



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

João Vitor Steimbach

**Envolvimento do NF- $\kappa$ B na Apoptose Provocada pelas Imidazopiridinas  
DSH55 e DSH56 em Células de Linhagem de Leucemia Mieloide Aguda.**

Florianópolis

2024

João Vitor Steimbach

**Envolvimento do NF- $\kappa$ B na Apoptose Provocada pelas Imidazopiridinas  
DSH55 e DSH56 em Células de Linhagem de Leucemia Mieloide Aguda.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva

Florianópolis

2024

Steimbach, João Vitor

Envolvimento do NF- $\kappa$ B na apoptose provocada pelas imidazopiridinas DSH55 e DSH56 em células de linhagem de leucemia mieloide aguda / João Vitor Steimbach ; orientadora, Maria Claudia Santos Silva, 2024.

83 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Leucemia Mielóide Aguda. 3. Imidazopiridinas. 4. Citotoxicidade. 5. Compostos inéditos. I. Silva, Maria Claudia Santos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

João Vitor Steimbach

**Envolvimento do NF- $\kappa$ B na Apoptose Provocada pelas Imidazopiridinas DSH55 e DSH56 em Células de Linhagem de Leucemia Mieloide Aguda.**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 26 de fevereiro de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Alfeu Zanotto Filho Dr.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Eduardo Monguilhott Dalmarco, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Ana Carolina Rabello de Moraes, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Insira neste espaço a  
assinatura digital

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a  
assinatura digital

---

Profa. Maria Cláudia Santos da Silva, Dra.  
Orientadora

Florianópolis, 2024.



## AGRADECIMENTOS

Escrever a sessão de agradecimentos de uma dissertação com certeza é uma das etapas mais difíceis para mim. São tantas pessoas, tantos momentos, dignos de agradecimento, que é certo que falharei, contudo, preciso tentar.

Não há nesse mundo pessoas que mais me apoiaram que meus pais, **Angela e Dirceu**, e minha irmã **Ana Carolina**, responsáveis pela minha curiosidade, sede de saber e senso de dever para com um mundo melhor. Mãe, nunca me esquecerei daquilo que me falou. Pai, obrigado por ser a força que muitas vezes me falta. E Carol, obrigado pelo seu apoio incondicional.

Agradeço a minha namorada, **Giulia**, que bravamente ouviu minhas lamentações e com amor, me instigou a alcançar esse objetivo em momentos tão difíceis.

Àquelas que fizeram dessa trajetória um período alegre, descontraído e de grande crescimento, minhas amigas de laboratório, **Laura, Lisandra, Maria Eduarda e Natália**, agradeço com carinho, e com a esperança de que nossos caminhos se cruzarão novamente.

Agradeço ao professor **Ricardo Affeldt** e ao **LACFI**, pela conceptualização, síntese e caracterização magistrais dos compostos experimentais utilizados, que a parceria dos laboratórios continue, com ótimos resultados e contribuindo para o avanço da ciência.

Ainda, sou grato às instituições **Capes** e **UFSC**, que possibilitaram a realização desse trabalho, por meio de instalações que supriram todas as necessidades e pelo auxílio financeiro prestado.

Por fim, mas não menos importante, agradeço à minha orientadora, **Maria Cláudia**, que me instruiu com carinho, competência e experiência por anos, a fim de formar mais um pesquisador capaz e independente. Sou grato por ser orientado por uma pesquisadora que sempre foi solícita e pode atender aos meus anseios, em especial nos últimos meses.

Agradeço a todos e desejo um futuro brilhante para todos que me ajudaram em cada etapa. Muito obrigado!



## RESUMO

As neoplasias hematológicas estão entre as principais causas de morte em todo mundo, e, entre elas, está a leucemia mieloide aguda (LMA). Caracterizada pela proliferação clonal descontrolada de progenitores mielóides, o tratamento da LMA visa eliminar as células leucêmicas e estabelecer a hematopoiese normal. Apesar do investimento tecnológico em novas estratégias para o tratamento das leucemias, a quimioterapia ainda é forma mais utilizada, no entanto, está associada a muitos efeitos adversos, recidivas e altas taxas de morbidade e mortalidade. Por isso o desenvolvimento de novos quimioterápicos se faz necessário. Na literatura, vários trabalhos demonstram diversas atividades biológicas das imidazopiridinas, entre elas, antineoplásicas. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade citotóxica de duas imidazopiridinas, DSH55 e DSH56, sobre células de linhagem de LMA (K562). Os resultados mostram que ambos os compostos foram citotóxicos para as células neoplásicas de maneira tempo-concentração dependentes e mostraram menos atividade sobre células mononucleares de doadores saudáveis. Além disso, as imidazopiridinas avaliadas não causaram hemólise, mesmo em concentrações cinco vezes maiores que a  $CI_{50}$  em K562. A morte celular por apoptose foi confirmada pela presença das alterações morfológicas características e pela presença da exposição de resíduos de fosfatidilserina na membrana. Na investigação do mecanismo de citotoxicidade, foi observado que os compostos causaram aumento de FasR e de espécies reativas de oxigênio (ERO), o que indica que ambos causam apoptose intrínseca e extrínseca pela perda do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), liberação do fator indutor da apoptose (AIF), inversão do balanço Bax/Bcl-2 e aumento em duas vezes da expressão de caspase 3 ativada. Além disso, foi observada uma diminuição da expressão de survivina após tratamento com DSH55 por 18 horas. Adicionalmente, ambos compostos causaram bloqueio do ciclo celular após incubação de 18 horas e inibiram a fosforilação do fator nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ). Esses resultados sugerem que as imidazopiridinas, DSH55 e DSH56, são citotóxicas para células de linhagem de LMA e o estudo do mecanismo de apoptose sugere que são moléculas bioativas promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos para LMA.

**Palavras-chave:** Imidazopiridinas. Apoptose. Leucemia mieloide aguda.



## ABSTRACT

Hematologic malignancies are among the leading causes of death worldwide, and acute myeloid leukemia (AML) is responsible for many of those deaths. Characterized by myeloid progenitors' clonal proliferation, AML's treatment aims on eliminating neoplastic cells and reestablish normal hematopoiesis. Despite of recent technological advances in new treatment options, chemotherapy is still the most common form of treatment, even though it has been associated with a plethora of side effects, relapses and high rates of morbidity and mortality. Therefore, the development of new chemotherapeutic agents remains necessary. As imidazopyridines have shown a wide range of biological activities, including antineoplastic effects, the aim of this study is to evaluate the cytotoxic activity of two imidazopyridines, DSH55 and DSH56, using an AML cell line. Both compounds were cytotoxic to K562 cells in a time-dose dependent manner and showed less cytotoxicity to healthy individuals' peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Additionally, neither caused hemolysis, even at concentration five times the IC<sub>50</sub> for K562 cells. Apoptotic cell death induced by DSH55 and DSH56 was confirmed through morphological analysis, externalization of phosphatidylserine residues and after apoptosis-related proteins evaluation. Increases in FasR expression and reactive oxygen species (ROS) production indicated that both compounds caused intrinsic and extrinsic apoptosis through  $\Delta\Psi_m$  loss, apoptose induction factor (AIF) release, inversion of the Bax/Bcl-2 ratio, and a doubling in activated caspase 3 expression. Furthermore, a decrease in survivin expression was observed after treatment with DSH55, and cell cycle arrest was achieved after treatment with both compounds for 18 hours. Moreover, both imidazopyridines significantly inhibited nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) phosphorylation, which is a promising result. In summary, these findings indicate that both imidazopyridines are suitable for the development of new AML treatments. **Keywords:** Imidazopyridines; apoptosis; acute myeloid leukemia.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura química básica de uma imidazopiridina .....	19
Figura 2 Estrutura química dos compostos DSH55 e DSH56 .....	20
Figura 3 Mecanismo da apoptose intrínseca .....	22
Figura 4 Mecanismo da apoptose intrínseca .....	23
Figura 5 O ciclo celular e seus mecanismos regulatórios .....	26
Figura 6 A via canônica do NF- $\kappa$ B .....	28
Figura 7 Representação das características de biodisponibilidade oral dos compostos DSH55 e DSH56 .....	40
Figura 8 Efeito citotóxico do DSH55 e DSH56 em células K562 .....	42
Figura 9 Efeito citotóxico dos compostos DSH55 e DSH56 em células mononucleares isoladas de SP .....	44
Figura 10 Efeito dos compostos DSH55 e DSH56 sobre eritrócitos de SP .....	45
Figura 11 Efeito do DSH55 e DSH56 na progressão do ciclo celular das células K562 .....	46
Figura 12 Alterações morfológicas induzidas pelo DSH55 e pelo DSH56 em células K562 .....	47
Figura 13 Efeito dos compostos DSH55 e DSH56 na exposição de resíduos de fosfatidilserina em células K562 .....	48
Figura 14 Efeitos dos compostos DSH55 e DSH56 no $\Delta\Psi$ M de células K562 após tratamento .....	49
Figura 15 Efeito dos compostos DSH55 e DSH56 na expressão das proteínas Bcl-2 e Bax em células K562 .....	50
Figura 16 Efeito dos compostos DSH55 e DSH56 na expressão da proteína AIF em células K562 .....	51
Figura 17 Efeito dos compostos DSH55 e DSH56 na expressão do receptor FAS .....	52
Figura 18 Efeito dos compostos DSH55 e DSH56 na expressão de caspase 3 ativada em células K562 .....	53
Figura 19 Efeito dos compostos DSH55 e DSH56 na expressão da proteína survivina em células K562 .....	54
Figura 20 Efeito do tratamento com DSH55 e e DSH56 nas concentrações de p65 e p- NF- $\kappa$ B .....	56
Figura 21 Mecanismo proposto para ação das imidazopiridinas .....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AIF</b>	Fator indutor da apoptose
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>APAF-1</b>	Fator indutor da apoptose 1
<b>BAX</b>	Proteína X associada a Bcl-2
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>BCL-2</b>	Do inglês, <i>B cell lymphoma 2</i>
<b>BE</b>	Brometo de etídio
<b>BSA</b>	Albumina do soro bovino
<b>CDKs</b>	Quinases dependentes de ciclinas
<b>CEPSH</b>	Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos
<b>CF</b>	Citometria de fluxo
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória de 50%
<b>CNMC</b>	Comitê de Nomenclatura em Morte Celular
<b>DISC</b>	Complexo sinalizador indutor de apoptose
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>ERO</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FasR</b>	Receptor Fas
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FSC</b>	Do inglês, <i>forward scatter</i>
<b>HEPES</b>	N-[2-hidroxietil]piperazina-N'[2-etanosulfônico]
<b>IKK</b>	IκB quinase

<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IS</b>	Índice de seletividade
<b>IκB</b>	Inibidor do complexo κB
<b>LA</b>	Laranja de acridina
<b>LMA</b>	Leucemia mieloide aguda
<b>LOEH</b>	Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias
<b>MO</b>	Medula óssea
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
<b>NF-κB</b>	Fator nuclear kappa B
<b>OMS</b>	Organização mundial da saúde
<b>PBMC</b>	Do inglês, <i>peripheral blood mononuclear</i>
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PercP</b>	Complexo proteína peridina-clorofila
<b>PI</b>	Iodeto de propídio
<b>RCD</b>	Do inglês, <i>regulated cell death</i>
<b>RIPA</b>	Do inglês, <i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
<b>RNAse</b>	Ribonuclease
<b>RPMI</b>	Do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SDS</b>	Docetil Sulfato de Sódio
<b>SP</b>	Sangue periférico
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>UFSC</b>	Universidade Federal de Santa Catarina
<b>WB</b>	Western Blotting
<b>ΔΨ<sub>m</sub></b>	Potencial de membrana mitocondrial

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 OBJETIVOS .....	15
2.1 OBJETIVO GERAL .....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
3 REVISÃO DA LITERATURA .....	16
3.1 NEOPLASIAS .....	16
3.1.1 Leucemia mieloide aguda .....	16
3.2 NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS .....	18
3.3 IMIDAZOPIRIDINAS .....	18
3.4 REGULAÇÃO DA MORTE CELULAR E POSSÍVEIS ALVOS TERAPÊUTICOS .....	20
3.5 MORTE CELULAR .....	20
3.5.1 Apoptose .....	21
3.6 CICLO CELULAR .....	24
3.7 A VIA DO NF- $\kappa$ B.....	27
4 METODOLOGIA.....	29
4.1 ORIGEM DOS COMPOSTOS .....	29
4.2 PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i> DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS .....	29
4.3 CULTIVO CELULAR.....	29
4.4 VIABILIDADE CELULAR .....	30
4.5 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA COM BROMETO DE ETÍDIO (BE) E LARANJA DE ACRIDINA (LA) .....	31
4.6 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DOS RESÍDUOS DE FOSFATIDILSERINA POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	32
4.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS IMIDAZOPIRIDINAS SOBRE CÉLULAS DE SP .....	32
4.7.1 Avaliação do potencial hemolítico.....	32
4.7.2 Citotoxicidade sobre células não neoplásicas.....	33
4.8 AVALIAÇÃO DO EFEITOS DAS IMIDAZOPIRIDINAS SOBRE O CICLO CELULAR.....	34
4.9 AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR (BCL-2, BAX, AIF, FASR, CASPASE 3 ATIVADA E SURVIVINA) .....	34

4.10 AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE NF- $\kappa$ B E P-NF- $\kappa$ B POR WESTERN BLOTTING .....	36
4.11 AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO DO $\Delta\Psi_m$ .....	37
4.12 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ERO.....	38
4.13 EXPRESSÃO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	38
5 RESULTADOS.....	40
5.1 PREDIÇÃO IN SILICO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS E BIOLÓGICAS .....	40
5.2 EFEITO CITOTÓXICO DAS IMIDAZOPIRIDINAS DSH55 E DSH56 SOBRE PBMC .....	43
5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO HEMOLÍTICO INDUZIDO PELOS COMPOSTOS DSH55 E DSH56 EM ERITRÓCITOS HUMANOS.....	44
5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE O CICLO CELULAR.....	45
5.5 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA APOPTOSE.....	46
5.5.1 Avaliação das alterações morfológicas por microscopia de fluorescência com BE e LA.....	46
5.5.2 Detecção da externalização de resíduos de fosfatidilserina.....	47
5.6 AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO DO $\Delta\Psi_m$ .....	48
5.7 AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE .....	49
5.8 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE AS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA BCL-2 (BAX E BCL-2).....	49
5.9 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE O AIF .....	50
5.10 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS NO RECEPTOR FAS (FasR) .....	51
5.11 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE A CASPASE 3 ATIVADA.....	52
5.12 EFEITO DOS COMPOSTOS DSH55 E DSH56 SOBRE A PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA SURVIVINA.....	53
5.13 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS DSH55 E DSH56 NA FORMAÇÃO DE ERO.....	54
5.14 EFEITO DAS IMIDAZOPIRIDINAS SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE NF- $\kappa$ B (p65) E p-NF- $\kappa$ B.....	55
6 DISCUSSÃO .....	57
7 CONCLUSÃO .....	68
REFERÊNCIAS.....	70

ANEXO A – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE APRECIÇÃO ÉTICA80





## 1 INTRODUÇÃO

A LMA é caracterizada como uma doença de proliferação clonal descontrolada de progenitores mieloides que se acumulam na medula óssea (MO), que pode levar à insuficiência medular e em casos graves à óbito. Configura entre as neoplasias mais frequentes globalmente, com 474.519 novos casos estimados no ano de 2020 em todo mundo (SUNG et al., 2021). Em relação ao Brasil, foram estimados 11.540 novos casos de LMA para o triênio 2023-2025, o que classifica essa classe de neoplasias como a décima mais incidente no Brasil, sem considerar o câncer de pele não-melanoma (SANTOS et al., 2023). Além disso, a sobrevida global dos pacientes menores de 15 anos diagnosticados no Brasil é de apenas 57% (DE LIMA et al., 2016).

