e, assim, pode iniciar a

morte celular em um processo independente da ativação das caspases (DYSHLOVOY et al., 2017; BANO; PREHN, 2018).

Na Figura 18 pode-se observar que a sulfonamida 1E68DI aumentou significativamente ($17,30 \pm 2,09\%$) a expressão de AIF nas células K562 quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, nas células Jurkat não houve diferença significativa entre as células incubadas com o composto e o seu respectivo controle.

Figura 18 – Avaliação da expressão de AIF nas células K562 e Jurkat.



As células K562 e Jurkat (1×10^6 células por poço) foram incubadas por 12 horas na ausência (grupo controle), e na presença do composto 1E68DI na sua respectiva $CI_{50_{24h}}$. A IFM foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-AIF conjugado ao fluorocromo FITC. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos dois experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCantoTM II (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems*) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7 (Cytognos®). IFM: Intensidade de fluorescência média. *Diferença estatística em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, teste *t* de Student.

Um trabalho prévio realizado no LOEH por Bigolin (2016) apresentou resultados opostos aos obtidos no presente estudo. Nesse trabalho, a sulfonamida selecionada pelo autor aumentou significativamente (24%) a expressão de AIF na linhagem de LLA Jurkat, entretanto, a mesma não alterou a expressão dessa proteína na linhagem de LMA K562. Além disso, também não foi observada diferença significativa na expressão de AIF com relação à linhagem de mieloma múltiplo (MM.1S). Na literatura, não foram encontrados outros estudos que avaliassem o efeito de sulfonamidas na expressão de AIF em células de neoplasias hematológicas, entretanto, Zhang et al. (2016) demonstraram que a combinação de um análogo de celecoxibe, o qual é

um fármaco derivado de sulfonamida, e a molécula ABT-737, que é um inibidor das proteínas Bcl-2 e Bcl-xL, causou um efeito sinérgico em linhagens humanas de carcinoma gástrico (AGS e HGC-27). Nesse trabalho foi observado que a translocação de AIF da mitocôndria para o núcleo após o tratamento combinado é o fator responsável por induzir apoptose nas linhagens avaliadas (ZHANG et al., 2016). Assim, com base nos resultados obtidos no presente estudo, reforça-se o envolvimento da apoptose intrínseca na citotoxicidade do composto 1E68DI com relação às células K562, e que o composto age por mecanismos distintos nas linhagens de LA avaliadas, pois o mesmo não alterou a expressão de AIF nas células Jurkat. Por outro lado, neste trabalho foi avaliado o efeito de 1E68DI sobre a expressão dessa proteína somente no período de incubação de 12 horas. Dessa forma, com relação às células Jurkat, possivelmente seja necessária a avaliação da expressão de AIF em um período de incubação superior com o composto para obter uma diferença significativa.

5.9.2 Efeito da sulfonamida 1E68DI sobre a proteína antiapoptótica survivina

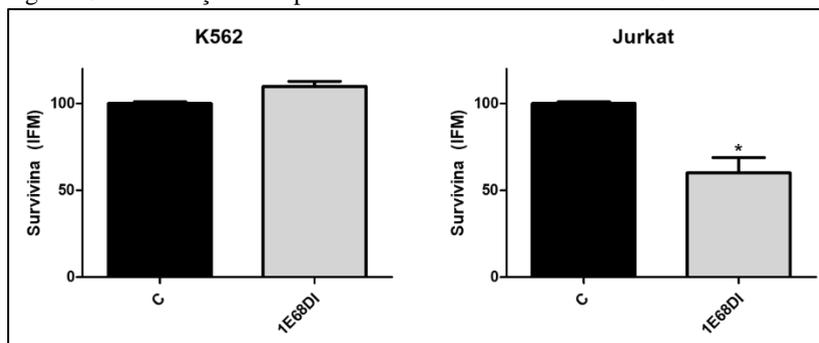
A survivina é a menor proteína da família das IAPs e possui funções divergentes, pois está envolvida tanto na inibição da apoptose como na regulação do ciclo celular, ou seja, atua em processos que regulam, ao mesmo tempo, a proliferação e a morte celular. A proteína survivina é expressa em todos os tipos de tumores e, por isso, é correlacionada com a agressividade do tumor, além de estar associada a resistência à quimioterapia e à inibição da ativação de caspases (GARG et al., 2016).

Conforme demonstrado na Figura 19, o tratamento com a sulfonamida 1E68DI reduziu significativamente ($39,90 \pm 8,86\%$) a expressão de survivina nas células Jurkat, enquanto que nas células K562 o mesmo não foi observado.

A sulfonamida investigada por Bigolin (2016) aumentou significativamente a expressão de survivina nas duas linhagens de LA incluídas no estudo (K562 e Jurkat). Como a expressão da survivina está associada à resistência à apoptose em vários tipos de câncer, a inibição dessa proteína pode ser um alvo atrativo para o desenvolvimento de novas terapias antineoplásicas (PEERY; LIU; ZHANG, 2017) e, mais especificamente, antileucêmicas. Assim, as IAPs podem ser um alvo interessante para a ação da sulfonamida 1E68DI no tratamento contra LLA-T, visto que o composto reduziu a expressão de survivina na

linhagem Jurkat. Entretanto, apesar de não ter sido significativo para as células K562, observa-se que o composto causou um ligeiro aumento na expressão de survivina, o que pode refletir um mecanismo de resistência dessa linhagem de LMA contra o composto. Assim, é possível que uma diferença significativa na expressão da proteína survivina na linhagem K562 ocorra ao aumentar o período de incubação dessa linhagem com a sulfonamida 1E68DI.

Figura 19 – Avaliação da expressão de survivina nas células K562 e Jurkat.



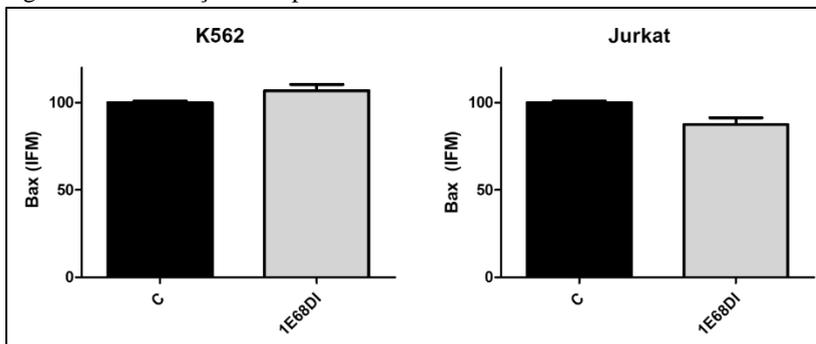
As células K562 e Jurkat (1×10^6 células por poço) foram incubadas por 12 horas na ausência (grupo controle), e na presença do composto 1E68DI na sua respectiva $CI_{50_{24h}}$. A IFM foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-survivina conjugado ao fluorocromo PE. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos dois experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems*) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7 (Cytognos®). IFM: Intensidade de fluorescência média. *Diferença estatística em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, teste *t* de Student.

5.9.3 Efeito da sulfonamida 1E68DI sobre a proteína antiapoptótica Bcl-2 e sobre a proteína pró-apoptótica Bax

O “ponto-chave” da apoptose intrínseca, o qual é definido como a permeabilidade da membrana mitocondrial, é regulado por proteínas da família Bcl-2, entre as quais estão a proteína antiapoptótica Bcl-2 e a proteína pró-apoptótica Bax. A proteína Bax atua de forma direta na permeabilização da membrana mitocondrial, enquanto que sua atividade pode ser inibida pela proteína Bcl-2 (SHAMAS-DIN et al., 2013; PEÑA-BLANCO; GARCÍA-SÁEZ, 2017). Assim, após incubar as células K562 e Jurkat com a sulfonamida 1E68DI, avaliou-se o efeito do

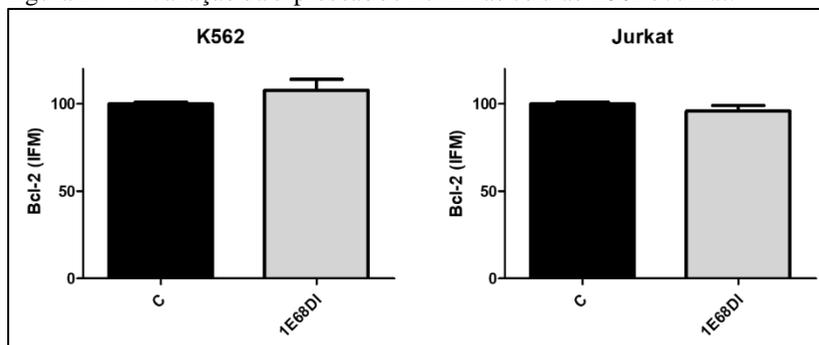
composto sobre a expressão das proteínas Bax e Bcl-2. Nas Figuras 20 e 21 pode-se observar que a sulfonamida 1E68DI não causou alterações significativas na expressão das proteínas Bax e Bcl-2 nas duas linhagens de LA, quando comparadas aos seus respectivos controles.

Figura 20 – Avaliação da expressão de Bax nas células K562 e Jurkat.



As células K562 e Jurkat (1×10^6 células por poço) foram incubadas por 12 horas na ausência (grupo controle), e na presença do composto 1E68DI na sua respectiva $CI_{50_{24h}}$. A IFM foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-Bax conjugado ao fluorocromo PerCP. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos dois experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems*) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7 (Cytognos®). IFM: Intensidade de fluorescência média. Foram considerados significativos em relação aos grupos controle valores $\text{comp} \leq 0,05$, teste *t* de Student.

Figura 21 – Avaliação da expressão de Bcl-2 nas células K562 e Jurkat.



As células K562 e Jurkat (1×10^6 células por poço) foram incubadas por 12 horas na ausência (grupo controle), e na presença do composto 1E68DI na sua respectiva CI50_{24h}. A IFM foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-Bcl-2 conjugado ao fluorocromo FITC. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos dois experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCantoTM II (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems*) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7 (Cytognos®). IFM: Intensidade de fluorescência média. Foram considerados significativos em relação aos grupos controle valores comp $\leq 0,05$, teste *t* de Student.

Sabe-se que as células tumorais adquirem resistência à apoptose por diversos mecanismos, os quais incluem a expressão de proteínas antiapoptóticas, ou a infrarregulação ou mutação de proteínas pró-apoptóticas (HASSAN et al., 2014). No trabalho desenvolvido por Bigolin (2016) no LOEH foi demonstrado que a sulfonamida selecionada aumentou significativamente a expressão de Bax nas linhagens de LA K562 e Jurkat, e na linhagem de mieloma múltiplo, MM.1S, a expressão de Bax foi diminuída. Já com relação à expressão de Bcl-2, não foram observadas diferenças significativas na expressão dessa proteína nas linhagens de LA, o que foi demonstrado apenas na linhagem MM.1S, na qual o composto causou uma diminuição de 7% na expressão de Bcl-2. Não foram encontrados outros estudos que avaliassem o efeito de sulfonamidas sobre a expressão das proteínas Bax e Bcl-2 em leucemias, entretanto, no estudo de Zhang et al. (2016), citado anteriormente, foi observado que a combinação de celecoxibe (derivado de sulfonamida) com a molécula ABT-737 (inibidor de Bcl-2 e Bcl-xL) provocou apenas um aumento moderado na razão entre Bax e Bcl-2 nas linhagens humanas de carcinoma gástrico AGS e HGC-27. Já no estudo de Eldehna et al. (2018), foi observado que a sulfonamida

analisada provocou um aumento significativo na expressão de Bax e uma diminuição significativa na expressão de Bcl-2 na linhagem humana de carcinoma colorretal incluída no estudo (HCT-116). Nesse sentido, sabe-se que a proporção entre Bax e Bcl-2 em favor da proteína Bax aumenta a sensibilidade das células à apoptose, o que pode melhorar a eficácia de agentes quimioterápicos (SHARIFI et al., 2014).

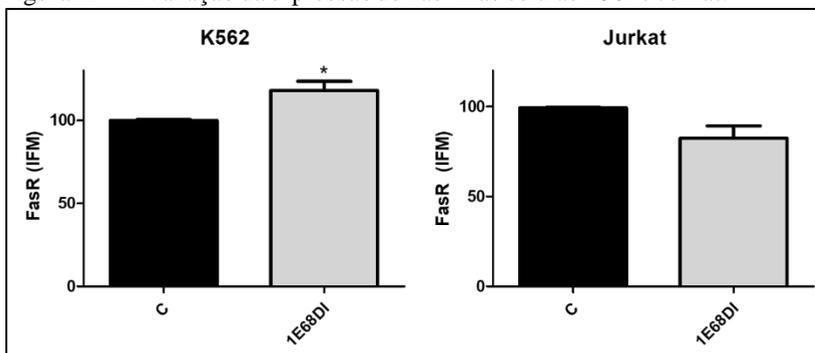
No presente estudo, a sulfonamida analisada, 1E68DI, não provocou diferenças significativas na expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e da proteína pró-apoptótica Bax, entretanto, existem diversas outras proteínas da família Bcl-2 envolvidas na ativação da apoptose intrínseca, como a Bak e a Bok, as quais assim como a Bax, são proteínas pró-apoptóticas que atuam de maneira direta na formação de poros na membrana mitocondrial. Além dessas, existem outras proteínas pró-apoptóticas, tais como Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim, Hrk, PUMA, Noxa, Bmf, e antiapoptóticas, como Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1, Mcl-1. A interação entre essas proteínas pró e antiapoptóticas resulta na formação dos poros na membrana mitocondrial, com conseqüente dissipação do $\Delta\Psi_m$ e bloqueio ou liberação de proteínas envolvidas na ativação de caspases (SHAMAS-DIN et al., 2013; COSENTINO; GARCÍA-SÁEZ, 2014; HASSAN et al., 2014; MOLDOVEANU et al., 2014; PEÑA-BLANCO; GARCÍA-SÁEZ, 2017; GALLUZZI et al., 2018; PFEFFER; SINGH, 2018; SOLANO-GÁLVEZ et al., 2018). Assim, o fato de que no presente trabalho não foram observadas diferenças significativas na expressão de Bax e Bcl-2 não inviabiliza o envolvimento da apoptose intrínseca como um mecanismo de citotoxicidade exercido pela sulfonamida 1E68DI sobre as linhagens K562 e Jurkat, pois existem muitas outras proteínas da família Bcl-2 que não foram avaliadas neste estudo, cuja expressão pode ou não estar alterada após a incubação das células com o composto. Ainda, o período de incubação da sulfonamida com as células pode ser considerado uma limitação desta análise, ou seja, é possível que seja necessário incubar as células com o composto por um período superior para detectar alterações na expressão destas proteínas envolvidas na apoptose intrínseca. Apesar disso, outros resultados demonstraram que a citotoxicidade induzida por 1E68DI em ambas as linhagens de LA incluídas no estudo provoca alterações características de apoptose intrínseca, como a dissipação do $\Delta\Psi_m$ observada em ambas as linhagens, a diminuição da expressão de survivina nas células Jurkat e o aumento da expressão de AIF nas células K562.

5.9.4 Efeito da sulfonamida 1E68DI sobre a expressão do FasR

Durante a apoptose extrínseca, as proteínas da família dos receptores de morte na membrana celular podem traduzir sinais do espaço extracelular ou de células vizinhas a componentes de sinalização presentes tanto na membrana celular como no citoplasma. Entre os receptores de morte está o FasR, cuja ativação por seu respectivo ligante (FasL) gera uma série de eventos, como a ativação da caspase-8 e consequente ativação da caspase-3, o que inicia o processo apoptótico (FULDA, 2015). Assim, após incubar as células K562 e Jurkat com a sulfonamida 1E68DI, avaliou-se o efeito da mesma sobre a expressão de FasR em ambas as linhagens celulares. Na Figura 22 observa-se que 1E68DI provocou um aumento significativo ($18,0 \pm 5,54\%$) na expressão de FasR na linhagem K562 em comparação ao seu respectivo controle, entretanto, na linhagem Jurkat não houve diferença significativa com relação ao controle sem tratamento. Esse resultado indica que a citotoxicidade da sulfonamida 1E68DI pode estar associada não apenas à apoptose intrínseca, conforme demonstrado anteriormente, mas também à apoptose extrínseca, o que é evidenciado na linhagem de LMA K562. Ainda, reforça-se que o composto exerce efeitos distintos sobre as duas linhagens de LA avaliadas, pois as células de LLA Jurkat não apresentaram diferença na expressão de FasR com relação ao controle, e, portanto nessa linhagem não há indicativos de que a citotoxicidade de 1E68DI esteja relacionada à apoptose extrínseca mediada por este receptor. Entretanto, existem outros marcadores de apoptose extrínseca que não foram avaliados neste trabalho, como os receptores de morte TNF e TRAIL (GALLUZZI et al., 2018), cuja expressão pode estar alterada tanto na linhagem Jurkat como na K562.

Na literatura, não foram encontrados trabalhos que avaliassem o efeito de sulfonamidas sobre a expressão de FasR em células de neoplasias hematológicas, excetuando-se o estudo de Bigolin (2016), o qual relatou que a sulfonamida analisada aumentou a expressão de FasR nas linhagens K562 e Jurkat, e não alterou a expressão desta proteína na linhagem de mieloma múltiplo MM.1S.

Figura 22 – Avaliação da expressão de FasR nas células K562 e Jurkat.



As células K562 e Jurkat (1×10^6 células por poço) foram incubadas por 12 horas na ausência (grupo controle), e na presença do composto 1E68DI na sua respectiva CI_{50} _{24h}. A IFM foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-FasR conjugado ao fluorocromo PE. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems*) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7 (Cytognos®). IFM: Intensidade de fluorescência média. *Diferença estatística em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, teste *t* de Student.

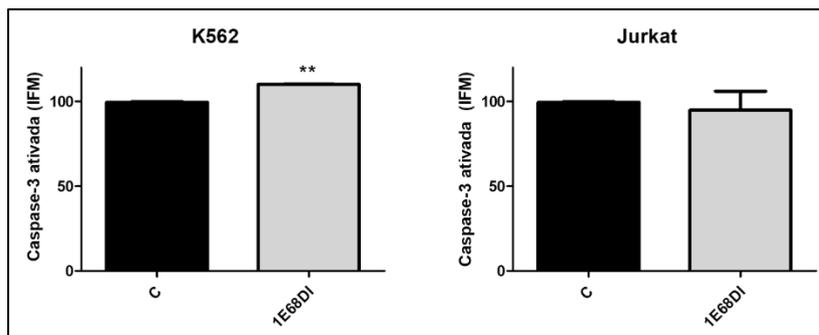
5.9.5 Efeito da sulfonamida 1E68DI sobre a expressão de caspase-3 ativada

A ativação das caspases -3 e -7 faz parte dos eventos finais da apoptose intrínseca e extrínseca, e essas duas enzimas são amplamente conhecidas como caspases efetoras, visto que ambas são responsáveis por executar a morte celular após uma série de modificações morfológicas e bioquímicas. As alterações morfológicas envolvidas na morte celular por apoptose incluem a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA e a formação de *blebs* na membrana celular com consequente formação de corpos apoptóticos. Já as alterações bioquímicas são responsáveis por gerar sinalizações celulares, como a exposição dos resíduos de FS na membrana, para que as células apoptóticas sejam removidas pelos macrófagos, o que ocorre apenas *in vivo* (PORTT et al., 2011; NAGATA et al., 2016; BORYS et al., 2017; GALLUZZI et al., 2018; PFEFFER; SINGH, 2018). Assim, como foram observadas alterações características de apoptose nas células K562 e Jurkat incubadas com 1E68DI, na sequência das investigações foi

avaliada a expressão de caspase-3 ativada após 24 horas de incubação com o composto.

Conforme pode ser observado na Figura 23, a sulfonamida 1E68DI aumentou significativamente a expressão de caspase-3 ativada na linhagem K562 (aumento de $10,69 \pm 0,5\%$). Entretanto, nas células Jurkat não houve diferença significativa na expressão dessa proteína em relação ao grupo controle.

Figura 23 – Avaliação da expressão de caspase-3 ativada nas células K562 e Jurkat.



As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle), e na presença do composto 1E68DI na sua respectiva $CI_{50_{24h}}$. A IFM foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-caspase-3 ativada conjugado ao fluorocromo V450. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos dois experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems*) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7 (Cytognos®). IFM: Intensidade de fluorescência média. **Diferença estatística em relação ao grupo controle, $p \leq 0,005$, teste *t* de Student.

Kamal et al. (2011) investigaram o efeito de uma série de sulfonamidas em células de LMA K562 e observaram um aumento na expressão de caspase-3 após 24 horas de incubação. Em um trabalho realizado anteriormente no LOEH por Bigolin (2016), a sulfonamida avaliada aumentou a expressão de caspase-3 ativada somente nas células K562, enquanto que na linhagem de LLA Jurkat, o composto não causou alterações significativas na expressão dessa proteína, e nas células de mieloma múltiplo MM.1S a expressão de caspase-3 ativada foi significativamente reduzida com relação ao seu respectivo controle. Esses resultados indicam que a sulfonamida selecionada neste trabalho

também exerce citotoxicidade por mecanismos distintos nas linhagens de neoplasias hematológicas utilizadas no estudo.