A baixa sobrevida global se deve, em parte, por falhas terapêuticas ocasionadas pela aquisição de resistência aos quimioterápicos utilizados e pelo número limitado de opções disponíveis para o tratamento dessas neoplasias. Apesar disso, exceto pelo advento da imunoterapia, o tratamento das neoplasias hematológicas sofreu poucas alterações nos últimos quarenta anos (KANTARJIAN et al., 2021).

Considerando do aumento global na incidência de neoplasias malignas (SUNG et al., 2021), sobretudo em países em desenvolvimento como o Brasil, aliado a altas taxas de recidivas, ao alto custo dos tratamentos disponíveis e à citotoxicidade não seletiva dos agentes antineoplásicos usados nos esquemas terapêuticos, é evidente a necessidade da busca por novos tratamentos custo-efetivos que apresentem poucos ou nenhum efeito adverso para os pacientes. No entanto, esse ainda é um desafio para os pesquisadores na área da oncologia em todo mundo.

Nesse contexto, as imidazopiridinas destacam-se como uma classe de compostos cuja estrutura química fundamental apresenta grande potencial como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos (SHARMA et al., 2021). Na literatura, vários trabalhos demonstram diferentes atividades biológicas de derivados estruturais de imidazopiridinas, tais quais antituberculosa (TETALI et al., 2020), antimalária (PENZO et al., 2019) e antineoplásica (BACCON-SOLLIER et al., 2020; DAMGHANI et al., 2021; GÜÇLÜ et al., 2018; SHARMA et al., 2021).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade citotóxica *in vitro* de duas imidazopiridinas, a 3-benzil-2-(2-metoxifenil)imidazo[1,2-a]piridina e a 3-benzil-2-(3-metoxifenil)imidazo[1,2-a]piridina, DSH55 e DSH56, respectivamente, sobre células de linhagem de LMA (K562). Bem como investigar os possíveis mecanismos de morte celular envolvidos na citotoxicidade de ambos os compostos. Com isso, o presente estudo busca contribuir com o esforço mundial na investigação de novas opções terapêuticas para o tratamento das neoplasias hematológicas, pela introdução de dois novos compostos para o desenvolvimento de fármacos antileucêmicos seletivos para as células neoplásicas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito e a seletividade dos compostos DSH55 e DSH56 sobre células de linhagem de LMA, bem como investigar os possíveis mecanismos de morte celular envolvido na citotoxicidade de ambos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o potencial efeito citotóxico do DSH55 e do DSH56 em relação à concentração e ao tempo de incubação sobre uma linhagem celular humana de LMA (K562).
- Determinar a concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) de ambos os compostos sobre células K562.
- Investigar o potencial efeito citotóxico dos compostos sobre células não neoplásicas, em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e eritrócitos de indivíduos considerados clinicamente saudáveis.
- Calcular o índice de seletividade (IS) dos compostos DSH55 e DSH56 para a linhagem K562 em relação aos PBMC.
- Verificar o efeito de ambos os compostos sobre o ciclo celular na linhagem K562.
- Investigar se o efeito dos compostos DSH55 e DSH56 sobre células de LMA envolve a formação de ERO.
- Analisar a morfologia das células neoplásicas após exposição ao DSH55 e DSH56.
- Avaliar o efeito dos compostos sobre o  $\Delta\Psi_m$  das células K562 e investigar a expressão de fatores reguladores da apoptose (Bax, Bcl-2, fator indutor da apoptose, survivina, caspase 3 ativada e FasR) no potencial efeito citotóxico de ambos os compostos.

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 NEOPLASIAS**

O termo neoplasia, sinônimo de câncer, tem origem no grego antigo e é definido como “novo crescimento”. Esse termo é utilizado para denominar um grupo heterogêneo de doenças que têm como característica comum a proliferação clonal e descontrolada de células no organismo (SCHMIDT et al., 2021). Tumores, outra denominação utilizada para referir-se às neoplasias, podem ser classificados entre malignos e benignos, quanto ao seu prognóstico, dadas as características de proliferação e invasão. Assim, tumores malignos são caracterizados como aqueles que apresentam risco de invasão a outros tecidos e proliferação exacerbada (UPADHYAY, 2021).

Os motivos que levam ao desenvolvimento de uma neoplasia maligna em determinado paciente podem ser, por vezes, escusos. Contudo, a etiologia dos cânceres é sabidamente derivada de desordens genéticas ou epigenéticas, herdadas e/ou adquiridas (CANNATARO; MANDELL; TOWNSEND, 2022). Em decorrência de tais alterações genéticas, em genes ligados à proteínas-chave, células que antes contribuíam para com a homeostasia do organismo passam a proliferar de forma descontrolada e a evadir mecanismos de vigilância e indução de morte celular programada. O que culmina na origem de células filhas que carregam um perfil semelhante de mutações (PALOZOLA; LERNER; ZARET, 2019).

A aquisição de um conjunto de mutações leva às células a apresentarem características essenciais para o início e para manutenção de uma neoplasia. Essas características foram descritas e denominadas no ano de 2000 como “características do câncer” (HANAHAN; WEINBERG, 2000) e atualizadas em 2022 com a inclusão da capacidade plástica dos tumores de moldarem seu fenótipo frente às adversidades e do valor epigenético para o desenvolvimento dessas doenças (HANAHAN, 2022).

##### **3.1.1 Leucemia mieloide aguda**

Dentre as mais de cem neoplasias conhecidas, destacam-se as neoplasias hematológicas, as quais atingem indivíduos de todas as faixas etárias e configuram entre as dez causas de morte mais frequentes no Brasil (INCA, 2021). Grande parte dessas mortes são causadas em decorrência das leucemias agudas, um grupo de neoplasias hematológicas com características invasivas e de desenvolvimento muito

rápido. A LMA é mais frequente em pacientes adultos e a sua incidência aumenta com a idade, sendo mais expressiva em indivíduos acima de 65 anos, os quais apresentam uma sobrevida de cinco anos em apenas 25% dos casos, e um prognóstico ainda pior em função da alta incidência de anormalidades genéticas desfavoráveis (DE LIMA et al., 2016).

O diagnóstico das leucemias agudas deve obedecer aos critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2022 (CONITEC, 2014; KHOURY et al., 2022a; SWERDLOW et al., 2016). O diagnóstico frequentemente se inicia com a detecção das células leucêmicas nas amostras de sangue periférico (SP) no hemograma dos pacientes. De acordo com os critérios da OMS, para ser considerado um caso de LMA, o paciente deve apresentar 20% ou mais de mieloblastos no SP e/ou MO, ou presença de alterações genéticas características em LMA (KHOURY et al., 2022b).

Classificadas de acordo com o ramo maturativo afetado, as leucemias agudas são divididas entre linfoides e mieloides (KHOURY et al., 2022a; SWERDLOW et al., 2016). Em ambos os casos, as células comprometidas são os progenitores hematopoiéticos das devidas linhagens, localizados na MO e responsáveis pela reposição dos leucócitos, hemácias e plaquetas senescentes. Por isso, uma das principais consequências da LMA é a depleção de células saudáveis provenientes do ramo mieloide em circulação, na clínica, conhecida como pancitopenia (VARGAS-CARRETERO et al., 2019).

Para determinar com precisão o ramo afetado, grau de maturação e marcadores de interesse clínicos são empregadas metodologias complementares ao hemograma. Para isso, são utilizadas a imunofenotipagem por citometria de fluxo e a biologia molecular para investigar a expressão de possíveis alvos terapêuticos e prognósticos (KHOURY et al., 2022). Contudo, mesmo após um diagnóstico preciso, o tratamento da LMA representa um desafio. Em parte, isso se dá por conta das elevadas taxas de recidiva e toxicidade inespecífica (THOL; GANSER, 2020). De forma geral, o tratamento das LMAs, proposto pelo *British Committee for Standards in Haematology* há mais de 40 anos, é dividido em duas fases: indução e consolidação (CONITEC, 2014). A indução, primeira fase do tratamento, é realizada logo após o diagnóstico com intuito de minimizar a população neoplásica e prevenir complicações em decorrência da doença. Em seguida, é instaurada a terapia de

consolidação, com objetivo de erradicar as células neoplásicas, inclusive da MO. Somente no caso de Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) é realizado a terapia de manutenção, a qual tem como objetivo a prevenção de uma recidiva durante meses ou mesmo anos após a etapa de consolidação (BOSE; GRANT, 2015; CONITEC, 2014; DE KOUCHKOVSKY; ABDUL-HAY, 2016; MUKHERJEE; SEKERES, 2019).

Nessas etapas, os medicamentos são utilizados de forma simultânea, uma citarabina e uma antraciclina (CONITEC, 2014), cujos efeitos citotóxicos e citostáticos têm como objetivo obter melhores resultados por sinergismo. Com isso, um aumento importante na taxa de sobrevida foi observado (ZEIDAN et al., 2020). Contudo, ainda são comuns casos de recidiva e/ou intolerância ao tratamento (KOSCHADE et al., 2022; LIN; PAGANO, 2021). Dessa forma, continua essencial o estudo de novos compostos com efeitos citotóxicos e/ou citostáticos contra células leucêmicas, e que sejam mais seletivos e que impeçam a seleção de fenótipos de resistência dentro das populações neoplásicas.

### 3.2 NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS

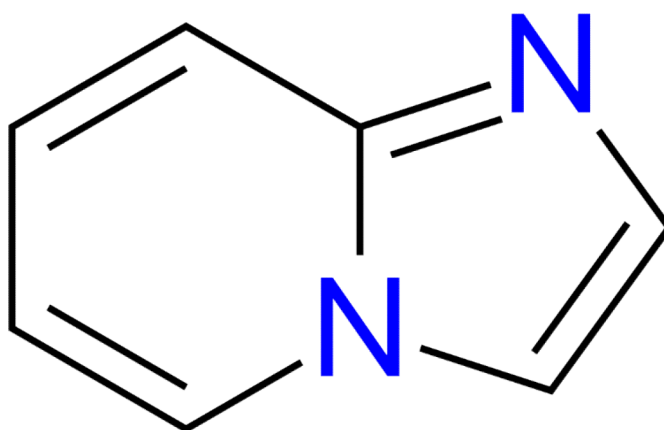
De acordo com o exposto acima, é possível identificar três fatores determinantes para o insucesso das terapias utilizadas atualmente, entre eles: as características farmacocinéticas relacionadas à distribuição aos alvos, a citotoxicidade não seletiva dos quimioterápicos atuais, e o desenvolvimento da resistência aos tratamentos disponíveis. Dessa forma, o presente trabalho busca investigar o efeito de dois compostos sintéticos e inéditos sobre células de LMA, com intuito de avaliar a viabilidade da utilização desses como base para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas.

### 3.3 IMIDAZOPIRIDINAS

As imidazopiridinas são compostos sintéticos, obtidos a partir da fusão dos heterocíclicos imidazol e piridina por diferentes rotas de síntese (DE SALLES et al., 2019). Esses compostos compõem uma classe de fármacos já utilizados na clínica, entre eles o zolpidem, um hipnótico não-benzodiazepínico modulador GABAérgico. Contudo, além dessa, outras atividades foram descritas para a classe. Na literatura, foram avaliados diversos derivados estruturais que demonstraram atividades tais como: antituberculosa (TETALI et al., 2020), antimalárica (PENZO et al., 2019), antidiabética, antiviral, agonista do sistema nervoso central, anti-inflamatória

(KHATUN et al., 2022) e antineoplásica (BACCON-SOLLIER et al., 2020; DAMGHANI et al., 2021; GÜÇLÜ et al., 2018; SHARMA et al., 2021). No entanto, até o momento poucos trabalhos avaliam a atividade citotóxica da classe sobre células de leucemias agudas (BAO et al., 2009; GARNAR-WORTZEL et al., 2021; PATEL et al., 2022), especialmente em células de LMA (MARTÍNEZ-URBINA et al., 2010).

Figura 1 Estrutura química básica de uma imidazopiridina

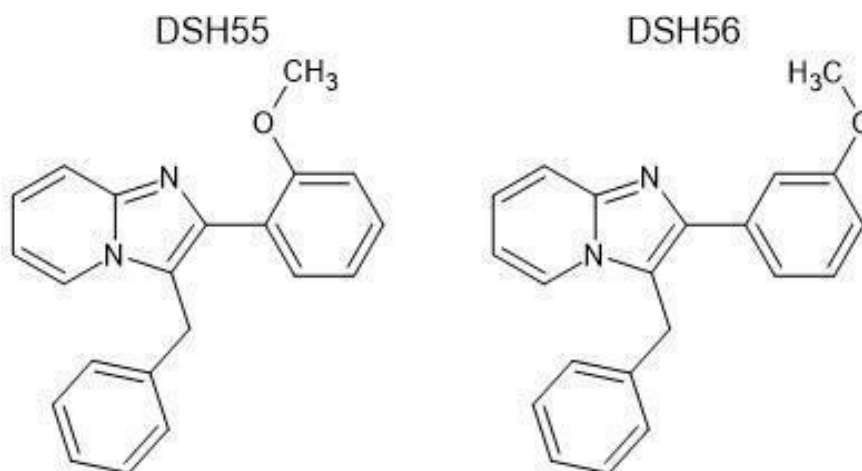


Fonte: O AUTOR.

Os compostos DSH55 e DSH56 são imidazopiridinas sintéticas, produzidas e caracterizadas como parte de uma série de compostos descritos por Salles et al. (2019). Com base em experimentos anteriores que avaliaram a citotoxicidade da série de imidazopiridinas sintetizadas por Salles e colaboradores (2019), os compostos DSH55 e DSH56 foram selecionados devido à sua citotoxicidade satisfatória.

DSH55 e DSH56 são isômeros de posição (BONETTI, 2018), ou seja, apresentam a mesma massa molecular, mesma fórmula molecular e as mesmas funções, variam apenas quanto a posição das metoxilas. Dessa forma, um dos objetivos desse trabalho foi avaliar as diferenças de atividade causadas por cada um dos isômeros em células de LMA.

Figura 2 Estrutura química dos compostos DSH55 e DSH56.



Fonte: O AUTOR.

### 3.4 REGULAÇÃO DA MORTE CELULAR E POSSÍVEIS ALVOS TERAPÊUTICOS

A manutenção da homeostase de um tecido é determinada pelo equilíbrio entre proliferação, diferenciação e morte celular regulada das células que compõem o mesmo (SHARMA; BOISE; SHANMUGAM, 2019). Um desbalanço da proporção entre essas três funções, por falhas nos mecanismos de regulação estabelecidos é o que leva ao desenvolvimento de neoplasias malignas. Dessa forma, o entendimento do equilíbrio entre as três funções é de suma importância, bem como é a identificação de moléculas capazes de modular essas funções. Além disso, uma característica almejada é a indução de tipos de morte celular altamente reguladas e com baixo perfil inflamatório como por exemplo a morte celular por apoptose intrínseca ou apoptose extrínseca (GALLUZZI et al., 2018; VITALE et al., 2023).

### 3.5 MORTE CELULAR

De acordo com o Comitê de Nomenclatura em Morte Celular (CNMC), as vias de morte celular são classificadas pelas características morfológicas, bioquímicas e funcionais. Com base nos conceitos mais atuais do CNMC as vias de morte celular podem ser divididas em mortes reguladas e programadas (VITALE et al., 2023).