As diferenças observadas em relação aos efeitos citotóxicos das sulfonamidas utilizadas neste trabalho e no de Bigolin (2016) possivelmente devem-se às diferenças na estrutura química dos compostos selecionados em cada trabalho. No trabalho de Bigolin (2016), a sulfonamida que obteve os resultados mais promissores apresentava apenas dois grupamentos nitro e um grupamento sulfonamídico, além de dois anéis benzênicos derivados da 3,3-difenilpropilamina, utilizada para a síntese do composto. Já no presente estudo, a sulfonamida 1E68DI, conforme mencionado anteriormente, apresenta quatro grupamentos nitro, além da presença de dois grupamentos sulfonamídicos. Entretanto, até o momento, não há informações suficientes para correlacionar a presença desses grupamentos funcionais específicos com a modulação das proteínas e vias avaliadas em ambos os estudos com células de LAs, o que dificulta uma comparação mais aprofundada entre os dois trabalhos.

Os resultados obtidos com as células K562 no presente estudo sugerem que a citotoxicidade de 1E68DI sobre essa linhagem envolve a ativação da apoptose intrínseca e da apoptose extrínseca, pois a redução do $\Delta\Psi_m$ com consequente liberação de AIF pela mitocôndria em conjunto com o aumento da expressão do FasR resultou na ativação da caspase-3. A ativação de caspases efetoras, que pode ocorrer tanto na apoptose intrínseca como na extrínseca, é considerada um evento final desses dois tipos de morte celular (SOLANO-GÁLVEZ et al., 2018), e indica que o processo apoptótico está sendo não apenas iniciado, mas também executado nas células K562.

Por outro lado, sabe-se que a survivina, um membro da família das IAPs, é capaz de inibir algumas caspases, como as caspases -3 e -7, o que resulta na inibição da apoptose (JAISWAL; GOEL; MITTAL, 2015; NEOPHYTOU; CONSTANTINOU, 2017). Entretanto, apesar de ter sido observada uma redução significativa na expressão de survivina nas células Jurkat (Figura 19) após a incubação com 1E68DI, isso parece não estar relacionado a um aumento na expressão de caspase-3 nessa linhagem de LLA. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as características morfológicas e bioquímicas de apoptose observadas na linhagem Jurkat após o tratamento com 1E68DI ocorrem independentemente da ativação da caspase-3. Assim, é possível que o composto promova a ativação de outro tipo de caspase efetora, como a caspase-7, para que ocorra a morte celular por apoptose nessa linhagem. É importante ressaltar, também, que no presente estudo não foi possível

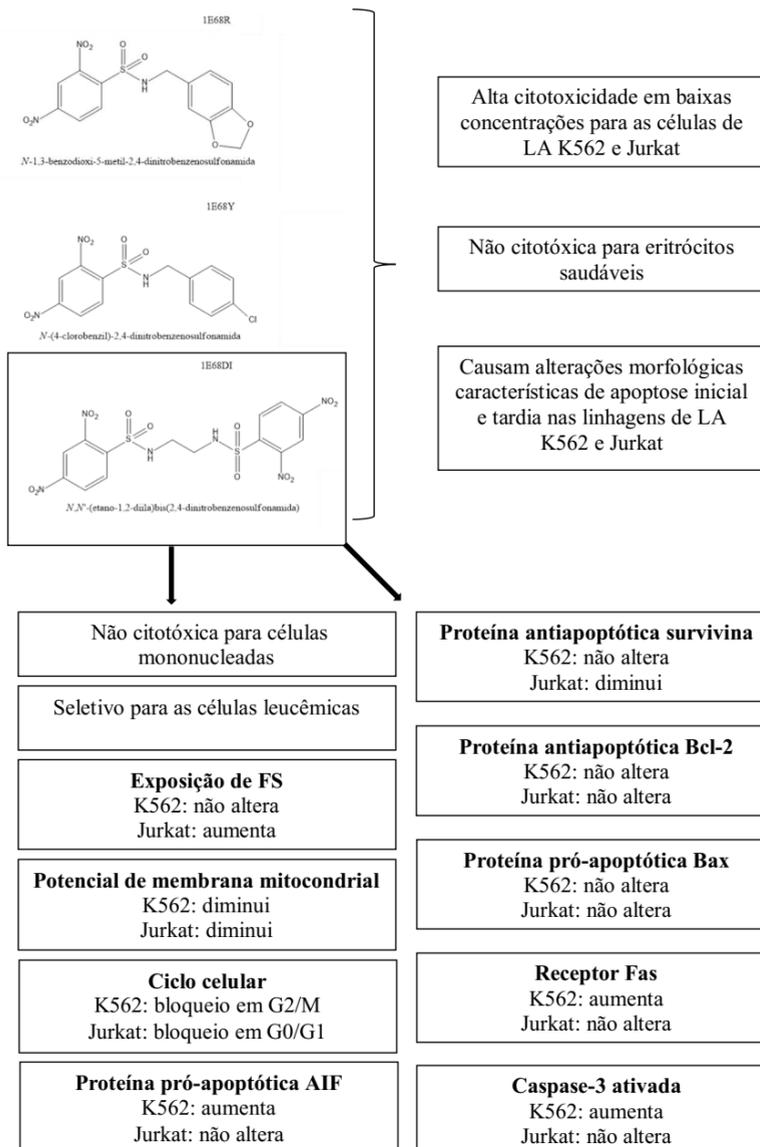
avaliar a expressão de outras proteínas envolvidas na apoptose, como o citocromo c, o qual está envolvido diretamente na ativação de caspases (HASSAN et al., 2014), e o dímero Smac/Diablo, que atua na ativação das caspases devido à sua capacidade de antagonizar a atividade de IAPs (GALLUZZI et al., 2018). A avaliação dessa última proteína seria particularmente importante considerando-se a redução da expressão de survivina observada nas células Jurkat. Ainda, deve-se levar em consideração que mesmo após a permeabilização da mitocôndria é possível ocorrer morte celular independentemente da ativação de caspases (GIAMPAZOLIAS; TAIT, 2018), e que esse mecanismo pode estar relacionado à citotoxicidade de 1E68DI sobre as células Jurkat. Sabe-se que danos à mitocôndria podem levar à liberação de moléculas pró-apoptóticas, como o AIF e a EndoG, as quais são conhecidas por sua capacidade de induzir apoptose sem a participação das caspases (SOLANO-GÁLVEZ et al., 2018). Apesar de não ter sido observada uma diferença significativa na expressão de AIF nas células Jurkat após o tratamento com 1E68DI, é possível que a expressão de EndoG esteja alterada nessa linhagem, entretanto, a expressão dessa enzima não foi avaliada neste estudo. Além disso, em comparação aos resultados obtidos com as células K562, o tratamento com 1E68DI nas células Jurkat provocou menos alterações na expressão das proteínas envolvidas na ativação da apoptose avaliadas no presente estudo. Isso reforça a importância de avaliar outros mecanismos de apoptose nas células Jurkat, bem como a ativação de vias envolvidas com outros tipos de morte celular. Ainda assim, é importante destacar que a heterogeneidade das LAs pode ser responsável pelas diferentes respostas observadas em cada linhagem após o tratamento com o composto.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente trabalho mostram que as três sulfonamidas selecionadas na triagem, 1E68Y, 1E68R e 1E68DI, apresentam alta citotoxicidade para células de LMA (K562) e de LLA (Jurkat) em baixas concentrações, com valores de CI50 inferiores a 10 μM para a maioria das condições avaliadas. A citotoxicidade causada pelos três compostos ocorre de forma dependente do tempo de incubação e da concentração dos mesmos. As três sulfonamidas selecionadas não causam hemólise nas amostras de sangue periférico de indivíduos considerados saudáveis. No entanto, causam alterações morfológicas características de apoptose inicial e tardia em ambas as linhagens de LA avaliadas no estudo. Além disso, a sulfonamida 1E68DI, selecionada para as demais análises por ser a mais citotóxica para as linhagens de LA, não é citotóxica para células mononucleadas de indivíduos considerados saudáveis e se apresenta seletiva para as células leucêmicas, o que indica que esse composto possivelmente poderá apresentar um menor número de efeitos adversos se avaliado em modelos *in vivo*. Os resultados obtidos com 1E68DI permitem concluir que essa sulfonamida exerce seu efeito citotóxico por mecanismos distintos nas linhagens de LA K562 e Jurkat, o que é evidenciado, por exemplo, pelo bloqueio do ciclo celular em diferentes fases em cada linhagem (bloqueio em G2/M nas células K562 e em G0/G1 nas células Jurkat). Apesar de reduzir o $\Delta\Psi\text{m}$ em ambas as linhagens, é evidente que 1E68DI altera a expressão de algumas proteínas envolvidas com a apoptose intrínseca e extrínseca de forma desigual nas células K562 e Jurkat. Enquanto que nas células K562 foram observadas evidências de que a citotoxicidade da sulfonamida selecionada está envolvida tanto na apoptose extrínseca como na intrínseca (Figura 24), com aumento na expressão de FasR, AIF e caspase-3 ativada, nas células Jurkat os resultados demonstraram o envolvimento apenas da apoptose intrínseca (Figura 25), com a diminuição do $\Delta\Psi\text{m}$ e da expressão de survivina. Entretanto, apenas nas células Jurkat o composto causou um aumento significativo da exposição de FS. Isso ressalta a importância da investigação de outras proteínas e vias envolvidas na morte celular causada pelo composto. Assim, a sulfonamida 1E68DI representa um possível candidato ao desenvolvimento de um fármaco para o tratamento de LAs, com potencial efeito indutor de apoptose e na regulação do ciclo celular como estratégias terapêuticas. Porém, são necessários estudos adicionais para elucidar os mecanismos de ação da sulfonamida 1E68DI em modelos de LAs e a resposta *in vivo*.

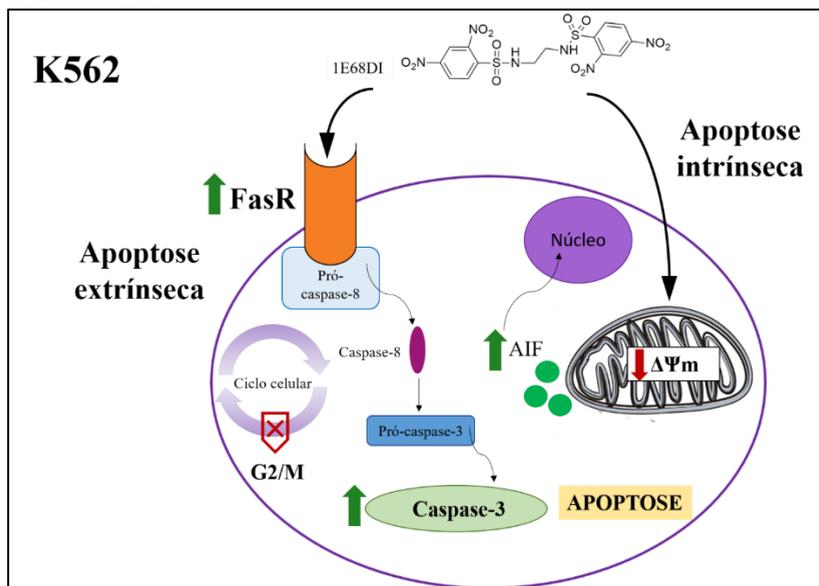
7 COMPILAÇÃO DOS RESULTADOS

7.1 RESUMO GERAL



7.2 REPRESENTAÇÃO DOS EFEITOS DA SULFONAMIDA 1E68DI SOBRE AS CÉLULAS DE LMA K562

Figura 24 – Representação dos efeitos da sulfonamida 1E68DI sobre as células de LMA K562.

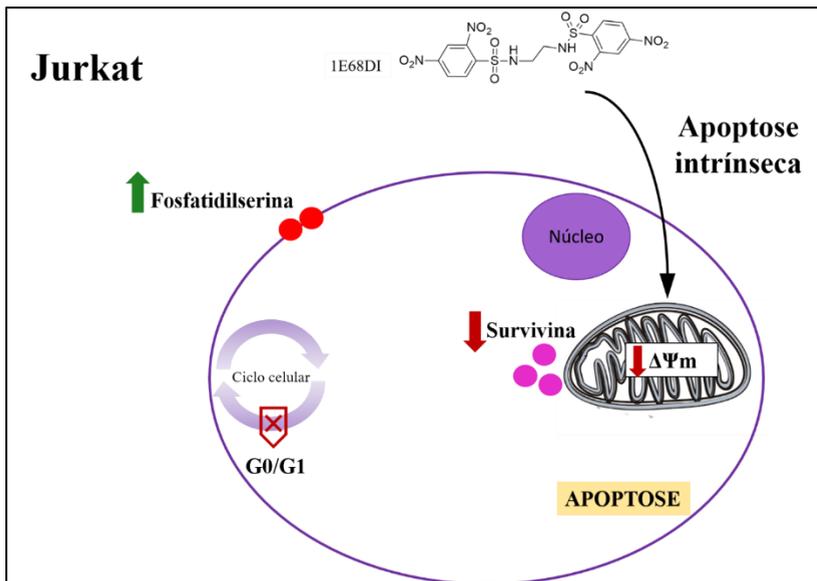


Mecanismos de citotoxicidade da sulfonamida 1E68DI observados nas células K562. A apoptose extrínseca é ativada pelo receptor de morte Fas (FasR). A apoptose intrínseca é ativada pela permeabilização da mitocôndria, resultando na dissipação do $\Delta\Psi_m$ e liberação da proteína pró-apoptótica AIF, a qual é translocada para o núcleo, onde promove a condensação da cromatina. A ativação da apoptose extrínseca e da apoptose intrínseca resulta na ativação da caspase-3 ativada. Além disso, a sulfonamida 1E68DI bloqueia o ciclo celular na fase G2/M.

Fonte: A autora.

7.3 REPRESENTAÇÃO DOS EFEITOS DA SULFONAMIDA 1E68DI SOBRE AS CÉLULAS DE LLA JURKAT

Figura 25 – Representação dos efeitos da sulfonamida 1E68DI sobre as células de LLA Jurkat.



Mecanismos de citotoxicidade da sulfonamida 1E68DI observados nas células Jurkat. O composto provoca a exposição de fosfatidilserina na membrana das células. A apoptose intrínseca é ativada pela permeabilização da mitocôndria, resultando na dissipação do $\Delta\Psi_m$ com diminuição da expressão da proteína antiapoptótica survivina. Além disso, a sulfonamida 1E68DI bloqueia o ciclo celular na fase G0/G1.

Fonte: A autora.

8 PERSPECTIVAS

- Investigar se a sulfonamida 1E68DI causa a fragmentação do DNA das células K562 e Jurkat, em gel de agarose;
- Analisar o efeito da sulfonamida 1E68DI na proliferação celular das linhagens K562 e Jurkat, pela avaliação da expressão da proteína KI-67;
- Verificar se a sulfonamida 1E68DI causa alterações na expressão da proteína p53 nas células K562 e Jurkat;
- Avaliar se a citotoxicidade provocada pela sulfonamida 1E68DI nas células Jurkat envolve a produção de espécies reativas de oxigênio;
- Avaliar a citotoxicidade da sulfonamida 1E68DI em células de MO de pacientes portadores de LAs;
- Analisar o efeito da sulfonamida 1E68DI em combinação com fármacos antileucêmicos utilizados na clínica, para LMA e LLA, nas células K562 e Jurkat;
- Investigar se a citotoxicidade de 1E68DI envolve a ativação de outros fatores reguladores da apoptose, como o citocromo c, a EndoG e outras proteínas da família Bcl-2;
- Analisar o efeito de 1E68DI em modelos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

AGUDO-LÓPEZ, Alba et al. Mechanistic added value of a trans-Sulfonamide-Platinum-Complex in human melanoma cell lines and synergism with cis-Platin. **Molecular Cancer**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.1-1, 23 fev. 2017. Springer Nature.

AL-OBEED, Omar et al. Novel quinazoline-based sulfonamide derivative (3D) induces apoptosis in colorectal cancer by inhibiting JAK2–STAT3 pathway. **Oncotargets And Therapy**, [s.l.], v. 11, p.3313-3322, jun. 2018. Dove Medical Press Ltd.

AL-SAID, Mansour S. et al. Synthesis and in vitro anticancer evaluation of some novel hexahydroquinoline derivatives having a benzenesulfonamide moiety. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 46, n. 1, p.201-207, jan. 2011. Elsevier BV.

ALAOUI, Soukaina et al. Synthesis and anti-cancer activities of new sulfonamides 4-substituted-triazolyl nucleosides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 27, n. 9, p.1989-1992, maio 2017. Elsevier BV.

ALENCAR, Daniel B. et al. Antioxidant, hemolytic, antimicrobial, and cytotoxic activities of the tropical Atlantic marine zoanthid *Palythoa caribaeorum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s.l.], v. 87, n. 2, p.1113-1123, 3 abr. 2015. FapUNIFESP (SciELO).

ANAND, N. Sulfonamides: Structure-Activity Relationships and Mechanism of Action. In: HITCHINGS, G.h. (Ed.). **Inhibition of Folate Metabolism in Chemotherapy: The Origins and Uses of Cotrimoxazole**. Berlin: Springer-verlag Berlin Heidelberg, 1983. Cap. 2. p. 25-54.

ANDRADE, Viviane; SAWADA, Namie Okino; BARICHELLO, Elizabeth. Qualidade de vida de pacientes com câncer hematológico em tratamento quimioterápico. **Revista da Escola de Enfermagem da Usp**, [s. L.], v. 47, n. 2, p.355-361, 2013.

ARBER, Daniel A. et al. THE UPDATED WHO CLASSIFICATION OF HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES: The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, [s.l.], v. 127, n. 20, p.2391-2405, 2016.

ARNOTT, John A.; PLANEY, Sonia Lobo. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. **Expert Opinion On Drug Discovery**, [s.l.], v. 7, n. 10, p.863-875, 19 set. 2012. Informa Healthcare.

ASSIF, Rita et al. Final results of a phase 2, open-label study of indisulam, idarubicin, and cytarabine in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. **Cancer**, [s.l.], v. 124, n. 13, p.2758-2765, 16 abr. 2018. Wiley.

AWADALLAH, Fadi M. et al. Synthesis, carbonic anhydrase inhibition and cytotoxic activity of novel chromone-based sulfonamide derivatives. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 96, p.425-435, maio 2015. Elsevier BV.

BAG, Seema et al. Sulfonamides as multifunctional agents for Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.626-630, fev. 2015. Elsevier BV.

BANO, Daniele; PREHN, Jochen H. M. Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. **Ebiomedicine**, [s.l.], v. 30, p.29-37, abr. 2018. Elsevier BV.

BARAKAT, Khaled. Solubility: A Speed-Breaker on the Drug Discovery Highway. **Moj Bioequivalence & Bioavailability**, [s.l.], v. 3, n. 3, p.56-58, 25 abr. 2017. MedCrave Group, LLC.

BARNUM, Kevin J.; O'CONNELL, Matthew J. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.29-40, 2014.

BAVETSIAS, Vassilios et al. Optimization of Imidazo[4,5-b]pyridine-Based Kinase Inhibitors: Identification of a Dual FLT3/Aurora Kinase Inhibitor as an Orally Bioavailable Preclinical Development Candidate for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 55, n. 20, p.8721-8734, 8 out. 2012. American Chemical Society (ACS).

BEHL, Christian; ZIEGLER, Christine. **Cell Aging: Molecular Mechanisms and Implications for Disease**. *SpringerBriefs in Molecular Medicine*, 2014.

BENTLEY, Ronald. Different roads to discovery; Prontosil (hence sulfa drugs) and penicillin (hence β -lactams). **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [s.l.], v. 36, n. 6, p.775-786, 13 mar. 2009. Springer Nature.

BEDNARCZUK, V. O. et al. TESTES IN VITRO E IN VIVO UTILIZADOS NA TRIAGEM TOXICOLÓGICA DE PRODUTOS NATURAIS. **Visão Acadêmica**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.43-50, 31 dez. 2010. Universidade Federal do Parana.

BENNET, J. M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **British Journal Of Haematology**, [s. L.], v. 33, n. 4, p.451-458, 1976.

_____ Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. **British Journal Of Haematology**, v.51, n.2, p.189-199, 1982.

_____ Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). **British Journal Of Haematology**, v.78, n.3, p.325-9, 1991.

BHATI, Shipra. In Silico Evaluation of Inhibitory Potential of Sulfonamide Derivatives against Diadenosine Tetraphosphate Hydrolase as Antimalarial Agents. **Asian Journal Of Pharmaceutics**, [s. L.], v. 11, n. 1, p.47-52, 2017.

BIGOLIN, Álisson. **INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE MORTE CELULAR INDUZIDO POR COMPOSTOS EM CÉLULAS DE LINHAGENS DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS**. 2016. 142 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

BOECHAT, Nubia et al. Design and Synthesis of New N-(5-Trifluoromethyl)-1H-1,2,4-triazol-3-yl Benzenesulfonamides as Possible Antimalarial Prototypes. **Molecules**, [s.l.], v. 16, n. 9, p.8083-8097, 20 set. 2011. MDPI AG.

BORKOVA, Lucie et al. Lupane and 18 α -oleanane derivatives substituted in the position 2, their cytotoxicity and influence on cancer cells. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 121, p.120-131, out. 2016. Elsevier BV.

BORYCZKA, Stanisław et al. Synthesis and in vitro antiproliferative activity of novel (4-chloro- and 4-acyloxy-2-butynyl)thioquinolines. **Medicinal Chemistry Research**, [s.l.], v. 20, n. 8, p.1402-1410, 17 nov. 2010. Springer Nature.

BORYS, Sylwia et al. Recent Findings of the Types of Programmed Cell Death. **Advances In Cell Biology**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.43-49, 1 jan. 2017. Walter de Gruyter GmbH.

BRASIL. Luiz Antonio Teixeira. Ministério da Saúde (Org.). **De Doença desconhecida a problema de saúde pública: o INCA e o controle do Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2007. 172 p.