Morte celular regulada foi descrita como aquela resultante da modulação de vias de transdução de sinais que levam a morte celular, portanto, podem ser farmacologicamente induzidas. Já a morte celular programada foi definida como uma forma de morte celular regulada que ocorre em decorrência de efeitos fisiológicos,



como a senescência, por exemplo. Além dessas, outros tipos de morte celular programada foram descritos pelo CNMC como a apoptose intrínseca, apoptose extrínseca, ferroptose, piroptose, parthanatos, necroptose, autofagia, morte celular entótica, morte mitótica, morte celular nentótica, morte celular dependente de lisossomos, morte celular imunogênica e necrose induzida por transição de permeabilidade mitocondrial (GALLUZZI et al., 2018; VITALE et al., 2023).

### 3.5.1 Apoptose

Apoptose pode ser descrita como uma via de morte celular altamente regulada induzida por compostos citotóxicos ou por alterações na homeostase que levam a morte de células com mínimos prejuízos ao tecido. No entanto, a partir de 2018, com base nos conceitos instituídos pela CNMC, apoptose induzida por compostos citotóxicos passou a ser denominada como morte celular regulada. A ativação da apoptose se dá por um processo notoriamente complexo, que abrange inúmeras vias de sinalização, que culminam na ativação da cascata das caspases (VAN OPDENBOSCH; LAMKANFI, 2019), responsável pelos efeitos como clivagem do DNA, produção de *blebs* de membrana e outras alterações características da apoptose.

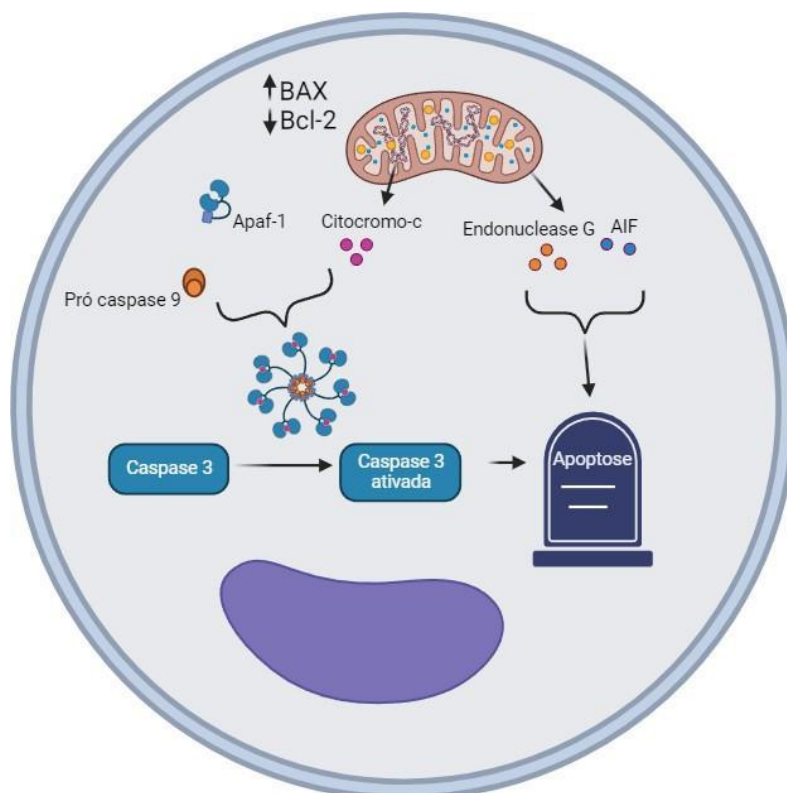
#### 3.5.1.1 APOPTOSE INTRÍNSECA

Apoptose intrínseca, também denominada apoptose mitocondrial, é ativada classicamente por gatilhos intracelulares como danos ao DNA, elevadas concentrações de ERO, aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial entre outros (GALLUZZI et al., 2018). Contudo, também pode ser desencadeada por sinais externos como pela exposição à radiação ultravioleta. Esses estímulos, por sua vez, levam ao aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial pela formação de poros. Proteínas da família Bcl-2 são responsáveis pela regulação da formação de poros e, conseqüentemente, pela ativação ou inativação da apoptose intrínseca (KALE; OSTERLUND; ANDREWS, 2018; WU; MEDEIROS; YOUNG, 2018). Dentre as proteínas da família Bcl-2, algumas proteínas possuem função pró-apoptótica e outras possuem função antiapoptótica, e o equilíbrio entre as concentrações dessas proteínas é responsável pela determinação do estímulo predominante (WU; MEDEIROS; YOUNG, 2018).

De tal maneira, estímulos apoptóticos levam ao desequilíbrio e prevalectimento de proteínas pró-apoptóticas como a proteína X associada a Bcl-2 (Bax). As

proteínas dessa família são normalmente localizadas no espaço intermembranar das mitocôndrias e o desequilíbrio leva a despolarização e à perda do  $\Delta\Psi_m$  (KALE; OSTERLUND; ANDREWS, 2018). Com a perda do  $\Delta\Psi_m$ , ocorre a liberação de outras proteínas para o citosol, proteínas como citocromo c, o fator indutor de apoptose (AIF), a endonuclease G e as proteínas Smac/DIABLO (Figura 3). O citocromo c, quando liberado no citosol forma um complexo conhecido como apoptossoma, através da interação com o fator ativador de protease apoptótica 1 (Apaf1) e com a pró-caspase 9. A formação do apoptossoma leva a ativação da caspase 9 que, por sua vez, cliva a caspase 3 e desencadeia a cascata das caspases. Em paralelo, o AIF e a endonuclease G podem induzir a apoptose por vias independentes de caspase, através da condensação da cromatina e danos ao DNA. Por fim, o complexo Smac/DIABLO ativa a cascata de caspases via antagonismo de proteínas antiapoptóticas como a survivina, o que contribui com o estímulo apoptótico (GALLUZZI et al., 2018; VITALE et al., 2023).

Figura 3 Mecanismo da apoptose intrínseca

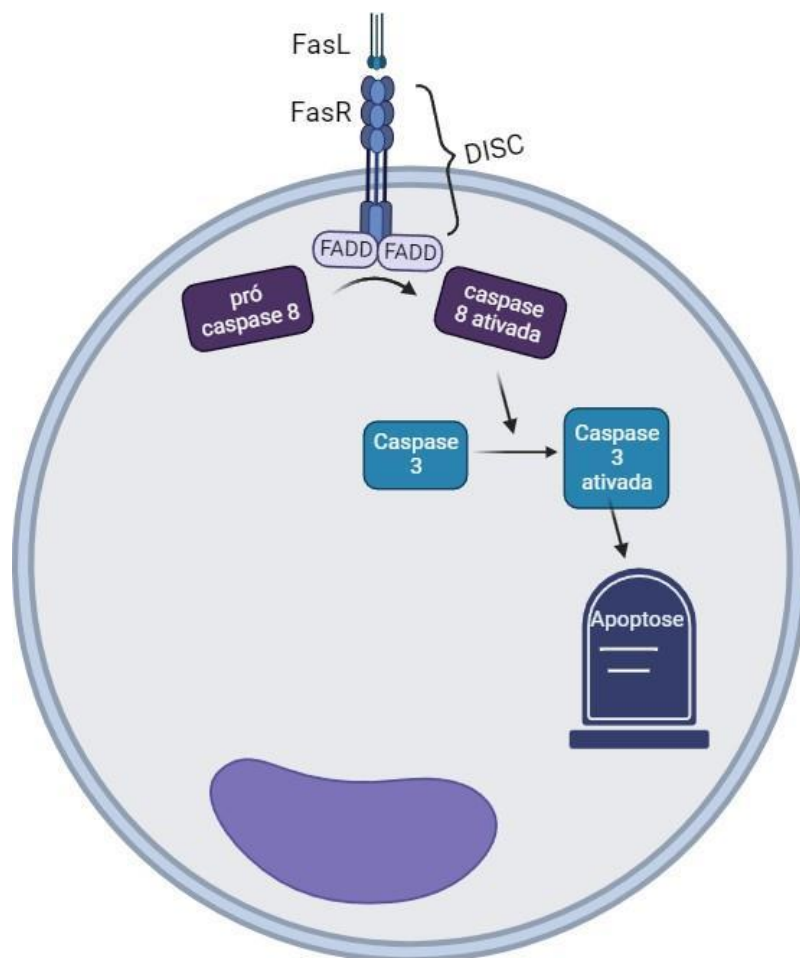


O desbalanço entre as proteínas Bax e Bcl-2 leva a formação de poros nas membranas mitocondriais, com a perda do  $\Delta\Psi_m$  há liberação para o citosol de proteínas que induzem a morte celular de forma dependente ou independente de caspases. Criado com Biorender.com. Fonte: O autor.

### 3.5.1.2 APOPTOSE EXTRÍNSECA

A apoptose extrínseca configura entre as vias de morte celular regulada induzida por ligantes externos (GALLUZZI et al., 2018; VITALE et al., 2023). Esses ligantes são captados por receptores de membrana denominados de receptores de morte celular, que incluem o receptor Fas e os receptores do fator de necrose tumoral (Figura 4) (WONG et al., 2019).

Figura 4 Mecanismo da apoptose intrínseca



Após ativação do FasR, forma-se o complexo DISC, que por sua vez catalisa a ativação da pró caspase 8, que induz a ativação da caspase 3, responsável por alterações como fragmentação do DNA, formação de *blebs* de membrana e clivagem do citoesqueleto. Criado com Biorender.com. Fonte: O autor.

Depois de ativados, os receptores de morte celular sofrem um processo de trimerização, com isso, a porção citoplasmática desses receptores, conhecida como domínio de morte, interage com proteínas adaptadoras FADD ou TRADD que, por sua vez, interagem com a pró-caspase 8 para formar o complexo sinalizador indutor da apoptose (DISC), que leva à ativação da pró-caspase 8. A caspase 8 por sua vez, ativa diretamente as caspases efetoras que induzem a apoptose por via

extramitocondrial. Além disso, a caspase 8 é responsável pela clivagem da proteína Bid, que tem caráter pró-apoptótico e após clivada leva a um aumento da permeabilidade de membrana mitocondrial e, conseqüentemente, à liberação de fatores apoptóticos que ativam a apoptose intrínseca (CAVALCANTE et al., 2019).

### 3.6 CICLO CELULAR

O ciclo celular desempenha um papel essencial na transformação, duplicação e expansão neoplásica, o que o torna um possível alvo para abordagens terapêuticas. A progressão das etapas do ciclo celular é um processo altamente regulado por complexas vias de sinalização bioquímica. Esse controle desempenha um papel crítico na manutenção do ritmo de proliferação celular, o que garante a replicação precisa do DNA e a segregação adequada dos cromossomos homólogos durante a divisão celular. Além disso, coordena processos como diferenciação, senescência e morte celular (BARNUM; O'CONNELL, 2014; SCHAFER, 1998).

O ciclo celular compreende dois eventos principais: a síntese de DNA (fase S) e a divisão da célula-mãe em duas células-filhas durante a mitose (fase M) (Figura 5). As fases que ocorrem entre a divisão celular e a síntese de DNA são conhecidas como fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, enquanto as fases entre a síntese de DNA e a mitose são denominadas fase G<sub>2</sub>/M. Células metabolicamente ativas, mas que não estão atualmente envolvidas no ciclo de replicação celular, são chamadas de células quiescentes e permanecem na fase G<sub>0</sub> até que recebam um estímulo mitótico externo que as induza a sair da fase G<sub>0</sub> (BARNUM; O'CONNELL, 2014; SCHAFER, 1998; MALUF et al., 2011).

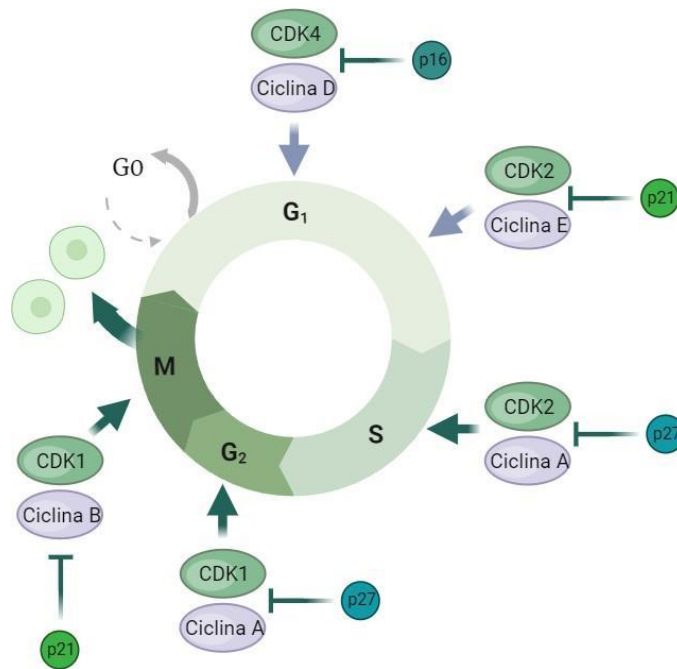
Durante a fase G1 é realizada a descondensação da cromatina e a célula produz proteínas necessárias para fase S, onde será duplicado o genoma celular. A partir do primeiro ponto de checagem, localizado ao final da fase G1, a progressão do ciclo celular é regulada por proteínas intracelulares específicas, como por exemplo as proteínas p53 e p21 (ENGELAND, 2022). Ao serem identificadas falhas na duplicação ou erros no material genético, proteínas como a p53 ativam genes inibidores do crescimento, os quais induzem a parada do ciclo celular para que seja realizado o reparo do dano. Caso não haja danos reconhecidos após a fase G1, ou após esses serem devidamente reparados, a célula progride para fase S, onde é duplicado o material genético. Após a duplicação do DNA se dá a fase G2 do ciclo celular, na qual ocorre a diferenciação celular e a síntese de proteínas necessárias para mitose (fase M), próxima fase do ciclo celular. No entanto, entre as fases G2 e M se encontra o segundo ponto de checagem. No segundo ponto de checagem, diante de danos irreparáveis ao DNA, a proteína p53 inibe o complexo responsável pela regulação da mitose, o que impede o início da prófase, e, conseqüentemente, da mitose. Por outro lado, caso o dano ao material genético seja passível de reparos o ciclo celular progride para fase M. Esta é a fase de divisão celular, onde ocorre a separação da célula e a origem de uma célula filha, idêntica à célula mãe. Esse processo é dividido em quatro etapas chamadas de prófase, metáfase, anáfase e telófase (SCHAFER, 1998).

A manutenção de uma sinalização proliferativa, bem como a evasão de vias que inibem o crescimento tumoral são conhecidos como “*hallmarks*” do câncer (HANAHAN, 2022; HANAHAN; WEINBERG, 2000). Uma das proteínas responsáveis pela proliferação sustentada das células tumorais é a proteína KI-67 (MENON et al., 2019), um conhecido marcador de proliferação celular superexpresso em todas as fases do ciclo celular de células tumorais e ausente em células não malignas. Por isso, sua expressão tem valor prognóstico para várias neoplasias (MENON et al., 2019).