BRASIL. Luiz Claudio Santos Thuler. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Educação (Org.). **ABC do câncer: Abordagens básicas para o controle do câncer**. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2012. 129 p.

BRASIL. Maria Inez Pordeus Gadelha. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde (Ed.). **Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em Oncologia**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 356 p.

BRASIL. Christine Dieguez. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde (Ed.). Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca, 2017. 128 p.

BUBNIAK, Lorena dos Santos et al. Effects of 1,3,5-triphenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives on cell-cycle and apoptosis in human acute leukemia cell lines. **Canadian Journal Of Physiology And Pharmacology**, [s.l.], v. 95, n. 5, p.548-563, maio 2017. Canadian Science Publishing.

BURKE, Peter J. Mitochondria, Bioenergetics and Apoptosis in Cancer. **Trends In Cancer**, [s.l.], v. 3, n. 12, p.857-870, dez. 2017. Elsevier BV.

CABRERA, Maia et al. G2/M Cell Cycle Arrest and Tumor Selective Apoptosis of Acute Leukemia Cells by a Promising Benzophenone Thiosemicarbazone Compound. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 9, p.1-21, 11 set. 2015. Public Library of Science (PLoS).

CHANDRAN, Rekha; HAKKI, Morgan; SPURGEON, Stephen. Infections in Leukemia. **Sepsis - An Ongoing And Significant Challenge**, [s.l.], p.333-368, 3 out. 2012. InTech.

CHOI, Jonghoon et al. Physicochemical Characterization and In Vitro Hemolysis Evaluation of Silver Nanoparticles. **Toxicological Sciences**, [s.l.], v. 123, n. 1, p.133-143, 7 jun. 2011. Oxford University Press (OUP).

CHUAIRE, Lilian; CEDIEL, Juan Fernando. Paul Ehrlich: From magic bullets to chemotherapy. **Colombia Médica**, [s. L.], v. 39, n. 3, p.296-300, 2008.

CHUNG, Clement; MA, Hilary. Driving Toward Precision Medicine for Acute Leukemias: Are We There Yet? **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, [s.l.], v. 37, n. 9, p.1052-1072, 31 jul. 2017. Wiley.

COSENTINO, Katia; GARCÍA-SÁEZ, Ana J. Mitochondrial alterations in apoptosis. **Chemistry And Physics Of Lipids**, [s.l.], v. 181, p.62-75, jul. 2014.

CUMAOGLU, Ahmet et al. Synthesis and pro-apoptotic effects of new sulfonamide derivatives via activating p38/ERK phosphorylation in cancer cells. **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 30, n. 3, p.413-419, 8 set. 2014. Informa UK Limited.

CUMMINGS, Brian S.; SCHNELLMANN, Rick G.. Measurement of Cell Death in Mammalian Cells. **Current Protocols In Pharmacology**, [s.l.], p.1-30, set. 2004. John Wiley & Sons, Inc.

DAHAM, Saad et al. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, [s.l.], v. 20, n. 7, p.11808-11829, 26 jun. 2015. MDPI AG.

DAVIS, Amanda S.; VIERA, Anthony J.; MEAD, Monica D. Leukemia: An Overview for Primary Care. **American Family Physician**, [s. L.], v. 89, n. 9, p.731-738, 2014.

DE-SÁ-JÚNIOR, Paulo Luiz et al. RPF101, a new capsaicin-like analogue, disrupts the microtubule network accompanied by arrest in the G2/M phase, inducing apoptosis and mitotic catastrophe in the MCF-7 breast cancer cells. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [s.l.], v. 266, n. 3, p.385-398, fev. 2013. Elsevier BV.

DEBBABI, Khaled F. et al. Synthesis and molecular docking against dihydrofolate reductase of novel pyridin- N -ethyl- N -methylbenzenesulfonamides as efficient anticancer and antimicrobial agents. **Journal Of Molecular Structure**, [s.l.], v. 1131, p.124-135, mar. 2017. Elsevier BV.

DEEMING, Alex S.; RUSSELL, Claire J.; WILLIS, Michael C.. Combining Organometallic Reagents, the Sulfur Dioxide Surrogate DABSO, and Amines: A One-Pot Preparation of Sulfonamides, Amenable to Array Synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v. 54, n. 4, p.1168-1171, 27 nov. 2014. Wiley.

DEININGER, Michael. CELL CYCLE AND GROWTH CONTROL: CURRENT CLINICAL APPLICATIONS. In: STEIN, Gary S.; PARDEE, Arthur B. (Ed.). Cell Cycle and Growth Control: Biomolecular Regulation and Cancer. 2. ed. [s. L.]: John Wiley & Sons, Inc, 2004. p. 669-703.

DINARDO, Courtney D.; CORTES, Jorge E. New treatment for acute myelogenous leukemia. **Expert Opinion On Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.95-106, 5 dez. 2015. Informa Healthcare.

DÖHNER, Hartmut et al. Acute Myeloid Leukemia. **The New England Journal Of Medicine**, [s. L.], v. 373, n. 12, p.1136-1152, 2015.

DOUNGSOONGNUEN, Sutanun et al. Investigation on biological activities of anthranilic acid sulfonamide analogs. **Excli Journal**, [s. L.], v. 1, n. 10, p.155-161, 2011.

DU, Chunying et al. Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. **Cell**, [s.l.], v. 102, n. 1, p.33-42, jul. 2000. Elsevier BV.

DU, Xin et al. Combination of bortezomib and daunorubicin in the induction of apoptosis in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Molecular Medicine Reports**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.101-108, jan. 2017. Spandidos Publications.

DYSHLOVOY, Sergey A. et al. Fronodoside A induces AIF-associated caspase-independent apoptosis in Burkitt lymphoma cells. **Leukemia & Lymphoma**, [s.l.], v. 58, n. 12, p.2905-2915, 16 maio 2017. Informa UK Limited.

EPSTEIN, Franklin H. et al. The Molecular Genetics of Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 319, n. 15, p.990-998, 13 out. 1988. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS).

ESMAEILBEIG, Maryam; KOUHPAYEH, Seyed Amin; AMIRGHOFRAN, Zahra. An Investigation of the Growth Inhibitory Capacity of Several Medicinal Plants From Iran on Tumor Cell Lines. **Iranian Journal Of Cancer Prevention**, [s.l.], v. 8, n. 5, p.1-6, 27 out. 2015. Kowsar Medical Institute.

EVAN, Gerard I.; VOUSDEN, Karen H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, [s.l.], v. 411, n. 6835, p.342-348, 17 maio 2001. Springer Nature.

FADEEL, Bengt et al. Phosphatidylserine Exposure during Apoptosis Is a CellType-Specific Event and Does Not Correlate with Plasma Membrane Phospholipid Scramblase Expression. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s. L.], v. 266, n. 1, p.504-511, 1999.

FAVALORO, B. et al. Role of Apoptosis in disease. **Aging**, [s.l.], v. 4, n. 5, p.330-349, 31 maio 2012. Impact Journals, LLC.

FERREIRA, Daniela; ADEGA, Filomena; CHAVES, Raquel. The Importance of Cancer Cell Lines as in vitro Models in Cancer Methyome Analysis and Anticancer Drugs Testing. In: LOPEZ-

CAMARILLO, Cesar (Ed.). **Oncogenomics and Cancer Proteomics: Novel Approaches in Biomarkers Discovery and Therapeutic Targets in Cancer**. Rijeka: IntechOpen, 2013. Cap. 6. p. 139-166.

FIEGL, Michael. Epidemiology, pathogenesis, and etiology of acute leukemia. In: HIDDEMANN, Wolfgang (Ed.). **Handbook of Acute Leukemia**. Switzerland: Adis, Cham, 2016. Cap. 2. p. 3-13.

FORTIN, Sébastien et al. Substituted phenyl 4-(2-oxoimidazolidin-1-yl)benzenesulfonamides as antimitotics. Antiproliferative, antiangiogenic and antitumoral activity, and quantitative structure-activity relationships. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 46, n. 11, p.5327-5342, nov. 2011. Elsevier BV.

FRAKER, Pamela J. et al. Chapter 4 Quantification of Apoptotic Events in Pure and Heterogeneous Populations of Cells Using the Flow Cytometer. **Cell Death**, [s.l.], p.57-76, 1995. Elsevier.

FRESHNEY, R. Ian. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications**. 7. ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2016. 728 p.

FUENTES-GARÍ, María et al. Cell cycle model selection for leukemia and its impact in chemotherapy outcomes. **12th International Symposium On Process Systems Engineering And 25th European Symposium On Computer Aided Process Engineering**, [s.l.], p.2159-2164, 2015. Elsevier.

FUJITA, Toshio; HANSCH, Corwin. Analysis of the Structure-Activity Relationship of the Sulfonamide Drugs Using Substituent Constants. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 10, n. 6, p.991-1000, nov. 1967. American Chemical Society (ACS).

FULDA, Simone. Targeting extrinsic apoptosis in cancer: Challenges and opportunities. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, [s.l.], v. 39, p.20-25, mar. 2015. Elsevier BV.

GALLUZZI, Lorenzo et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.486-541, 23 jan. 2018. Springer Nature.

GARG, Himani et al. Survivin: a unique target for tumor therapy. **Cancer Cell International**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.1-14, 23 jun. 2016. Springer Nature.

GAVHANE, Y. N. et al. Solid Tumors: Facts, Challenges and Solutions. **International Journal Of Pharma Sciences And Research**, [s. L.], v. 2, n. 1, p.1-12, 2011.

GHORAB, Mostafa M. et al. Novel Thiourea Derivatives Bearing Sulfonamide Moiety as Anticancer Agents Through COX-2 Inhibition. **Anti-cancer Agents In Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 17, n. 10, p.1411-1425, 2 out. 2017. Bentham Science Publishers Ltd.

GHORAB, Mostafa M. et al. Analogue based drug design, synthesis, molecular docking and anticancer evaluation of novel chromene sulfonamide hybrids as aromatase inhibitors and apoptosis enhancers. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 124, p.946-958, nov. 2016. Elsevier BV.

GHORAB, Mostafa M. et al. Design and synthesis of some novel 4-Chloro- N -(4-(1-(2-(2-cyanoacetyl)hydrazono)ethyl)phenyl) benzenesulfonamide derivatives as anticancer and radiosensitizing agents. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 117, p.8-18, jul. 2016.

GIAMPAZOLIAS, Evangelos; TAIT, Stephen W.G. Caspase-independent cell death: An anti-cancer double whammy. **Cell Cycle**, [s.l.], v. 17, n. 3, p.269-270, fev. 2018. Informa UK Limited.

GLAVAL-OBROVAC, Ljubica et al. Antiproliferative and proapoptotic activity of molecular copper(II) complex of N -1-tosylcytosine. **Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology**, [s.l.], p.1-7, out. 2017. Elsevier BV.

GUL, Halise Inci et al. Microwave-assisted synthesis and bioevaluation of new sulfonamides. **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.369-374, jan. 2017. Informa UK Limited.