Devido a notabilidade do ciclo celular no contexto das neoplasias, o papel dos pontos de checagem na manutenção da homeostasia genética, que impedem a proliferação de células com danos ao DNA é considerado de suma importância. Esses pontos de checagem são controlados por diversas proteínas, denominadas de cinases dependentes de ciclinas (CDKs) (ZHANG et al., 2021). As CDKs por sua vez interagem com as ciclinas, para formar o complexo catalítico-CDK ativo. Durante o ciclo celular, as concentrações de CDKs permanecem constantes (AROOZ et al.,

2000), enquanto a disponibilidade de ciclinas é variável ao longo do ciclo. Dessa forma, a expressão de ciclinas regula a atividade das CDKs em cada fase do ciclo celular. Quando erros no material genético são identificados há a formação de um complexo estável entre as CDKs e proteínas inibidoras de CDKs (CKIs). Assim, as CKIs impedem a formação do complexo CDK-ciclinas (AMANI et al., 2021). Quando o dano ao DNA não pode ser reparado, são ativadas as vias de morte celular programada por meio da proteína p53, entre outras, que induzem a expressão de genes pró-apoptóticos com o objetivo de eliminar as células que apresentam danos potencialmente oncogênicos (PIETSCH et al., 2008).

Figura 5 O ciclo celular e seus mecanismos regulatórios



O ciclo celular compreende a interfase, composta pelas etapas G1, S e G2, seguida pela mitose (fase M). A progressão em cada fase do ciclo celular é regulada por ciclinas e CDKs, cujas atividades podem ser inibidas por diversas proteínas, inclusive p16, p21 e p27, desempenhando papéis cruciais em vários processos regulatórios. Criado com Biorender.com. Fonte: O autor.

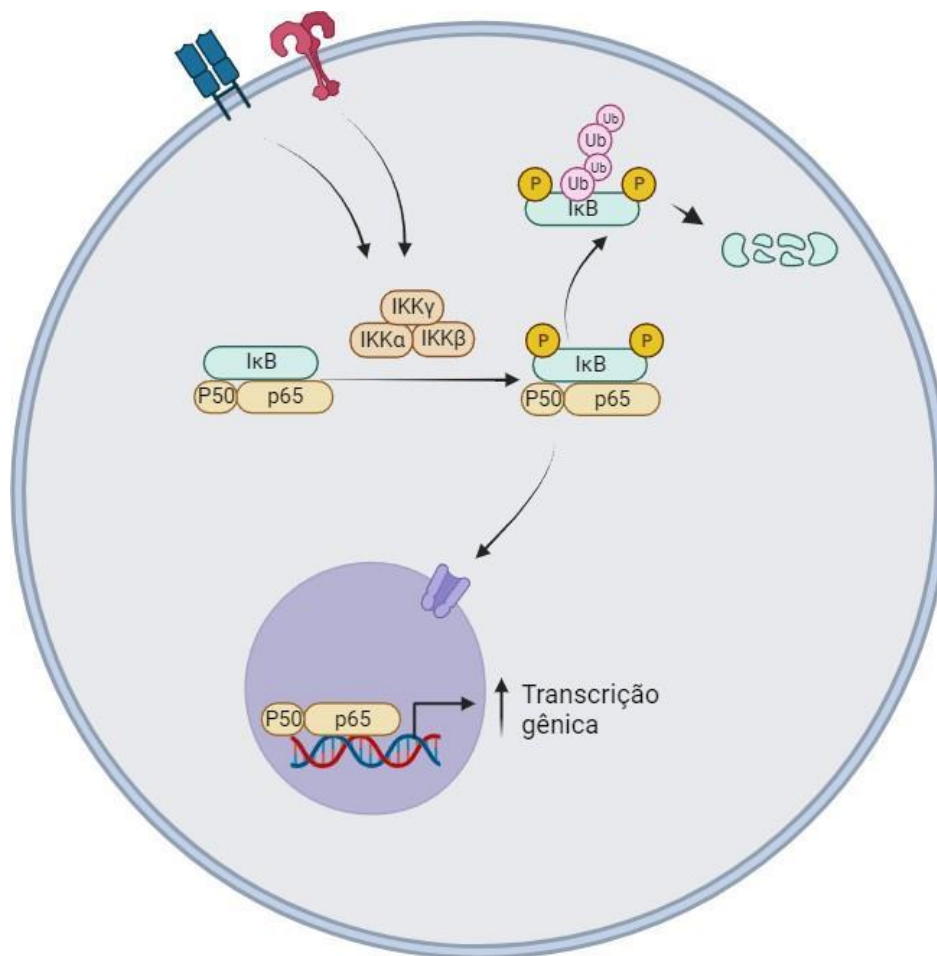
### 3.7 A VIA DO NF- $\kappa$ B

Dentre as várias vias de sinalização envolvidas na promoção e manutenção de um estímulo oncogênico destaca-se a via do NF- $\kappa$ B. Envolvido na modulação da expressão de diversos fatores pró e antitumorais, o NF- $\kappa$ B é considerado como um dos principais fatores de transcrição no desenvolvimento de neoplasias (HOESEL; SCHMID, 2013), inclusive na LMA. Na ausência de neoplasias, o NF- $\kappa$ B atua em resposta à estímulos inflamatórios, como infecções, na imunidade inata e adaptativa, ou na linfopoiese, fundamental na maturação de linfócitos B (BALDWIN, 1996; HOESEL; SCHMID, 2013).

O NF- $\kappa$ B, na ausência de estímulo, está situado no citoplasma, associado a uma proteína inibitória, a I $\kappa$ -B, e dessa forma, permanece inativo. A ativação do NF- $\kappa$ B está associada, normalmente, com a fosforilação do I $\kappa$ -B, o que diminui sua afinidade pelo NF- $\kappa$ B. Depois de dissociado do seu inibidor, o NF- $\kappa$ B transloca-se para o núcleo, onde se liga às sequências de DNA presentes nas regiões regulatórias de genes envolvidos nas respostas imunes, inflamatórias, no controle do crescimento celular e apoptose, a fim de modular a transcrição desses genes. Por isso, o NF- $\kappa$ B é reconhecido na literatura como importante mediador oncogênico e já foi investigado em diversas neoplasias (TANIGUCHI; KARIN, 2018; XIA et al., 2018). Enquanto isso, o I $\kappa$ -B dissociado do NF- $\kappa$ B sofre ubiquitinação, que o marca para ser degradado por um complexo multienzimático proteolítico, o proteasoma (GHOSH; MAY; KOPP, 1998). Para isso, o NF- $\kappa$ B pode ser ativado por duas vias, conhecidas como canônica e não-canônica, que diferem na forma de ativação e nas subunidades envolvidas (ZINATIZADEH et al., 2021).

A via canônica de ativação do NF- $\kappa$ B ocorre em resposta a estímulos por meio de citocinas, antígenos não-próprios, fatores de crescimento, radiação, ERO, danos ao DNA, entre outros. Esses estímulos levam à ativação do complexo IKK (I $\kappa$ -B quinase), que fosforila a proteína I $\kappa$ -B, o que permite que o NF- $\kappa$ B atravesse a membrana nuclear e module a expressão gênica (Figura 6) (BALDWIN, 1996; HOESEL; SCHMID, 2013; ZINATIZADEH et al., 2021).

Figura 6 Via canônica do NF-κB



O fator de transcrição κB está inativado no citoplasma das células pela ligação com subunidade Iκ-B. Estímulos extra ou intracelulares podem quebrar essa ligação e permitir que o fator de transcrição κB promova a transcrição gênica. Criado com Biorender.com. Fonte: O autor

Na LMA, a via de sinalização do NF-κB encontra-se constitutivamente ativada em aproximadamente 40% dos casos (ZHOU; CHING; CHNG, 2015), o que leva as células neoplásicas a manterem um estímulo proliferativo e evadirem a apoptose. Assim, diversos estudos *in vitro* e *ex vivo* mostram o potencial da inibição da via do NF-κB como mecanismo proposto para o tratamento da LMA (ESTROV et al., 2003; HARIKUMAR et al., 2009; JORDHEIM et al., 2011; OMSLAND et al., 2017; PAZHANG et al., 2016; REIKVAM, 2020; ZHU et al., 2015).



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ORIGEM DOS COMPOSTOS

As imidazopiridinas DSH55 e DSH56 (Figura 2), utilizadas neste trabalho, foram sintetizadas no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais da (LACFI) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), conforme descrito por Salles et al. (2019), sob a orientação do professor Dr. Ricardo Ferreira Affeldt. Para a caracterização dos compostos, foram utilizadas as técnicas de ressonância magnética nuclear, cromatografia de camada fina e espectrometria de massas de alta resolução.

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

Para predição *in silico* das características físico-químicas e farmacológicas dos compostos, foi utilizada a ferramenta *online* e gratuita *SwissADME*, desenvolvida pelo Grupo de modelagem Molecular do Instituto Suíço de Bioinformática. A partir dos dados gerados pela plataforma, com base em ambas as moléculas, foi possível avaliar as características físico-químicas como, peso molecular, número de átomos pesados, LogP entre outros. Além disso, na mesma plataforma, foi possível prever os parâmetros de farmacocinética ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Ainda, foram avaliadas as características de *druglikeness* através dos parâmetros de Lipinski, Ghose, Verber, Egan e Muegge (EGAN; MERZ; BALDWIN, 2000; GHOSE; VISWANADHAN; WENDOLOSKI, 1999; LIPINSKI et al., 2001; MUEGGE; HEALD; BRITTELLI, 2001; VEBER et al., 2002) e de química medicinal com os ensaios *in silico* de PAINS (*Pan Assay Interference Structures*) e Brenk (BAELL; HOLLOWAY, 2010; BRENK et al., 2008). E por fim, a plataforma atribui aos compostos uma nota quanto a acessibilidade sintética, de 0 a 10, onde 10 representa um composto de muito difícil síntese.

### 4.3 CULTIVO CELULAR

Neste trabalho, foram utilizadas células K562, originalmente adquiridas do *American Type Cell Culture* (ATCC). Essas foram cultivadas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*, Gibco®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 10.000 U/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina e 10 mM de

tampão Hepes (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'[2-etanosulfônico], Gibco®) em pH 7,4. As células foram mantidas em frascos estéreis próprios para cultivo celular em estufa úmida, numa temperatura de 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>.

A princípio, as células foram semeadas em frascos estéreis na densidade de  $2,0 \times 10^6$  por frasco, e tiveram o meio substituído a cada 48 horas ou conforme necessário. Para realização dos experimentos, as células foram removidas dos frascos e centrifugadas à 264 g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em uma quantidade conhecida de meio para determinação da densidade e viabilidade celular. Para isso, as células foram coradas e avaliadas pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan 0,4% (Sigma-Aldrich®) (TENNANT, 1964) e foram utilizadas para os experimentos apenas as suspensões celulares que continham viabilidade celular superior a 95%. O período de incubação, concentrações dos compostos e densidade celular foram definidas de acordo com o protocolo experimental de cada procedimento.

#### 4.4 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio). Que se baseia na redução do MTT, um sal de coloração amarela, a formazan, um sal roxo. Essa reação se dá pela redução do MTT através das desidrogenases mitocondriais e é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e, conseqüentemente, à viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

A fim de construir as curvas de concentração e tempo resposta, as células de LMA foram semeadas em densidades de  $5 \times 10^4$  células/poço para 24 horas de incubação,  $2,5 \times 10^4$  células/poço para 48 horas e  $1,25 \times 10^4$  células/poço para o período de 72 horas, em 200 µL de meio de cultura. Imediatamente após, foram tratadas com concentrações de 1 a 100 µM dos compostos DSH55 e DSH56 diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e então incubadas pelos tempos determinados a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após a incubação, o meio foi parcialmente removido e foi adicionada uma solução de MTT (5 mg/mL em PBS, Sigma-Aldrich®) diluído em meio de cultura celular em uma proporção de 1:5. Então, as células foram incubadas por 3 horas e o sobrenadante removido. Os precipitados de formazan foram dissolvidos com 100 µL

de solução de álcool isopropílico/HCL 0,04 N e as placas centrifugadas a 264 g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para uma nova placa, onde foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro (Microwell Systems, Organon Teknika®) no comprimento de onda de 540 nm.

A absorbância do grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como 100 % de viabilidade celular e a concentração inibitória 50 % (CI<sub>50</sub>) foi obtida a partir da regressão linear das curvas concentração e tempo-resposta no *software* GraphPad Prism 9. Um segundo grupo controle foi realizado com a concentração máxima de DMSO utilizada para diluir os compostos e os experimentos foram validados apenas quando não houve diferença significativa entre os controles.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA COM BROMETO DE ETÍDIO (BE) E LARANJA DE ACRIDINA (LA)

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

Para a realização do ensaio, as células K562 ( $1,0 \times 10^6$  células/ 4 mL) foram tratadas com as imidazopiridinas na CI<sub>50</sub> de 24 horas. Após 18 horas de incubação, as células foram lavadas com PBS (Laborclin®) e o sedimento celular foi ressuspenso em uma solução constituída de BE (5 µg/mL) (Sigma-Aldrich®) e LA (10 µg/mL) (Sigma-Aldrich®) na proporção 1:1. Depois uma alíquota de 25 µL da suspensão celular foi transferida para uma lâmina de vidro e recoberta com uma lamínula. Posteriormente, a morfologia das células foi observada em um microscópio de fluorescência (Olympus BX41®) e, pelo menos, dez campos representativos foram fotografados. Um grupo de células sem tratamento foram consideradas como controle negativo e comparadas com aquelas tratadas com os compostos.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DOS RESÍDUOS DE FOSFATIDILSERINA POR CITOMETRIA DE FLUXO

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

Para a realização do protocolo experimental, as células K562 ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com ambos os compostos em suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas por 18 horas, a  $37^\circ\text{C}$ , em atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$ . Após o tratamento, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 264 g, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuscitado com 500  $\mu\text{L}$  de tampão rico em cálcio. Uma alíquota dessa suspensão foi utilizada e as células marcadas com anexina-V-FITC (BD Biosciences®). Após a marcação, realizada no curso de 30 minutos ao abrigo da luz, foi adicionado PBS e foram adquiridos 50.000 eventos, para cada amostra, em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences®), o qual dispõe do software BD FACSDiva versão 8.0.1. Em seguida, a análise da intensidade de fluorescência média das células K562 tratadas foi realizada por meio do software Infinicyt 2.0 (Cytognos®) e comparadas ao grupo controle (células sem tratamento).

#### 4.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS IMIDAZOPIRIDINAS SOBRE CÉLULAS DE SP

Para a avaliação do efeito citotóxico e do potencial hemolítico dos compostos sobre células não neoplásicas, foram coletadas amostras de SP de indivíduos considerados clinicamente saudáveis, conforme aprovação do Comitê de Ética de Pesquisa em Seres humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CAAE: 80430317.0.0000.0121; ANEXO A) e que concordaram assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. Foram considerados clinicamente saudáveis os indivíduos não fumantes, que não se encontravam com processo infeccioso, alérgico, inflamatório, sem histórico de doenças crônicas e ou uso de medicações nos últimos dois dias.

##### 4.7.1 Avaliação do potencial hemolítico

Para a realização do ensaio de hemólise, as amostras de SP foram coletadas em tubos com o anticoagulante EDTA (Greiner Bio-One®). Os eritrócitos foram

separados dos demais constituintes sanguíneos por centrifugação, transferidos para um tubo de fundo cônico, lavadas com uma solução estéril NaCl 0,9% (Lifar®), e suspensas em NaCl 0,9% a fim de obter uma dispersão estoque concentrada de eritrócitos de densidade óptica entre 1,8 e 2,2 em leitura realizada por espectrofotômetro a 540 nm. Em seguida, os eritrócitos foram divididos em três grupos (teste; controle negativo e controle positivo) e incubados em termobloco (Eppendorf®) por uma hora a 37° C sob leve agitação.