GREENBERG, Edythe M. (lyn); PROBST, Alexandra. Chronic Leukemia. **Critical Care Nursing Clinics Of North America**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.459-470, dez. 2013. Elsevier BV.

GROSCHER, B.; BUSHMAN, F. Cell Cycle Arrest in G2/M Promotes Early Steps of Infection by Human Immunodeficiency Virus. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 79, n. 9, p.5695-5704, 12 abr. 2005. American Society for Microbiology.

GROSS, Atan; MCDONNELL, James M.; KORSMEYER, Stanley J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes & Development**, [s. L.], v. 15, n. 13, p.1899-1911, 1999.

HARITUNIANS, Talin et al. Novel acyl sulfonamide LY573636-sodium: Effect on hematopoietic malignant cells. **Oncology Reports**, [s. L.], v. 20, n. 1, p.1237-1242, 2008.

HARROLD, Marc W.; ZAVOD, Robin M. Basic Concepts in Medicinal Chemistry. **Drug Development And Industrial Pharmacy**, [s.l.], v. 40, n. 7, p.988-988, 24 abr. 2013. Informa UK Limited.

HASSAN, Mohamed et al. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2014, p.1-23, 2014. Hindawi Limited.

HUGHES, J. P. et al. Principles of early drug discovery. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 162, n. 6, p.1239-1249, 22 fev. 2011. Wiley.

INABA, Hiroto; GREAVES, Mel; MULLIGHAN, Charles G. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, [s.l.], v. 381, n. 9881, p.1943-1955, jun. 2013. Elsevier BV.

IORIO, Francesco et al. A Landscape of Pharmacogenomic Interactions in Cancer. **Cell**, [s.l.], v. 166, n. 3, p.740-754, jul. 2016. Elsevier BV.

JAFFE, E. S.; HARRIS, N. L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J. W. **World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lion: IARC Press, 2001. 352p.

JAY, Venita. A PORTRAIT IN HISTORY: Paul Ehrlich. **Archives Of Pathology & Laboratory Medicine**, [s. L.], v. 125, n. 6, p.725-725, 2001.

JINGWEN, Bai; YAOSHEN, Li; GUOJUN, Zhang. Cell cycle regulation and anticancer drug discovery. **Cancer Biology & Medicine**, [s.l.], v. 14, n. 4, p.348-362, 2017. Cancer Biology and Medicine.

KAMAL, Ahmed et al. Synthesis and apoptosis inducing ability of new anilino substituted pyrimidine sulfonamides as potential anticancer agents. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 46, n. 12, p.5817-5824, dez. 2011. Elsevier BV.

KANG, Seong-mook et al. Inhibition of cancer cell invasion by new ((3,4-dihydroxy benzylidene)hydrazinyl)pyridine-3-sulfonamide analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 26, n. 4, p.1322-1328, fev. 2016. Elsevier BV.

KANG, Zhi-jie et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. **Chinese Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 35, n. 1, p.1-15, 27 maio 2016. Springer Nature.

KARIMIAN, Ansar; AHMADI, Yasin; YOUSEFI, Bahman. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. **DNA Repair**, [s.l.], v. 42, p.63-71, jun. 2016. Elsevier BV.

KASIBHATLA, S. Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis. **Cold Spring Harbor Protocols**, [s.l.], v. 2006, n. 21, p.1-1, 1 ago. 2006. Cold Spring Harbor Laboratory.

KAZI, Julhash U. et al. Drug Testing and Drug Development in Cell Culture. In: BOUHASSIRA, Eric E. (Ed.). **The SAGE Encyclopedia of Stem Cell Research**. 2. ed. New York: Sage Publications, 2015.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **British Journal Of Cancer**, [s. L.], v. 26, n. 4, p.239-257, 1972.

KOŁACZEK, Aneta et al. Biological activity and synthesis of sulfonamide derivatives: a brief review. **Chemik**, [s. L.], v. 68, n. 7, p.620-628, 2014.

KOOPMAN, G. et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, [s. L.], v. 84, n. 5, p.1415-1420, 1994.

KRUYT, Frank A. E.; RODRIGUEZ, Jose A.; GIACCONE, Giuseppe. Apoptosis Pathways and New Anticancer Agents. In: BRONCHUD, Miguel H. et al (Ed.). **Principles of Molecular Oncology**. 3. ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2008. Cap. 12. p. 257-268.

KOYUNCU, Ismail et al. Assessment of the antiproliferative and apoptotic roles of sulfonamide carbonic anhydrase IX inhibitors in HeLa cancer cell line. **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.75-86, 26 out. 2018. Informa UK Limited.

KOYUNCU, Ismail et al. Selective inhibition of carbonic anhydrase-IX by sulphonamide derivatives induces pH and reactive oxygen species-mediated apoptosis in cervical cancer HeLa cells. **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.1137-1149, jan. 2018. Informa UK Limited.

LADINES-CASTRO, W. et al. Morphology of leukaemias. **Revista Médica del Hospital General de México**, [s.l.], v. 79, n. 2, p.107-113, abr. 2016. Elsevier BV.

LANG, Fabian; WOJCIK, Bartosch; RIEGER, Michael A. Stem Cell Hierarchy and Clonal Evolution in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Stem Cells International**, [s.l.], v. 2015, p.1-13, 2015. Hindawi Limited.

LESCH, John E. **THE FIRST MIRACLE DRUGS: How the Sulfa Drugs Transformed Medicine**. New York: Oxford University Press, 2007. 378 p.

LETAI, Anthony. Apoptosis and Cancer. **Annual Review Of Cancer Biology**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.275-294, 6 mar. 2017. Annual Reviews.

LEVENTIS, Peter A.; GRINSTEIN, Sergio. The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. **Annual Review Of Biophysics**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.407-427, abr. 2010. Annual Reviews.

LIM, S.; KALDIS, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development**, [s.l.], v. 140, n. 15, p.3079-3093, 16 jul. 2013. The Company of Biologists.

LING, Taotao et al. Novel vitexin-inspired scaffold against leukemia. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 146, p.501-510, fev. 2018. Elsevier BV.

LIU, He et al. Design and synthesis of sulfonamide-substituted diphenylpyrimidines (SFA-DPPYs) as potent Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors with improved activity toward B-cell lymphoblastic leukemia. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 135, p.60-69, jul. 2017. Elsevier BV.

LOPES, Marcela et al. Synthesis of Nitroaromatic Compounds as Potential Anticancer Agents. **Anti-cancer Agents In Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 15, n. 2, p.206-216, 16 jan. 2015. Bentham Science Publishers Ltd.

LÓPEZ-LÁZARO, Miguel. A Simple and Reliable Approach for Assessing Anticancer Activity In Vitro. **Current Medicinal Chemistry**, [s. L.], v. 22, n. 11, p.1324-1334, 2015.

LOZZIO, Carmen B.; LOZZIO, Bismarck B. Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell-Line With Positive Philadelphia Chromosome. **Blood**, [s. L.], v. 45, n. 3, p.321-334, 1975.

MACHADO, Karina Elisa et al. Apoptotic Events Induced by Maleimides on Human Acute Leukemia Cell Lines. **Chemical Research In Toxicology**, [s.l.], v. 26, n. 12, p.1904-1916, 4 dez. 2013. American Chemical Society (ACS).

MACHANA, Sasipawan et al. Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line. **Chinese Medicine**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.39-47, 2011. Springer Nature.

MADÁCSI, Ramóna et al. Aromatic Sulfonamides Containing a Condensed Piperidine Moiety as Potential Oxidative Stress-Inducing Anticancer Agents. **Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 9, n. 7, p.911-919, 1 ago. 2013. Bentham Science Publishers Ltd.

MAIORAL, Mariana Franzoni et al. Cytotoxic effect of a novel naphthylchalcone against multiple cancer cells focusing on hematologic malignancies. **Biochimie**, [s.l.], v. 140, p.48-57, set. 2017. Elsevier BV.

MAIORAL, Mariana Franzoni et al. MICONIDINE acetate, a new selective and cytotoxic compound with synergic potential, induces cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells. **Investigational New Drugs**, [s.l.], p.1-12, 19 dez. 2018. Springer Nature.

MAREN, T H. Relations Between Structure and Biological Activity of Sulfonamides. **Annual Review Of Pharmacology And Toxicology**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.309-327, abr. 1976. Annual Reviews.

MARZANO, Ivana et al. Crystal Structure, Antibacterial and Cytotoxic Activities of a New Complex of Bismuth(III) with Sulfapyridine. **Molecules**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.1464-1476, 24 jan. 2013. MDPI AG.

MATASSOV, Demetrius et al. Measurement of Apoptosis by DNA Fragmentation. **Apoptosis Methods And Protocols**, [s.l.], p.001-018, 2004. Humana Press.

MEDINGER, Michael; LENGERKE, Claudia; PASSWEG, Jakob. Novel therapeutic options in Acute Myeloid Leukemia. **Leukemia Research Reports**, [s.l.], v. 6, p.39-49, 2016. Elsevier BV.

MEI, Lin et al. Pharmacogenetics predictive of response and toxicity in acute lymphoblastic leukemia therapy. **Blood Reviews**, [s.l.], v. 29, n. 4, p.243-249, jul. 2015. Elsevier BV.

MIRIAN, Mina et al. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Some Novel Sulfonamide Derivatives Against a Few Human Cancer Cells. **Iranian Journal Of Pharmaceutical Research**, [s. L.], v. 10, n. 4, p.741-748, 2011.

MISHRA, Abhay P. et al. Programmed Cell Death, from a Cancer Perspective: An Overview. **Molecular Diagnosis & Therapy**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.281-295, 20 mar. 2018. Springer Nature.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, [s. L.], v. 8, n. 191, p.144-148, 8 jul. 1961.

MOLDOVEANU, Tudor et al. Many players in BCL-2 family affairs. **Trends In Biochemical Sciences**, [s.l.], v. 39, n. 3, p.101-111, mar. 2014. Elsevier BV.

MONTICO, Barbara et al. Immunogenic Apoptosis as a Novel Tool for Anticancer Vaccine Development. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.594-610, 16 fev. 2018. MDPI AG.

MOJZYCH, Mariusz et al. Pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazine sulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors with antitumor activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 22, n. 9, p.2643-2647, maio 2014. Elsevier BV.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunolog. Methods*, 65(1-2): 55-63, 1983.

MUNIRAJ, Femela. Classification of Acute Leukemias: Past, Present, and Future. **IJSS Case Reports & Reviews**, [s. L.], v. 1, n. 12, p.61-66, 2015.

MUNKER, 2007: MUNKER, Reinhold. Acute Myelogenous Leukemias. In: SCHILLER, Gary J. et al (Ed.). **Modern Hematology: Biology and Clinical Management**. 2. ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2007. p. 155-172.

MUNKER, SAKHALKAR, 2007: MUNKER, Reinhold; SAKHALKAR, Vishwas. Acute Lymphoblastic Leukemias. In: MUNKER, Reinhold et al (Ed.). **Modern Hematology: Biology and Clinical Management**. 2. ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2007. p. 173-193.

MURAKAMI, Megumi et al. Synthetic Analogs of Curcumin Modulate the Function of Multidrug Resistance–Linked ATP-Binding Cassette Transporter ABCG2. **Drug Metabolism And Disposition**, [s.l.], v. 45, n. 11, p.1166-1177, 13 set. 2017. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET).

MWIRIGI, Anne; DILLON, Richard; RAJ, Kavita. Acute leukaemia. **Medicine**, [s.l.], v. 45, n. 5, p.280-286, maio 2017. Elsevier BV.

NAGATA, S et al. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. **Cell Death & Differentiation**, [s.l.], v. 23, n. 6, p.952-961, 19 fev. 2016. Springer Nature.

NEOPHYTOU, Christiana M.; CONSTANTINOU, Andreas I. Survivin: Transcriptional Regulation and Protein Function in Cancer. **Journal Of Immunology & Clinical Research**, [s. L.], v. 4, n. 2, p.1041-1047, 2017.

NEPALI, Kunal; LEE, Hsueh-yun; LIOU, Jing-ping. Nitro-Group-Containing Drugs. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], p.1-43, nov. 2018. American Chemical Society (ACS).

NOVOTNY, L. et al. ANTILEUKEMIC ACTIVITY OF SULFONAMIDE CONJUGATES OF ARABINOSYLCYTOSINE. **Experimental Oncology**, [s. L.], v. 28, n. 4, p.293-298, 2006.

OKSUZOGLU, Emine et al. Antitumor activities on HL-60 human leukemia cell line, molecular docking, and quantum-chemical calculations of some sulfonamide-benzoxazoles. **Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology**, [s.l.], v. 45, n. 7, p.1388-1396, 10 nov. 2016. Informa UK Limited.

OLIVEIRA, Aldo Sena de. **Síntese de Derivados da Lausona, Carvacrol,1-Hidroxipirazol e suas Atividades Biológicas**.2014. 275 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

ORTIZ-HIDALGO, Carlos. Notas sobre la historia de la leucemia. **Patología Revista Latinoamericana**, [s. L.], v. 51, n. 1, p.58-69, 2013.

OZAWA, y et al. E7070, a novel sulphonamide agent with potent antitumour activity in vitro and in vivo. **European Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 37, n. 17, p.2275-2282, 2001. Elsevier BV.

PAPADANTONAKIS, Nikolaos; ADVANI, Anjali S. Recent advances and novel treatment paradigms in acute lymphocytic leukemia. **Therapeutic Advances In Hematology**, [s. L.], v. 7, n. 5, p.252-269, 2016.

PAPALIAGKAS, V. et al. The proteins and the mechanisms of apoptosis: A mini-review of the fundamentals. **Hippokratia**, [s. L.], v. 11, n. 3, p.108-113, 2007.

PATRICK, Graham L.; SPENCER, John. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2009. 772 p.

PAUL, Shilpa; KANTARJIAN, Hagop; JABBOUR, Elias J. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. **Mayo Clinic Proceedings**, [s.l.], v. 91, n. 11, p.1645-1666, nov. 2016. Elsevier BV.

PEERY, Robert C.; LIU, Jing-Yuan; ZHANG, Jian-Ting. Targeting survivin for therapeutic discovery: past, present, and future promises. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 22, n. 10, p.1466-1477, out. 2017. Elsevier BV.

PEÑA-BLANCO, Aida; GARCÍA-SÁEZ, Ana J. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. **The Febs Journal**, [s.l.], v. 285, n. 3, p.416-431, 4 set. 2017. Wiley.

PEÑA-MORÁN, Omar et al. Cytotoxicity, Post-Treatment Recovery, and Selectivity Analysis of Naturally Occurring Podophyllotoxins from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* on Breast Cancer Cell Lines. **Molecules**, [s.l.], v. 21, n. 8, p.1013-1028, 4 ago. 2016. MDPI AG.

PENG, J.; ZHANG, G. Y.; XIAO, Z. Q. Effects of celecoxib on the proliferation and apoptosis of human colorectal cancer cell line HT-29. **Zhong Nan da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.**, [s. L.], v. 29, n. 3, p.261-265, 2004.

PEREIRA, Valeska Santana de Sena et al. Cytotoxicity, hemolysis and in vivo acute toxicity of 2-hydroxy-3-anilino-1,4-naphthoquinone derivatives. **Toxicology Reports**, [s.l.], v. 3, p.756-762, 2016. Elsevier BV.

PETRI JUNIOR, William A. Sulfonamides, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, Quinolones, and Agents for Urinary Tract Infections. In: BRUNTON, Laurence L. (Ed.). **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12. ed. New York: Mc Graw Hill Medical, 2011. Cap. 52. p. 1463-1476.

PFEFFER, Claire M.; SINGH, Amareshwar T. K. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.448-458, 2 fev. 2018. MDPI AG.

PILLER, Gordon J. Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. **British Journal Of Haematology**, [s.l.], v. 112, n. 2, p.282-292, fev. 2001. Wiley.

PINGAEW, Ratchanok et al. Novel 1,4-naphthoquinone-based sulfonamides: Synthesis, QSAR, anticancer and antimalarial studies. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 103, p.446-459, out. 2015. Elsevier BV.

PORTT, Liam et al. Anti-apoptosis and cell survival: A review. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Cell Research**, [s.l.], v. 1813, n. 1, p.238-259, jan. 2011. Elsevier BV.

PRAYONG, P.; BARUSRUX, S.; WEERAPREEYAKUL, N. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 79, n. 7-8, p.598-601, dez. 2008. Elsevier BV.

PURVIS, J. E. et al. P53 Dynamics Control Cell Fate. **Science**, [s.l.], v. 336, n. 6087, p.1440-1444, 14 jun. 2012. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

RAJA, Vijay J. et al. Novel antitumour indole alkaloid, Jerantinine A, evokes potent G2/M cell cycle arrest targeting microtubules. **Investigational New Drugs**, [s.l.], v. 32, n. 5, p.838-850, 15 jun. 2014. Springer Nature.

RASHIDI, Armin et al. Maintenance therapy in acute myeloid leukemia: an evidence-based review of randomized trials. **Blood**, [s.l.], v. 128, n. 6, p.763-773, 27 jun. 2016. American Society of Hematology.

RÉBÉ, Cédric; GHIRINGHELLI, François. Cytotoxic effects of chemotherapy on cancer and immune cells: how can it be modulated to generate novel therapeutic strategies? **Future Oncology**, [s.l.], v. 11, n. 19, p.2645-2654, out. 2015. Future Medicine Ltd.

REDDY, M. V. Ramana et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of (E)-N-Aryl-2-arylethanesulfonamide Analogues as Potent and Orally Bioavailable Microtubule-Targeted Anticancer Agents. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 56, n. 13, p.5562-5586, 25 jun. 2013. American Chemical Society (ACS).

REDDY, Neetinkumar D. et al. An appraisal of cinnamyl sulfonamide hydroxamate derivatives (HDAC inhibitors) for anti-cancer, anti-angiogenic and anti-metastatic activities in human cancer cells. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], v. 253, p.112-124, jun. 2016. Elsevier BV.

ROGER, Remi et al. BCR-ABL does not prevent apoptotic death induced by human natural killer or lymphokine-activated killer cells. **Blood**, [s. L.], v. 87, n. 3, p.1113-1122, 1996.

ROSE-INMAN, Hayley; KUEHL, Damon. Acute Leukemia. **Emergency Medicine Clinics Of North America**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.579-596, ago. 2014. Elsevier BV.

ROSE-INMAN, Hayley; KUEHL, Damon. Acute Leukemia. **Hematology/Oncology Clinics Of North America**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.1011-1028, dez. 2017. Elsevier BV.

SACKETT, Dan L. Podophyllotoxin, steganacin and combretastatin: Natural products that bind at the colchicine site of tubulin. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 59, n. 2, p.163-228, jan. 1993. Elsevier BV.

SAKAMURU, Srilatha; ATTENE-RAMOS, Matias S.; XIA, Menghang. Mitochondrial Membrane Potential Assay. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.17-22, 2016. Springer New York.

SALAZAR, Jaime G. de La Garza; SÁNCHEZ, Paula Juárez. **El Cáncer**. Monterrey: Universidad Autónoma de Nuevo León, 2014. 188 p.

SALEEM, Muhammad et al. Benzamide sulfonamide derivatives: potent inhibitors of carbonic anhydrase-II. **Medicinal Chemistry Research**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.438-448, 7 jan. 2016. Springer Nature.

SAMPER, Katia G. et al. Anticancer activity of hydroxy- and sulfonamide-azobenzene platinum(II) complexes in cisplatin-resistant ovarian cancer cells. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 174, p.102-110, set. 2017. Elsevier BV.

SAULTZ, Jennifer N.; GARZON, Ramiro. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. **Journal Of Clinical Medicine**, [s. L.], v. 3, n. 5, p.1-17, 2016.

SAVITSKAYA, M. A.; ONISHCHENKO, G. E. Mechanisms of apoptosis. **Biochemistry (Moscow)**, [s.l.], v. 80, n. 11, p.1393-1405, nov. 2015. Pleiades Publishing Ltd.

SCHNEIDER, Ulrich; SCHWENK, Hans-ulrich; BORNKAMM, Georg. Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 19, n. 5, p.621-626, 15 maio 1977. Wiley.

SCOZZAFAVA, Andrea et al. Anticancer and Antiviral Sulfonamides. **Current Medicinal Chemistry**, [s. L.], v. 10, n. 11, p.925-953, 2003.

SHAH, Syed Shoaib Ahmad; RIVERA, Gildardo; ASHFAQ, Muhammad. Recent Advances in Medicinal Chemistry of Sulfonamides. Rational Design as Anti-Tumoral, Anti-Bacterial and Anti-Inflammatory Agents. **Mini Reviews In Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.70-86, 1 jan. 2013. Bentham Science Publishers Ltd.

SHALTIEL, I. A. et al. The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. **Journal Of Cell Science**, [s.l.], v. 128, n. 4, p.607-620, 20 jan. 2015. The Company of Biologists.

SHAMAS-DIN, A. et al. Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.1-21, 1 abr. 2013. Cold Spring Harbor Laboratory.

SHARIFI, Simin et al. Roles of the Bcl-2/Bax Ratio, Caspase-8 and 9 in Resistance of Breast Cancer Cells to Paclitaxel. **Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention**, [s.l.], v. 15, n. 20, p.8617-8622, 6 nov. 2014. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention.

SHERR, Charles J.; BARTEK, Jiri. Cell Cycle–Targeted Cancer Therapies. **Annual Review Of Cancer Biology**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.41-57, 6 mar. 2017. Annual Reviews.