O grupo teste foi constituído de eritrócitos ressuspensos em NaCl 0,9% com concentrações crescentes das imidazopiridinas (uma a cinco vezes a  $CI_{50}$  de 24 horas em células K562), Como controle positivo, a suspensão de eritrócitos foi diluída com água destilada. Já para o controle negativo foi utilizado NaCl 0,9% no preparo da suspensão. Os controles não foram incubados com os compostos investigados. Após a incubação as suspensões foram centrifugadas a 500 g por cinco minutos e os sobrenadantes foram transferidos para uma placa de 96 poços a fim de realizar a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 nm.

#### **4.7.2 Citotoxicidade sobre células não neoplásicas**

Para avaliar a atividade dos compostos sobre PBMC, inicialmente o sangue dos doadores foi diluído 1:1 com salina e transferido para um tubo com Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich®, densidade 1.077 g/m<sup>3</sup>), também na proporção 1:1. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 300 g por 30 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi removido e a interfase que continha os PBMC foi transferida para um novo tubo, onde foi adicionado PBS e centrifugadas novamente a 200 g por 10 minutos. Depois o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL de RPMI, uma alíquota dessa suspensão de células foi corada com azul de Trypan 0,4% e contada em câmara de Neubauer. Para realização de experimentos, foram utilizadas apenas amostras com viabilidade superior a 95%.

A células foram semeadas em uma densidade de  $7,5 \times 10^5$  células/poço em uma placa de 96 poços com 200  $\mu$ L de RPMI e incubadas com os compostos em concentrações crescentes (5 - 200  $\mu$ M) e com o solvente DMSO na maior concentração utilizada nos experimentos a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT e os resultados obtidos com os compostos foram comparados com o grupo controle sem tratamento.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DO EFEITOS DAS IMIDAZOPIRIDINAS SOBRE O CICLO CELULAR

Para avaliação do efeito sobre a proliferação celular dos compostos DSH55 e DSH56, foi utilizado o kit comercial PI/RNase Solution (Immunostep®). Esse se baseia na quantidade de iodeto de propídio capaz de ligar-se ao material genético presente nas células daquela amostra. Dada a diferença em quantidade de DNA presente nas células em diferentes etapas do ciclo celular, a intensidade de fluorescência, proporcional à quantidade de iodeto de propídio ligado ao DNA, é capaz de separar as células em três populações, G0/G1; S e G2/M de acordo com a quantidade de DNA presente.

Para isso,  $1,0 \times 10^6$  células foram incubadas com cada uma das imidazopiridinas na sua  $CI_{50}$  de 24 horas por 18 horas. Então, foram lavadas com PBS e fixadas/permeabilizadas com a adição de álcool etílico 70% sob vigorosa agitação. Em seguida, as células foram lavadas com PBS acrescido de 2% de albumina bovina sérica (BSA), a fim de evitar ligações inespecíficas. Por fim, o sobrenadante foi descartado e as células incubadas com a solução de PI/RNase por 15 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Os *doublets* foram excluídos durante a aquisição com o advento de *storage gates*, nos quais foram adquiridos 10.000 eventos em um citômetro de fluxo BD FACSCanto II equipado com o *software* FACSDiva versão 6.1.2. Os dados foram analisados por meio do *software* Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®).

#### 4.9 AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR (BCL-2, BAX, AIF, FASR, CASPASE 3 ATIVADA E SURVIVINA)

A avaliação do efeito dos compostos sobre diversas proteínas relacionadas à apoptose e proliferação celular foi realizada por meio da citometria de fluxo. Para todos os experimentos, as células foram incubadas ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) com as respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas por 18 horas a 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. O controle negativo foi constituído das células submetidas a todos os procedimentos, com exceção do tratamento. Para proteínas intracelulares (Bcl-2, Bax, AIF, caspase 3 ativada e survivina) utilizou-se o kit de fixação e permeabilização *FIX&PERM*® (Nordic-MUbio®) e para o FasR, um receptor de membrana, utilizou-se a técnica de

marcação direta. As características, bem como volume de utilizado para marcação podem ser observadas no Quadro 1.

Quadro 1 Anticorpos utilizados na avaliação por citometria de fluxo.

<b>Alvo</b>	<b>Clone</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Volume utilizado</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Código de catálogo</b>
FasR	B-10	Santa Cruz Biotechnology	5 µL	PE	SC-8009 PE
Bax	B-9	Santa Cruz Biotechnology	5 µL	PercP	SC-7480 PercP
Bcl-2	Bcl-2/100	Exbio	5 µL	FITC	IF-668-T100
AIF	E-1	Santa Cruz Biotechnology	5 µL	FITC	SC-13116 FITC
Survivina	D-8	Santa Cruz Biotechnology	5 µL	PE	SC-17779 PE
Caspase 3 ativada	C92-605	BD Biosciences	5 µL	V450	560627

Portanto, para marcação das proteínas intracelulares, após o período de incubação as células foram lavadas com PBS e ressuspensas com 100 µL de reagente A (fixador). Após incubação por 15 minutos na ausência de luz em temperatura ambiente, foi adicionado PBS novamente às células, que foram centrifugadas por 5 min a 300 x g. O sobrenadante foi descartado, foi adicionado 100 µL de reagente B (permeabilizante) e o volume adequado do anticorpo monoclonal a ser analisado (Quadro 1). As células foram novamente incubadas por 15 minutos, nas mesmas condições citadas anteriormente e lavadas com PBS. Ao sedimento celular foi acrescentado 500 µL de PBS para aquisição.

Para a marcação direta, após o período de incubação com os compostos as células foram centrifugadas a 264 g, ressuspensas uma vez com 1 mL de PBS, centrifugadas novamente e ressuspensas em PBS uma última vez. À essa suspensão foi acrescentado o volume adequado de anticorpo anti-FasR (Quadro 1). Após essa etapa a suspensão celular foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e na ausência de luz. Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspensas com PBS, o sobrenadante foi removido e centrifugadas e ressuspensas no mesmo para análise no citômetro de fluxo. Para todas as proteínas (intracelulares e de superfície) foram adquiridos 10.000 eventos no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) com o *software* BD FACSDiva versão 6.1.2. Os resultados foram analisados no

*software* Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®) e os *doublets* foram retirados a partir das características de *forward scatter* (FSC) (altura x área).

#### 4.10 AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE NF-Kb (p65) E P-NF-κB POR WESTERN BLOTTING

A fim de avaliar a ativação do mediador inflamatório NF-κB foi utilizada a técnica de western blotting, baseada na eletroforese de um lisado proteico seguida da detecção de proteínas específicas com anticorpos monoclonais conjugados à peroxidase e de uma revelação por meio de quimioluminescência (SANTOS-PIRATH et al., 2021).

Para isso, as células foram incubadas ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) com cada uma das imidazopiridinas em sua  $CI_{50}$  de 24 horas por 24 horas, lavadas com PBS, ressuspensas em 1 mL de PBS e transferidas para um tubo cônico de 1,5 mL. No tubo de fundo cônico, as células foram novamente centrifugadas e dessa vez, ressuspensas em 100 µL de tampão RIPA acrescido de inibidor de proteases. Em seguida, as suspensões foram mantidas em banho de gelo por 15 minutos e centrifugadas novamente. Por fim, o sobrenadante que continha as proteínas extraídas foi transferido para um novo tubo de fundo cônico a fim de determinar a concentração proteica.

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método do ácido bicinonínico (BCA) (WALKER, 1994) com o kit comercial *Micro BCA Protein Assay* (Pierce®). A concentração das amostras, em triplicata, foi avaliada após a adição de 10 µL de cada amostra em placas de 96 poços seguida da adição de 200 µL do reagente de trabalho e 30 minutos de incubação a 37°C na ausência de luz. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (Heales, MB-580®) no comprimento de onda de 540 nm. Uma curva com concentrações conhecidas de BSA foi preparada paralelamente a fim de servir como padrão para determinação da concentração proteica.

Para a técnica de western blotting, volumes de lisados proteicos correspondentes à 25 µg de proteínas foram submetidos à separação eletroforética em gel SDS-PAGE 10% com uma tensão elétrica de aproximadamente 100 V. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond™-C Extra; Amersham Biosciences®) embebidas em tampão de transferência a uma voltagem de 20 V por 60 minutos com o auxílio de aparato de



*semi-dry transfer* (GE Healthcare Life Sciences®). A fim de validar a eficácia do processo de transferência a membrana foi corada em solução de corante *Ponceau S* 0,1% em ácido acético 3% por três minutos para visualização das bandas proteicas à olho nu. Depois, a membrana foi descorada com banhos de água destilada e bloqueada com solução de bloqueio (leite desnatado 5% em TBS-T) em temperatura ambiente por uma hora, sob constante agitação. Após o bloqueio, a membrana de nitrocelulose foi incubada *overnight* com os anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio de acordo com o Quadro 2.

Quadro 2 Anticorpos utilizados na avaliação por WB

Alvo	Diluição	Origem	Fabricante	Nº catálogo
p65	1:1000	Coelho	Santa Cruz Biotechnology	sc-372
p-NF-κB (pS536)	1:1000	Coelho	Abcam	500-11924
β-tubulina	1:1000	Camundongo	BD Biosciences	556321
IgG coelho	1:5000	Camundongo	Santa Cruz Biotechnology	sc-2357
IgG camundongo	1:5000	Cabra	Invitrogen	62-6520

A expressão de NF-κB, p-NF-κB e β-tubulina (proteína âncora) foi avaliada com os anticorpos primários e secundários descritos no Quadro 2. Após três incubações com TBS-T por dez minutos sob agitação constante, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase diluído em solução de bloqueio por 1 hora a temperatura ambiente. A membrana foi novamente incubada três vezes com TBS-T sob agitação constante, e, então incubada com 1 mL do reagente ECL (GE Healthcare®) por 1 minuto, lida por quimioluminescência e fotografada no transiluminador ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare®). Os resultados obtidos foram normalizados com a utilização da proteína âncora β-tubulina e a avaliação quantitativa da expressão das proteínas de interesse foi realizada pela densidade óptica das bandas analisadas no *software* Image Lab (Bio-Rad®).

#### 4.11 AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO DO $\Delta\Psi_m$

Com intuito de avaliar o efeito dos compostos DSH55 e DSH56 sobre a integridade mitocondrial, foi utilizado o kit comercial *MitoView* (Biotium®), que contém um corante fluorescente capaz de permear as membranas citoplasmáticas e mitocondriais e se acumula naquelas mitocôndrias cujas membranas mantêm seu potencial intacto.

Para isso,  $1,0 \times 10^6$  células foram incubadas com a  $CI_{50}$  de 24 horas por 18 horas de cada uma das imidazopiridinas a  $37^\circ\text{C}$ , em atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$ . Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 264 g por 5 minutos para formação do *pellet* celular. Em seguida, foram ressuspensas em 200  $\mu\text{L}$  da solução de MitoView diluída de acordo com as instruções do fabricante. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente e longe da luz, as células foram novamente lavadas com PBS e foram adquiridos 20.000 eventos em um citômetro BD FACSCanto II equipado com o *software* FACSDiva versão 6.1.2. Após, os dados foram analisados por meio do *software* Infinicyt versão 2.0.

#### 4.12 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ERO

A avaliação da produção de ERO foi realizada utilizando-se um kit comercial *MitoSOX Red Molecular Probes* (ThermoFischer®). O kit é constituído por um corante fluorogênico que permeia membranas biológicas, como as membranas citoplasmática e mitocondriais. Uma vez internalizado pelas mitocôndrias, o corante é oxidado pelo ânion superóxido e emite fluorescência vermelha. Com esse objetivo, as células K562 foram incubadas ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) com as imidazopiridinas DSH55 e DSH56 nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas por 18 horas em estufa úmida a  $37^\circ\text{C}$ , em atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$ . O controle negativo foi preparado nas mesmas condições, mas sem tratamento, para caracterização dos parâmetros a serem analisados por citometria de fluxo.

Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas a 264 g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados sobre o sedimento celular 300  $\mu\text{L}$  da solução de *MitoSOX* diluído em 1:10.000 de acordo com a instrução do fabricante. As células foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente na ausência de luz. Após a incubação, as células foram novamente lavadas, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensado em PBS. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences®), onde foram adquiridos 20.000 eventos com o *software* BD FACSDiva versão 6.1.2. Os resultados foram analisados no *software* e Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®) e os *doublets* foram retirados através das características de *forward scatter* (FSC) (altura x área).

#### 4.13 EXPRESSÃO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes à avaliação da citotoxicidade e a taxa de hemólise foram obtidos pela média de três experimentos independentes e expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Já os dados resultantes de experimentos realizados por citometria de fluxo foram expressos com unidades arbitrárias, calculadas a partir da média  $\pm$  EPM da intensidade de fluorescência relativa ao controle negativo de dois experimentos independentes. Por fim, os resultados de western blotting foram expressos por meio da média  $\pm$  EPM de densidade óptica relativa à proteína âncora ( $\beta$ -tubulina) de dois experimentos independentes.

Para realizar a análise estatística dos dados, foi utilizado o programa GraphPad Prism 9.0, em que os resultados dos experimentos, realizados em triplicata ou duplicata, foram expressos como média  $\pm$  EPM.

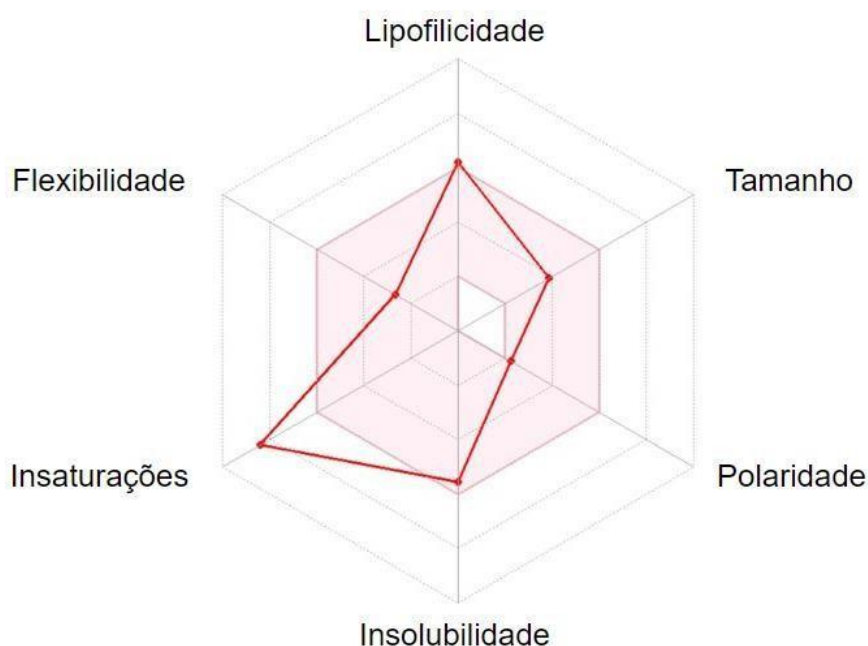
Para a avaliação da citotoxicidade, bem como para hemólise, o método estatístico de escolha foi a análise de variância em uma via (ANOVA *one way*) seguida do *post-hoc* de Bonferroni para citotoxicidade e pelo Tukey para hemólise. Já a análise estatística dos demais experimentos foi realizada por teste *t* não pareado. Para ambos o limite de confiança adotado foi de 95% ( $P < 0,05$ ). \* indica um valor de  $P \leq 0,05$ , enquanto \*\* indicam  $P \leq 0,001$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PREDIÇÃO IN SILICO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS E BIOLÓGICAS

Os resultados obtidos a partir da ferramenta de predição *in silico* *SwissADME* estão apresentados no Quadro 3, e as características determinantes para biodisponibilidade oral podem ser observadas na Figura 7. De maneira geral, ambos os compostos apresentam características desejáveis no desenvolvimento de novos fármacos, como a total obediência às regras de Lipinski, Veber, Ghose e Egan ou um baixo escore de dificuldade sintética. Nos parâmetros de PAINS ou de Brenk também não foram encontrados alertas.

Figura 7 Representação das características de biodisponibilidade oral dos compostos DSH55 e DSH56.



A zona colorida é o espaço físico-químico adequado para uma boa biodisponibilidade oral. Fonte: Adaptado de SwissADME.ch.

Quadro 3 Resultados obtidos por predição *in silico*.

<b>Propriedades físico-químicas</b>		
Composto	<b>DSH55</b>	<b>DSH56</b>
Fórmula	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O
Peso Molecular	314,38 g/mol	314,38 g/mol
Número de átomos pesados	24	24
Fração Csp <sup>3</sup>	0,10	0,10
Número de ligações rotacionáveis	4	4
Aceptores de ligações de hidrogênio	2	2
Doadores de ligações de hidrogênio	0	0
Refratividade Molar	96,57	96,57
Área de superfície polar topológica (TPSA)	26,53 Å <sup>2</sup>	26,53 Å <sup>2</sup>
Log P o/w	4,13	4,22
Solubilidade em água	Pouco solúvel	Pouco solúvel
<b>Características farmacocinéticas</b>		
Absorção gastrointestinal	Alta	Alta
Permeação da barreira hematoencefálica	Sim	Sim
Substrato da glicoproteína-P (P-gp)	Sim	Não
Inibidor da CYP1A2	Sim	Sim
Inibidor da CYP2C19	Sim	Sim
Inibidor da CYP2C9	Não	Sim
Inibidor da CYP2D6	Sim	Sim
Inibidor da CYP3A4	Sim	Sim
<b>Características farmacológicas</b>		
Lipinski	Sem violações	Sem violações
Ghose	Sem violações	Sem violações
Veber	Sem violações	Sem violações
Egan	Sem violações	Sem violações
Muegge	Uma violação	Uma violação
Escore de biodisponibilidade	0,55	0,55
<b>Química medicinal</b>		
PAINS	Sem alertas	Sem alertas
Brenk	Sem alertas	Sem alertas
Acessibilidade sintética	3,04	2,99

Fonte: Adaptado de SwissADME.ch.

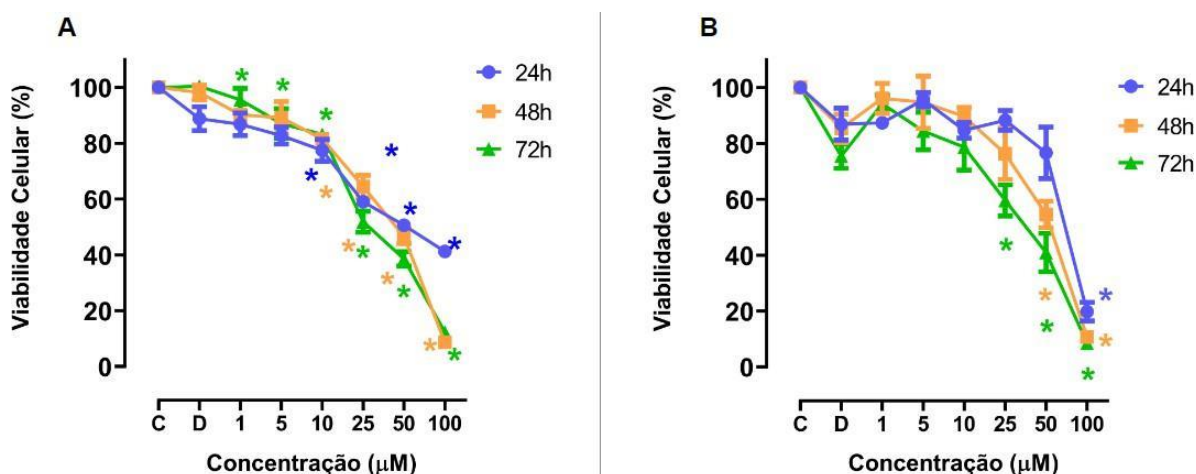
Em relação predição *in silico*, foram encontradas apenas duas divergências para os compostos, e essas foram quanto à possibilidade de o DSH55 ser substrato da glicoproteína P, e quanto a incapacidade de inibir a CYP2C9.

## 5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SINTÉTICOS SOBRE CÉLULAS NEOPLÁSICAS

Como pode ser observado na Figura 8, os compostos DSH55 e DSH56 diminuíram a viabilidade das células K562 de forma concentração e tempo dependente (24, 48 e 72 horas). No período de 72 horas, a redução da viabilidade celular pelos compostos DSH55 e DSH56 já se demonstrou significativa na concentração de 1  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Com base nas curvas de concentração e tempo resposta, foi possível determinar os valores de  $\text{CI}_{50}$  para cada um dos compostos, em cada um dos tempos. Esses valores podem ser observados na Tabela 1.

Figura 8 Efeito citotóxico do DSH55 e DSH56 em células K562.



Citotoxicidade dos compostos DSH55 (A) e DSH56 (B) em concentrações crescentes, sobre células K562 após 24, 48 e 72 horas de incubação. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT. Cada ponto da curva representa a média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos independentes. C: células sem tratamento. D: células expostas à maior concentração de DMSO utilizada. Diferença significativa: \*  $P \leq 0,05$ , quando comparado ao grupo controle, ANOVA *one-way*, seguido *post-hoc* de Bonferroni. Fonte: O autor.

Tabela 1 Valores de  $CI_{50}$  calculados nas células K562 após 24, 48 e 72 horas de incubação com ambos os compostos.

<b>DSH55</b>	
<b>Tempo</b>	<b>K562 (média <math>\pm</math> EPM)</b>
24 h	46,37 $\pm$ 1,70 $\mu$ M
48 h	35,53 $\pm$ 1,14 $\mu$ M
72 h	27,71 $\pm$ 1,05 $\mu$ M
<b>DSH56</b>	
<b>Tempo</b>	<b>K562 (média <math>\pm</math> EPM)</b>
24 h	76,68 $\pm$ 3,64 $\mu$ M
48 h	48,65 $\pm$ 2,10 $\mu$ M
72 h	29,79 $\pm$ 1,39 $\mu$ M

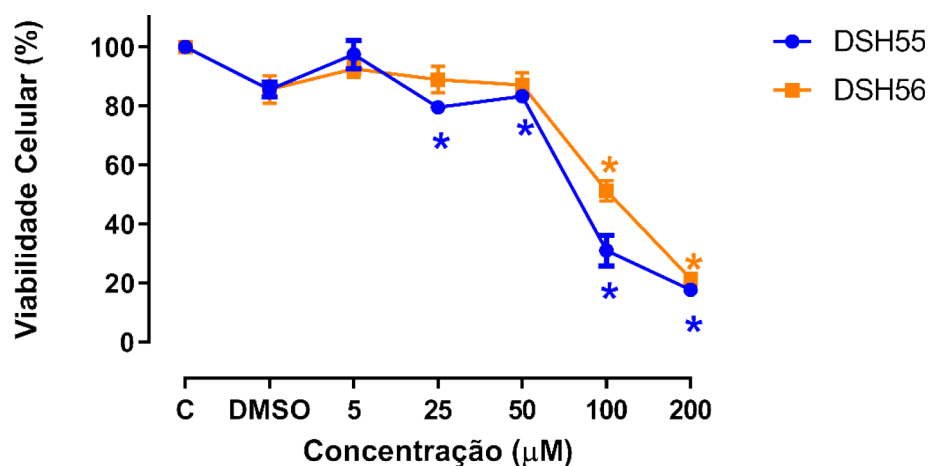
$CI_{50}$ : Concentração inibitória 50%. EPM: Erro padrão da média

Fonte: O AUTOR

## 5.2 EFEITO CITOTÓXICO DAS IMIDAZOPIRIDINAS DSH55 E DSH56 SOBRE PBMC

De acordo com a Figura 9, ambos os compostos possuem efeito citotóxico sobre PBMC quando comparado ao controle negativo. Contudo, tal efeito é observado em concentrações a partir de 25  $\mu$ M em 24 horas para o composto DSH55 e apenas a partir de 100  $\mu$ M para o DSH56, isso resulta em uma  $CI_{50}$  de 81,29  $\pm$  3,28  $\mu$ M e de 117,6  $\pm$  4,10  $\mu$ M para os compostos DSH55 e DSH56, respectivamente. Portanto, apesar de citotóxicos sobre células mononucleares de pacientes saudáveis, as imidazopiridinas DSH55 e DSH56 em suas formas livres apresentam um efeito citotóxico 1,75 e 1,53 vezes maior em células neoplásicas, respectivamente, em 24 horas.

Figura 9 Efeito citotóxico dos compostos DSH55 e DSH56 em células mononucleares isoladas de SP.



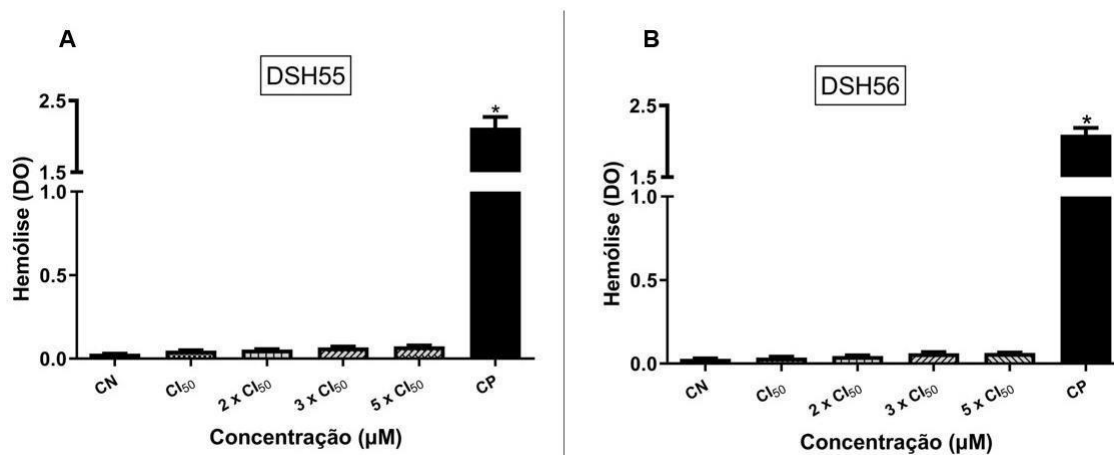
Citotoxicidade dos compostos DSH55 e DSH56 em concentrações crescentes de 1 a 200 µM sobre células mononucleares de sangue periférico após 24 horas de incubação. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT. Cada ponto da curva representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes. Diferença significativa: \*  $P \leq 0,05$ , quando comparado ao grupo controle, ANOVA *one-way*, seguido do *post-hoc* de Bonferroni. Fonte: O autor.

### 5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO HEMOLÍTICO INDUZIDO PELOS COMPOSTOS DSH55 E DSH56 EM ERITRÓCITOS HUMANOS

O efeito hemolítico dos compostos sobre eritrócitos de indivíduos saudáveis foi avaliado em concentrações crescentes, de uma a cinco vezes a  $CI_{50}$  de cada uma das imidazopiridinas. A Figura 10 apresenta os valores brutos, de densidade óptica dos sobrenadantes. Os resultados mostram que nenhum dos compostos apresentam efeitos hemolíticos *in vitro*, mesmo em concentrações cinco vezes maiores que a  $CI_{50}$  de 24 horas.



Figura 10 Efeito dos compostos DSH55 e DSH56 sobre eritrócitos de SP.

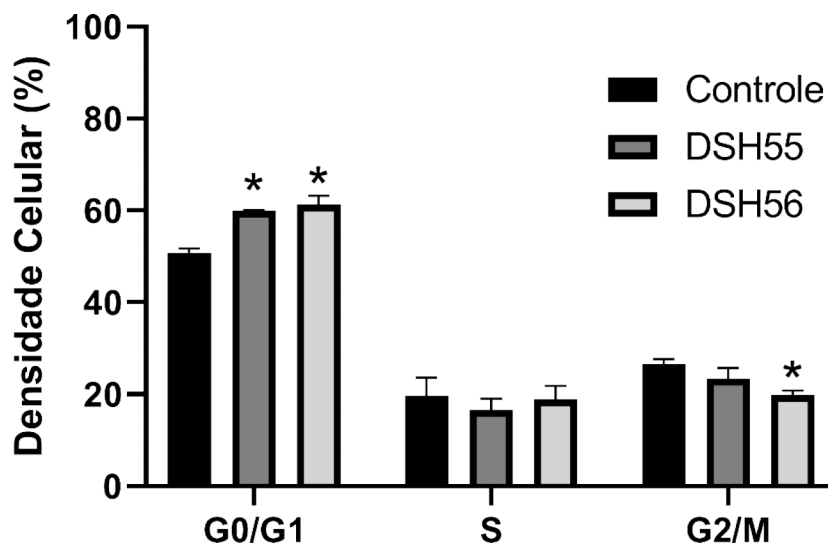


Hemólise representada pela densidade óptica (DO) do sobrenadante após 1 hora de tratamento dos eritrócitos com DSH55 ou DSH56. Os ensaios foram realizados em triplicata, com pelo menos três amostras coletadas de indivíduos diferentes. Diferença significativa: \*  $P \leq 0,05$ , quando comparado ao controle negativo. ANOVA *one-way* seguido de *post-hoc* Tukey. CN: Controle negativo; CP: Controle positivo. Fonte: O autor

#### 5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE O CICLO CELULAR

O efeito de ambos os compostos sobre o ciclo celular das células K562 foi avaliado após 18 horas de tratamento com a Cl<sub>50</sub> de 24 horas. A proporção de células em cada uma das fases do ciclo celular está ilustrada na Figura 11. Em relação ao grupo controle, células sem tratamento, ambas as imidazopiridinas induziram bloqueio no ciclo celular, evidenciado pelo aumento significativo do número de células nas fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.

Figura 11 Efeito do DSH55 e DSH56 na progressão do ciclo celular das células K562.



Fases do ciclo celular das células da linhagem K562 após incubação com os compostos DSH55 e DSH56 nas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas por 18 horas, avaliadas por citometria de fluxo e comparadas aos respectivos grupos controles (células sem tratamento com os compostos). Os resultados expressam a média  $\pm$  erro padrão da média de, pelo menos, dois experimentos independentes. Diferença significativa: \*  $P \leq 0,05$ , quando comparado ao grupo controle, ANOVA One-way, seguido do *post-hoc* de Bonferroni. Fonte: O autor.

## 5.5 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA APOPTOSE

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

Como pode ser observado na Figura 12, as células incubadas com DSH55 apresentaram características típicas de apoptose inicial e tardia, tais como diminuição do volume celular, condensação da cromatina, formação de *blebs* na membrana citoplasmática, formação de corpos apoptóticos e raras células com aumento na permeabilidade de membrana (células laranjas coradas pelo BE).

Por outro lado, após incubação com o DSH56, a morfologia das células K562 apresentaram-se com características compatíveis com apoptose tardia, devido ao aumento da permeabilidade de membrana evidenciado pela coloração laranja, e

poucas características compatíveis com apoptose inicial, como diminuição do volume celular, condensação da cromatina e raros *blebs* de membrana plasmática.