SINGH, Sudhir K. et al. Nitro and Amino Substitution in the D-Ring of 5-(2-Dimethylaminoethyl)- 2,3-methylenedioxy-5H-dibenzo[c,h][1,6]naphthyridin-6-ones: Effect on Topoisomerase-I Targeting Activity and Cytotoxicity. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 46, n. 11, p.2254-2257, maio 2003. American Chemical Society (ACS).

SOARES, Gisell Apicela et al. Synthesis and in Vitro Cytotoxic Activity of Compounds with Pro-Apoptotic Potential. **Molecules**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.12-26, 24 dez. 2009. MDPI AG.

SOLANO-GÁLVEZ, Sandra et al. Apoptosis: Activation and Inhibition in Health and Disease. **Medical Sciences**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.54-75, 4 jul. 2018. MDPI AG.

SRIVASTAVA, Sonal et al. Principles for In Vitro Toxicology. In: DHAWAN, Alok; KWON, Seok (Ed.). **In Vitro Toxicology**. London: Academic Press, 2018. Cap. 2. p. 21-43.

STEFANES, Natália Marcelli et al. Synthesis of novel pyrazoline derivatives and the evaluation of death mechanisms involved in their antileukemic activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], dez. 2018. Elsevier BV.

STIEHL, Thomas; LUTZ, Christoph; MARCINIAK-CZOCHRA, Anna. Emergence of heterogeneity in acute leukemias. **Biology Direct**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.1-19, 12 out. 2016. Springer Nature.

SUN, Lianqi et al. Novel carbazole sulfonamide derivatives of antitumor agent: Synthesis, antiproliferative activity and aqueous solubility. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.261-265, jan. 2017. Elsevier BV.

SUPURAN, Claudiu T. et al. COX-2 Selective Inhibitors, Carbonic Anhydrase Inhibition and Anticancer Properties of Sulfonamides Belonging to This Class of Pharmacological Agents. **Mini-reviews In Medicinal Chemistry**, [s. L.], v. 4, n. 6, p.625-632, 2004.

SUPURAN, Claudiu. Special Issue: Sulfonamides. **Molecules**, [s.l.], v. 22, n. 10, p.1642-1647, 29 set. 2017. MDPI AG.

SUTHAR, Sharad Kumar et al. Design and synthesis of novel 4-(4-oxo-2-arythiazolidin-3-yl)benzenesulfonamides as selective inhibitors of carbonic anhydrase IX over I and II with potential anticancer activity. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 66, p.372-379, ago. 2013. Elsevier BV.

ŚLAWIŃSKI, J.; BRZOZOWSKI, Z. Synthesis and in vitro antitumor activity of novel series 2-benzylthio-4-chlorobenzenesulfonamide derivatives. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 41, n. 10, p.1180-1189, out. 2006. Elsevier BV.

SWERDLOW, Steven H. et al. (Ed.). **Revised 4th Edition WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon: IARC, 2017. 581 p.

TAČIĆ, Ana et al. Antimicrobial sulfonamide drugs. **Advanced Technologies**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.58-71, 2017. Centre for Evaluation in Education and Science (CEON/CEES).

TAVAKOLFAR, S. et al. In Vitro Anticancer Effects of Two New Potent Hydrazide Compounds on Leukemic Cells. **Anti-cancer Agents In Medicinal Chemistry**, [s. L.], v. 16, n. 12, p.1646-1651, 2016.

TELFORD, William; TAMUL, Karen; BRADFORD, Jolene. Measurement and Characterization of Apoptosis by Flow Cytometry. **Current Protocols In Cytometry**, [s.l.], v. 77, n. 1, p.1-28, jul. 2016. Wiley.

TENNANT, Judith R. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. **Transplantation**, [s. L.], v. 2, n. 6, p.685-694, 1964.

TERWILLIGER, T; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood Cancer Journal**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.1-12, 30 jun. 2017. Springer Nature.

THOMAS, Gareth. **Medicinal chemistry**: an introduction. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2007. 648 p.

THOMAS, Xavier; JEUNE, Caroline Le. Current Management of Adult Acute Lymphoblastic Leukaemia: Emerging Insights and Outstanding Questions. **European Medical Journal: HEMATOLOGY**, [s. L.], v. 4, n. 1, p.117-128, 2016.

USTWANI, Omar Al et al. Clinical updates in adult acute lymphoblastic leukemia. **Critical Reviews In Oncology/hematology**, [s.l.], v. 99, p.189-199, mar. 2016. Elsevier BV.

VAGACE, Jose Manuel; GERVASINI, Guillermo. Chemotherapy Toxicity in Patients with Acute Leukemia. In: ANTICA, Mariastefania (Ed.). **Acute Leukemia: The Scientist's Perspective and Challenge**. Slavka: Intech, 2011. Cap. 17. p. 391-414.

VAN ENGELAND, Manon et al. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, [s. L.], v. 31, n. 1, p.1-9, 1998.

VANCE, Jean E.; TASSEVA, Guergana. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, [s.l.], v. 1831, n. 3, p.543-554, mar. 2013. Elsevier BV.

VISCONTI, Roberta; DELLA MONICA, Rosa; GRIECO, Domenico. Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. **Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 35, n. 1, p.153-161, 27 set. 2016. Springer Nature.

WAINWRIGHT, Mark; KRISTIANSEN, Jette E. On the 75th anniversary of Prontosil. **Dyes And Pigments**, [s.l.], v. 88, n. 3, p.231-234, mar. 2011. Elsevier BV.

WANG, Xiaoguang et al. Chemotherapy-induced differential cell cycle arrest in B-cell lymphomas affects their sensitivity to Wee1 inhibition. **Haematologica**, [s.l.], v. 103, n. 3, p.466-476, 7 dez. 2017. Ferrata Storti Foundation (Haematologica).

WANG, X.; SIMPSON, E. R.; BROWN, K. A. P53: Protection against Tumor Growth beyond Effects on Cell Cycle and Apoptosis. **Cancer Research**, [s.l.], v. 75, n. 23, p.5001-5007, 16 nov. 2015. American Association for Cancer Research (AACR).

WILDING, J. L.; BODMER, W. F. Cancer Cell Lines for Drug Discovery and Development. **Cancer Research**, [s.l.], v. 74, n. 9, p.2377-2384, 9 abr. 2014. American Association for Cancer Research (AACR).

WILLIAMS, Gareth H; STOEBER, Kai. The cell cycle and cancer. **The Journal Of Pathology**, [s.l.], v. 226, n. 2, p.352-364, 28 out. 2011. Wiley.

WONG, Rebecca Sy. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 30, n. 1, p.87-101, 2011. Springer Nature.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. What is cancer? Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>> Acesso em: 10 nov. 2018.

WU, Xing. Dual AO/EB Staining to Detect Apoptosis in Osteosarcoma Cells Compared with Flow Cytometry. **Medical Science Monitor Basic Research**, [s.l.], v. 21, p.15-20, 2015. International Scientific Information, Inc.

YAMAMOTO, Katsuhiko; IKEDA, Yukihiro. Kinetic solubility and lipophilicity evaluation connecting formulation technology strategy perspective. **Journal Of Drug Delivery Science And Technology**, [s.l.], v. 33, p.13-18, jun. 2016. Elsevier BV.

YOSHIMATSU, Kentaro et al. Mechanism of action of E7010, an orally active sulfonamide antitumor agent: inhibition of mitosis by binding to the colchicine site of tubulin. **American Association For Cancer Research**, [s. L.], v. 57, n. 15, p.3208-3213, 1997.

YUAN, Fengli et al. AS1041, a Novel Synthesized Derivative of Marine Natural Compound Aspergiolide A, Arrests Cell Cycle, Induces Apoptosis, and Inhibits ERK Activation in K562 Cells. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 15, n. 11, p.346-362, 4 nov. 2017. MDPI AG.

YURTTAS, Leyla et al. New Quinoline Based Sulfonamide Derivatives: Cytotoxic and Apoptotic Activity Evaluation Against Pancreas Cancer Cells. **Anti-cancer Agents In Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 18, p.1122-1130, 7 mar. 2018. Bentham Science Publishers Ltd.

ZAHR, Abdallah Abou; BORTHAKUR, Gautam. Emerging cell cycle inhibitors for acute myeloid leukemia. **Expert Opinion On Emerging Drugs**, [s.l.], v. 22, n. 2, p.137-148, 3 abr. 2017. Informa UK Limited.

ZHANG, Bo et al. Dimethyl celecoxib sensitizes gastric cancer cells to ABT-737 via AIF nuclear translocation. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, [s.l.], v. 20, n. 11, p.2148-2159, 4 jul. 2016. Wiley.

ZHANG, Lei et al. Aromatic heterocyclic esters of podophyllotoxin exert anti-MDR activity in human leukemia K562/ADR cells via ROS/MAPK signaling pathways. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 123, p.226-235, nov. 2016. Elsevier BV.

ZHAO, Haobin et al. Potential of Bacillus subtilis lipopeptides in anti-cancer I: induction of apoptosis and paraptosis and inhibition of autophagy in K562 cells. **Amb Express**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-16, 9 maio 2018. Springer Nature.

ZHENG, Yan-bo et al. A Novel Nitrobenzoate Microtubule Inhibitor that Overcomes Multidrug Resistance Exhibits Antitumor Activity. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-12, 11 ago. 2016. Springer Nature.

ZHU, Rui et al. 4-Nitrobenzyloxycarbonyl Derivatives of O⁶-Benzylguanine as Hypoxia-Activated Prodrug Inhibitors of O⁶-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase (AGT), Which Produces Resistance to Agents Targeting the O⁶ Position of DNA Guanine. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 54, n. 21, p.7720-7728, 10 nov. 2011. American Chemical Society (ACS).

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Maria Cláudia Santos da Silva

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 80430317.0.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.838.107

Apresentação do Projeto:

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

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

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

Objetivo Secundário:

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401

Bairro: Trindade

CEP: 88.040-400

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3721-6094

E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 2.838.107

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

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

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

Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

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

Continuação do Parecer: 2.838.107

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes documentos obrigatórios:

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

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

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram detectadas pendências ou inadequações neste projeto.

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 2.838.107

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1004163.pdf	13/08/2018 11:52:19		Aceito
Outros	carta_resposta_agosto.docx	13/08/2018 11:43:45	Mariana Franzoni Maioral	Aceito
Cronograma	cronograma_modificado_agosto.docx	13/08/2018 11:42:56	Mariana Franzoni Maioral	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado_agosto.docx	13/08/2018 11:42:47	Mariana Franzoni Maioral	Aceito
Folha de Rosto	folha.pdf	27/11/2017 15:16:51	Mariana Franzoni Maioral	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_maclau.pdf	06/11/2017 14:46:37	Mariana Franzoni Maioral	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_hu.pdf	06/11/2017 14:45:24	Mariana Franzoni Maioral	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	pesquisa_PB.doc	07/10/2017 14:27:16	Mariana Franzoni Maioral	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 22 de Agosto de 2018

Assinado por:
Maria Luiza Bazzo
(Coordenador)

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