Figura 12 Alterações morfológicas induzidas pelo DSH55 e pelo DSH56 em células K562

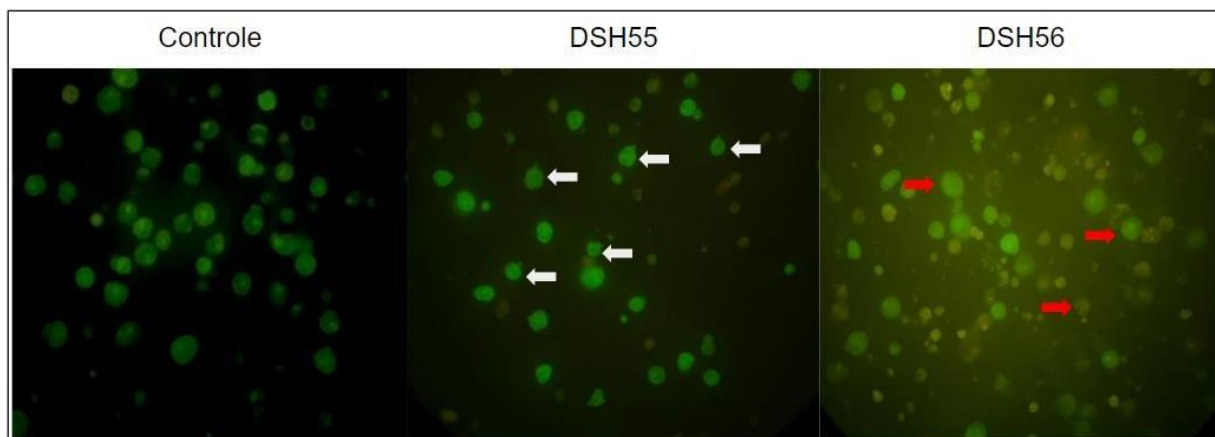
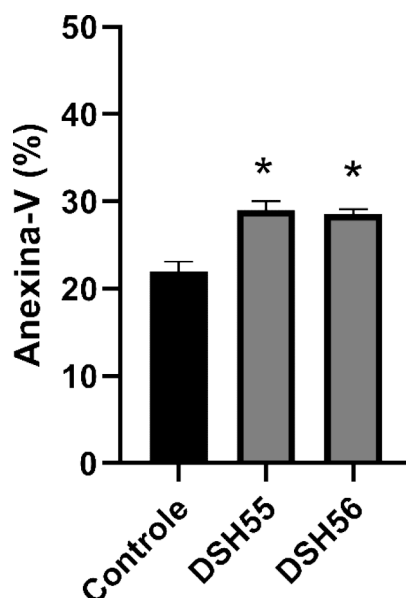


Imagem ilustrativa da morfologia das células K562 após tratamento com  $CI_{50}$  de 24 h, por 24 h com as imidazopiridinas DSH55 e DSH56, de um dos dois experimentos independentes. Setas brancas indicam características como condensação da cromatina e formação de *blebs* de membrana. Setas vermelhas indicam aumento da permeabilidade celular e aumento do tamanho das células.

### 5.5.2 Detecção da externalização de resíduos de fosfatidilserina

Como pode ser visualizado na Figura 13, ambos os compostos foram capazes de causar um aumento significativo (DSH55:  $32 \pm 1,4$  % e DSH56:  $30 \pm 1,2$  %) do número de células com expressão de resíduos de fosfatidilserina marcados com anexina-V, quando comparado ao grupo controle (células sem tratamento).

Figura 13 Efeito dos compostos DSH55 e DSH56 na exposição de resíduos de fosfatidilserina em células K562

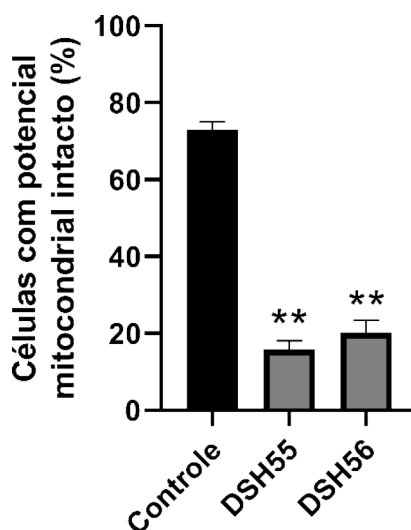


Exposição dos resíduos de fosfatidilserina determinado pela marcação com anexina-V-FITC em células K562 ( $1 \times 10^6$  células), após 18 horas de incubação com os compostos DSH55 e DSH56 nas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas, avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  erro padrão da média de, pelo menos, dois experimentos independentes. Diferença significativa: \*  $P \leq 0,05$ , quando comparado ao grupo controle, teste t de Student. Fonte: O autor.

#### 5.6 AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO DO $\Delta\Psi_m$

Como pode ser observado na Figura 14, o composto DSH55 foi capaz de causar perda do  $\Delta\Psi_m$  em  $84 \pm 3,1$  % das células, já o composto DSH56 em  $80 \pm 3,8$  %, em relação ao número total de células. Quando comparado ao controle negativo ambos os resultados mostraram diferença significativa.

Figura 14 Efeitos dos compostos DSH55 e DSH56 no  $\Delta\Psi$ M de células K562 após tratamento



Percentual de células K562 com potencial de membrana mitocondrial intacto, após 18 horas de incubação com os compostos DSH55 e DSH56 nas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas, avaliados por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  erro padrão da média de, pelo menos, dois experimentos independentes.

Diferença significativa: \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,001$ , quando comparado ao grupo controle, teste t de Student. Fonte: O autor.

## 5.7 AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE

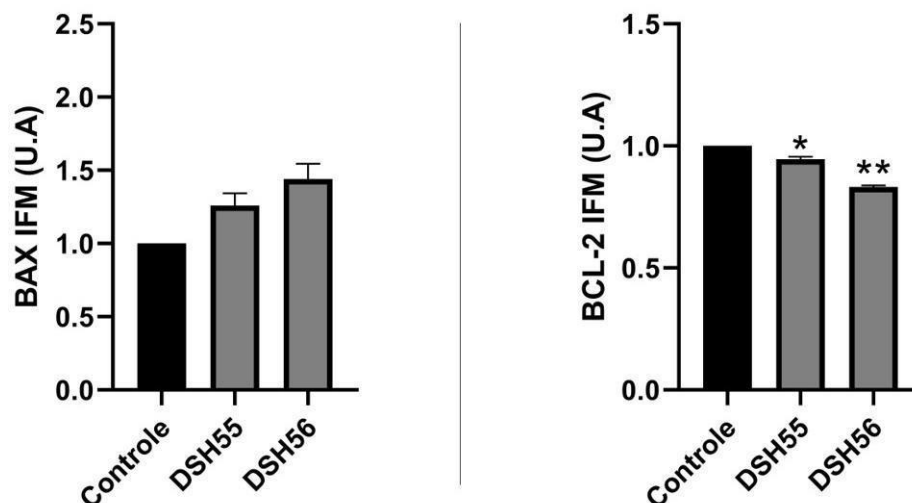
A fim de avaliar a ativação diferencial das vias de apoptose intrínseca e extrínseca, foram analisados diversos fatores e proteínas envolvidos em ambas as vias. Para todas as análises, as células K562 foram incubadas com cada uma das imidazopiridinas nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas por 18 horas.

## 5.8 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE AS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA BCL-2 (BAX E BCL-2)

Como pode ser observado na Figura 15, ambas as imidazopiridinas foram capazes de diminuir significativamente a expressão de Bcl-2. O composto DSH55 foi capaz de diminuir a expressão em  $6 \pm 0,01\%$ , enquanto o composto DSH56 diminuiu em  $17 \pm 0,01\%$ , em relação ao controle (células sem tratamento). Quando avaliada a expressão de Bax, houve um aumento da expressão, porém não foi estatisticamente

significativo. Contudo, a relação Bax/Bcl-2 de 1,33 e 1,73 para a DSH55 e DSH56, respectivamente em células tratadas com ambas as imidazopiridinas mostrou um predomínio da proteína pró-apoptóticas (Bax) em relação a antiapoptótica Bcl-2.

Figura 15 Efeito dos compostos DSH55 e DSH56 sobre a expressão das proteínas Bcl-2 e Bax em células K562

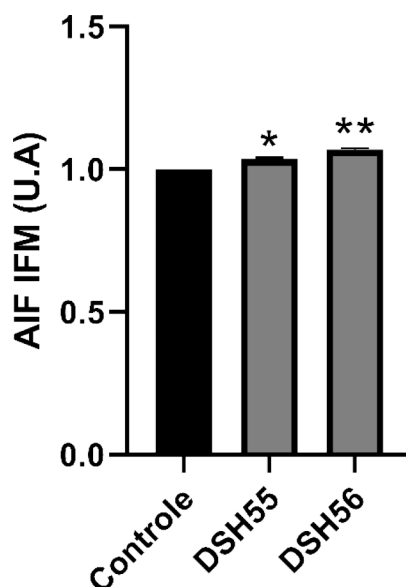


Expressão das proteínas Bax e Bcl-2 após 18 horas de incubação com os compostos DSH55 e DSH56 nas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas, avaliados por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  erro padrão da média de, pelo menos, dois experimentos independentes. Diferença significativa: \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,001$ , quando comparado ao grupo controle, teste t de Student. Fonte: O autor.

### 5.9 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE O AIF

Como demonstrado na Figura 16, a expressão da proteína AIF aumentou significativamente após tratamento com ambas imidazopiridinas. Após 18 horas de incubação com o DSH55 e DSH56, as células a expressão em  $3 \pm 0,01\%$  e  $7 \pm 0,01\%$ , respectivamente, em relação ao controle (células não tratadas).

Figura 16 Efeito dos compostos DSH55 e DSH56 na expressão da proteína AIF em células K562

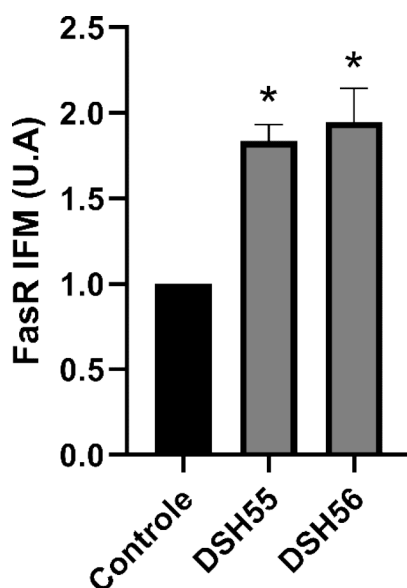


Expressão do fator indutor da apoptose em células K562, após 18 horas de incubação com os compostos DSH55 e DSH56 nas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas, avaliados por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  erro padrão da média de, pelo menos, dois experimentos independentes. Diferença significativa: \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,001$ , quando comparado ao grupo controle, teste t de Student. Fonte: O autor.

#### 5.10 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS NO RECEPTOR FAS (FasR)

O envolvimento da via extrínseca no mecanismo pelo qual os compostos DSH55 e DSH56 induzem apoptose foi avaliado pela investigação da expressão da proteína FasR. Pode-se observar na Figura 17, um aumento de  $84 \pm 0,09\%$  em relação ao controle (células sem tratamento). Resultados semelhantes foram obtidos após o tratamento com o DSH56, que causou um aumento de  $95 \pm 0,19\%$ .

Figura 17 Efeito dos compostos DSH55 e DSH56 na expressão do receptor FAS



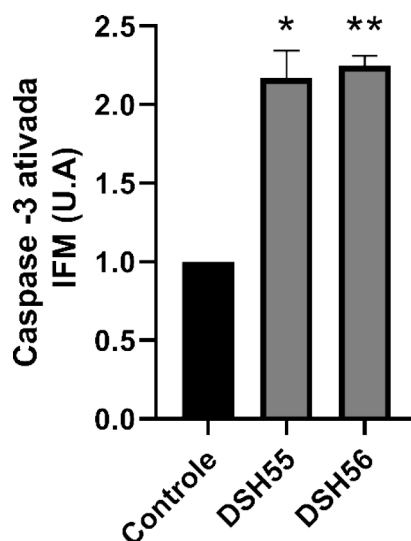
Expressão do receptor Fas em células K562, após 18 horas de incubação com os compostos DSH55 e DSH56 nas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas, avaliados por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  erro padrão da média de, pelo menos, dois experimentos independentes. Diferença significativa: \*  $P \leq 0,05$ , quando comparado ao grupo controle, teste t de Student. Fonte: O autor.

#### 5.11 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE A CASPASE 3 ATIVADA

Na Figura 18, está representado o efeito das imidazopiridinas analisadas sobre a proteína caspase 3 ativada nas células K562. Após o período de 18 horas, foi possível constatar um aumento de  $117 \pm 0,17\%$  após tratamento com DSH55 e de  $124 \pm 0,06\%$  após incubação com DSH56.



Figura 18 Efeito dos compostos DSH55 e DSH56 na expressão de caspase 3 ativada em células K562

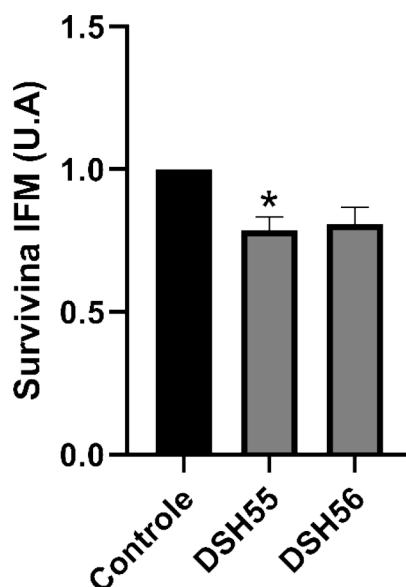


Expressão de caspase 3 ativada nas células K562, após 18 horas de incubação com os compostos DSH55 e DSH56 nas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas, avaliados por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  erro padrão da média de, pelo menos, dois experimentos independentes. Diferença significativa: \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,001$ , quando comparado ao grupo controle, teste t de Student. Fonte: O autor.

#### 5.12 EFEITO DOS COMPOSTOS DSH55 E DSH56 SOBRE A PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA SURVIVINA

A expressão da proteína antiapoptótica survivina, foi avaliada após 18 horas de tratamento com ambas as imidazopiridinas. Como pode ser observado na Figura 19, enquanto DSH55 foi capaz de reduzir significativamente a expressão da proteína ( $21 \pm 0,04\%$ ), quando comparados ao controle (células sem tratamento), entretanto, após o tratamento com DSH56 ( $19 \pm 0,05\%$ ), essa redução não foi significativa.

Figura 19 Efeito dos compostos DSH55 e DSH56 na expressão da proteína survivina em células K562

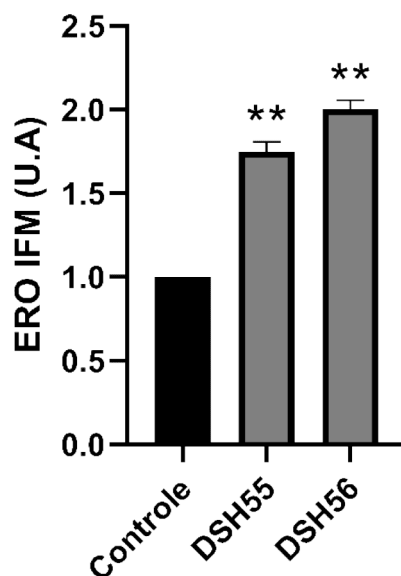


Expressão de survivina em células K562, após 18 horas de incubação com os compostos DSH55 e DSH56 nas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas, avaliados por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  erro padrão da média de, pelo menos, dois experimentos independentes. Diferença significativa: \*  $P \leq 0,05$ , quando comparado ao grupo controle, teste t de Student. Fonte: O autor.

### 5.13 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS DSH55 E DSH56 NA FORMAÇÃO DE ERO

Como mostra a Figura 20, houve um acúmulo significativo de ERO nas células K562 após o tratamento com ambas as imidazopiridinas, quando comparadas ao controle negativo (células sem tratamento). Após tratamento com as imidazopiridina DSH55 e DSH56, foi observado um aumento de  $75 \pm 0,05\%$  e de  $100 \pm 0,05\%$ , respectivamente.

Figura 20 Efeito das imidazopiridinas na formação de ERO

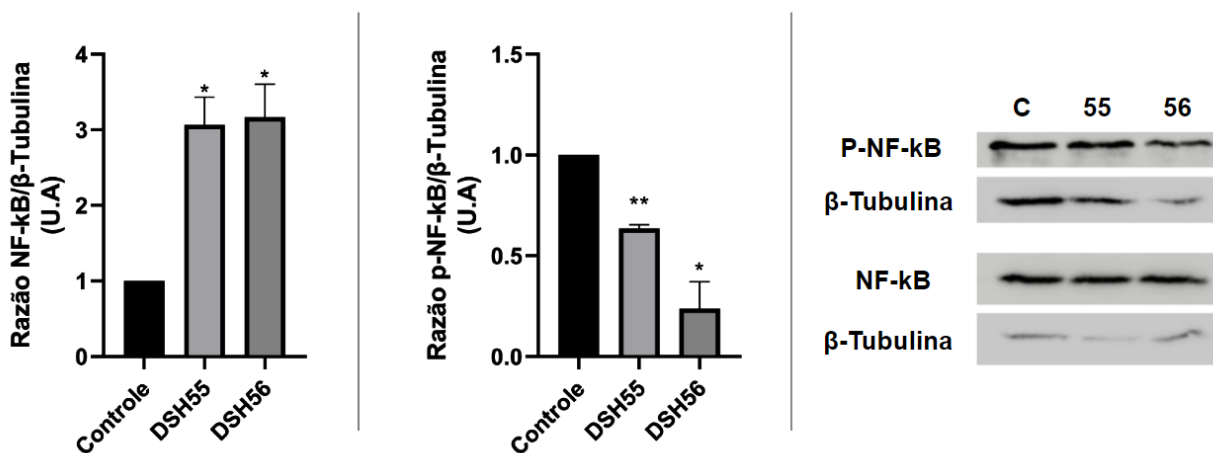


Efeito na formação de ERO em células K562, após 18 horas de incubação com os compostos DSH55 e DSH56 nas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas, avaliados por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  erro padrão da média de, pelo menos, dois experimentos independentes. Diferença significativa: \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,001$ , quando comparado ao grupo controle, teste t de Student. Fonte: O autor.

#### 5.14 EFEITO DAS IMIDAZOPIRIDINAS SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE NF- $\kappa$ B (p65) E p-NF- $\kappa$ B

Como é possível observar na Figura 21, houve um aumento significativo de  $107 \pm 0,27$  e de  $117 \pm 0,32\%$  na concentração intracelular de p65 após o tratamento com os compostos DSH55 e DSH56, respectivamente, nas  $CI_{50}$  de 24 horas em relação ao grupo controle. De forma contrária, foi observada uma diminuição expressiva e significativa da concentração de subunidades p65 fosforiladas de  $36 \pm 0,02\%$  e de  $76 \pm 0,13\%$ , após o tratamento com as imidazopiridinas DSH55 e DSH56, respectivamente, em relação ao controle.

Figura 20 Efeito das imidazopiridinas DSH55 e DSH56 nas concentrações de p65 e p-NF-κB nas células K562



As células K562 foram incubadas com ambos os compostos por 24 horas na sua  $CI_{50}$  de 24 horas. A avaliação das concentrações de p65 e p-NF-κB foi realizada por WB e a proteína β-tubulina foi utilizada como proteína âncora. Os resultados da quantificação de proteínas representam a média  $\pm$  erro padrão da média de dois experimentos independentes. C: Controle negativo Diferença significativa: \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,001$ . Teste t de Student. Fonte: O autor.

## 6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de neoplasias hematológicas representa um desafio para os pesquisadores de todo mundo e o aumento da incidência esperado para o ano de 2040 indica que o impacto dessas doenças continuará a crescer (SUNG et al., 2021). Atualmente a LMA está listada entre as quinze neoplasias mais frequentes e que mais levam à óbito (SUNG et al., 2021). Em parte, isso se deve à falta de novas opções terapêuticas, visto que o tratamento da LMA sofreu poucas alterações nas últimas quatro décadas, em especial no arsenal de medicamentos sintéticos (KANTARJIAN et al., 2021).

Para o desenvolvimento de novos fármacos é desejável que os compostos apresentem baixas  $CI_{50}$  e maior citotoxicidade sobre células neoplásicas do que em células não neoplásicas (BERROUET et al., 2020). Além disso, é importante que os compostos testados apresentem características físico-químicas, farmacocinéticas e farmacológicas comparáveis com aqueles já utilizados na clínica, o que garante que em concentrações adequadas, serão distribuídas pelo organismo. Esses aspectos indicam um perfil de segurança e tornam a procura por novos compostos mais eficiente (JEAN-QUARTIER et al., 2018). Adicionalmente, é importante que os compostos levem à morte celular por mecanismos altamente regulados, como a apoptose (GALLUZZI et al., 2018a; VITALE et al., 2023a).

Pertencentes a classe das imidazopiridinas, os compostos DSH55 e DSH56 têm como estrutura básica os heterocíclicos imidazol e piridina fusionados em sua estrutural. Dentre os representantes dessa classe terapêutica, destaca-se o zolpidem, um hipnótico não-benzodiazepínico que tem como principal vantagem o baixo risco de causar depressão respiratória (DARCOURT et al., 1999; GREENBLATT; ROTH, 2012). No entanto, o uso prolongado de zolpidem por jovens adultos (18-64 anos) foi associado a aumento do risco de desenvolvimento de câncer de origem no sistema nervoso central em estudos retrospectivos (HWANG et al., 2022; KAO et al., 2012).

Todavia, além do medicamento zolpidem, diversos derivados de imidazopiridinas foram testados quanto a sua atividade biológica. Com a manutenção dos anéis heterocíclicos, essenciais para a atividade biológica, é possível obter modificações no perfil de atividade bem como na potência da ação pelas variações nas cadeias laterais, como demonstrado pelos estudos de relação

estrutura-atividade presentes na literatura (BIFTU et al., 2006; KHATUN et al., 2022; SILVA et al., 2021).

Os compostos DSH55 e DSH56 apresentam isomeria de posição, ou seja, diferem apenas quanto a posição da metoxila aromática presente em uma de suas cadeias laterais (DE SALLES et al., 2019). Assim, é esperado que sua atividade varie e que um dos compostos seja preferível no desenvolvimento de novos derivados para o tratamento da LMA.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi prever as características farmacocinéticas e farmacológicas *in silico* e avaliar a atividade de dois compostos sintéticos, derivados de imidazopiridinas, DSH55 e DSH56, em um modelo de LMA *in vitro*, bem como o mecanismo pelos quais esses compostos induzem a morte celular.

Assim, a investigação se iniciou pela predição dos parâmetros farmacocinéticos, representados no Quadro 3, que indicam que ambos os compostos testados apresentam alta capacidade de absorção intestinal, o que indica que ambos podem ser utilizados por via oral. Além disso, foi previsto que os compostos DSH55 e DSH56 permeiem a barreira hematoencefálica, o que pode ser prejudicial caso os compostos apresentem neurotoxicidade, mas pode representar um efeito benéfico para pacientes com LMA com acometimento do sistema nervoso central, cujo tratamento depende de infusão intratecal de citarabina (WU et al., 2022). Um fator que corrobora o uso dos compostos DSH55 e DSH56 de forma oral com foco no sistema nervoso central é a ampla utilização do medicamento zolpidem, de forma oral, como um modulador do sistema nervoso central sem indícios de neurotoxicidade (YOUSEFSANI; AKBARIZADEH; POURAHMAD, 2020).

Um parâmetro importante para utilização no sistema nervoso central avaliado é a possibilidade de os compostos serem substrato da glicoproteína-P. Essa é considerada uma das principais bombas de efluxo presentes nas barreiras biológicas, como a barreira hematoencefálica (LIN; YAMAZAKI, 2003), e é comumente superexpressa em células neoplásicas, nas quais contribui com a resistência pela remoção de quimioterápicos (PILOTTO HEMING et al., 2022). Assim, após observados os resultados previstos no Quadro 3, é possível concluir que o composto DSH56 apresenta características desejáveis em relação ao DSH55, devido ao fato de não ser substrato da glicoproteína-P.

Outras enzimas cruciais na farmacocinética de novos compostos são as isoenzimas da superfamília do citocromo P450. Dentre as isoenzimas que compõe a superfamília foram analisadas as enzimas CYP1A2, 2C19, 2C9, 2D6 e 3A4, as quais são responsáveis pelo metabolismo de mais de 50% das moléculas bioativas usadas na clínica (HA; BHAGAVAN, 2023). A inibição de enzimas da superfamília CYP450 é uma característica indesejável, já que pode levar a interações medicamentosas pela capacidade reduzida de depuração como consequência dessa inibição (HA; BHAGAVAN, 2023; LYNCH; PRICE, 2007). Dessa forma, não é ideal o perfil de inibição do metabolismo previsto para os compostos DSH55 e DSH56. No entanto, fármacos que inibem as enzimas supracitadas são utilizados na clínica, como o imatinibe, que inibe as enzimas CYP3A4 e 2C8 (FILPPULA et al., 2012), desde que sejam aplicados em conjunto com medicamentos que não sejam metabolizados pelas enzimas inibidas. Assim, sugere-se que as imidazopiridinas testadas podem ser utilizadas em conjunto com a ciclofosfamida ou paclitaxel, metabolizados pelas CYP2B6 e 2C8, respectivamente (SHIBATA et al., 2021; WANG et al., 2014), ou ainda, que sejam empregadas em formulações direcionadas ao tecido tumoral, como a nanoencapsulação, a fim de evitar efeitos adversos como a neurotoxicidade ou inibição do metabolismo de xenobióticos (KOU et al., 2020).

Por fim, a última análise realizada com a ferramenta *SwissADME* buscou avaliar os PAINS e os alertas estruturais de Brenks, além de avaliar sua acessibilidade sintética das imidazopiridinas. Nessa análise não foram detectados alertas quanto a presença de grupos potencialmente tóxicos (BAELL; HOLLOWAY, 2010; BRENK et al., 2008), o que, em conjunto com sua similaridade com o zolpidem, demonstra a biocompatibilidade de ambos os compostos.

Em seguida, a investigação da atividade biológica dos compostos DSH55 e DSH56 se iniciou pela avaliação da citotoxicidade sobre células K562. Como é possível observar na Figura 8, ambas as imidazopiridinas reduziram a viabilidade das células K562 de forma tempo e concentração dependente. Esses resultados corroboram outros resultados encontrados na literatura (CHENG et al., 2012; DAMGHANI et al., 2021;; SHARMA et al., 2021; YU et al., 2022), onde outras imidazopiridinas mostraram ação citotóxica contra células de neoplasias de mama (SAJITH et al., 2015; EL-AWADY et al., 2016), pulmão (KAMAL et al., 2013), com

$CI_{50} < 10 \mu M$  ou ainda contra células de melanoma (BACCON-SOLLIER et al., 2020) ou glioblastoma (GÜÇLÜ et al., 2018), com  $CI_{50}$  comparáveis.

De acordo com a literatura, o mecanismo citotóxico das imidazopiridinas envolve a perda do potencial de membrana mitocondrial e bloqueio do ciclo celular (GÜÇLÜ et al., 2018; KAMAL et al., 2013; YU et al., 2022). Esse é um mecanismo desejável para o desenvolvimento de quimioterápicos, que confere seletividade em relação às células saudáveis, pois tem como alvos processos descontrolados dos quais células neoplásicas dependem, como o ciclo celular e o desbalanço de proteínas antiapoptóticas e apoptóticas capaz de formar poros na membrana mitocondrial (GALLUZZI et al., 2018a; VITALE et al., 2023a).

Como forma de prevenir efeitos adversos como depleção de células saudáveis ou hemólise intravascular devem ser realizados durante o desenvolvimento de novos medicamentos testes para avaliar a citotoxicidade contra células saudáveis ou o potencial efeito hemolítico. Assim, após constatado o efeito citotóxico sobre células neoplásicas foi avaliado o efeito sobre PBMC e eritrócitos de indivíduos considerados saudáveis. Sobre PBMC, as imidazopiridinas analisadas causaram efeito citotóxico tempo e concentração dependente após 24 horas de tratamento. No entanto, esse efeito foi menos expressivo do que aquele observado sobre células neoplásicas, o que indica um perfil de seletividade baixo, (PEÑA-MORÁN et al., 2016) mas que pode ser melhorado com alterações moleculares e/ou com a incorporação dos compostos em formas farmacêuticas (BATOOL; AHMAD; CHOI, 2019; KUMARI et al., 2014). Já quando a atividade foi avaliada sobre eritrócitos as imidazopiridinas não demonstraram efeito hemolítico, mesmo em concentrações cinco vezes maiores que a  $CI_{50}$  de 24 horas em células K562. Esse resultado representa um achado importante, que indica um perfil de segurança, em especial para a administração intravenosa desses compostos (PAGANO; FAGGIO, 2015). A via intravenosa é a principal via utilizada para administração de quimioterápicos por garantir que a concentração utilizada atinja a circulação sistêmica em sua totalidade. Isso é especialmente importante na LMA, já que as células neoplásicas originadas na MO ganham a circulação e seu acúmulo nestes sítios é frequentemente relacionada a complicações da LMA (KHOURY et al., 2022).

Em seguida, o objetivo foi caracterizar o mecanismo de indução da morte celular provocado pelo tratamento com as imidazopiridinas DSH55 e DSH56. Para



isso foram realizadas avaliações da morfologia das células por microscopia de fluorescência, bem como a investigação das principais proteínas envolvidas com a apoptose intrínseca e extrínseca após o tratamento com os compostos.

Para isso, inicialmente foi avaliada a morfologia das células K562 após tratamento com as imidazopiridina. Com esse intuito, foram utilizados os corantes fluorescentes laranja de acridina e brometo de etídio, que coram células com a membrana íntegra ou não, respectivamente. Como descrito acima, após o tratamento com a imidazopiridina DSH55, as células K562 apresentaram características compatíveis com a apoptose. Condensação da cromatina e formação de *blebs* de membrana, os quais são eventos decorrentes da ativação da via das caspases (NUÑEZ et al., 1998) e, em conjunto com a fluorescência negativa para brometo de etídio, indica um processo de morte celular controlado, sem aumento da permeabilidade da membrana plasmática (RENVOIZÉ et al., 1998). Já após o tratamento com DSH56, foram observadas características comuns entre apoptose e necrose, como aumento do tamanho celular e aumento da permeabilidade de membrana (RENVOIZÉ et al., 1998).

Posteriormente, foi avaliada a expressão de resíduos de fosfatidilserina na membrana das células K562, após o tratamento com os compostos por citometria de fluxo, por meio da proteína anexina-V, a qual se liga de forma específica aos resíduos de fosfatidilserina. Esses resíduos são fosfolipídios constitutivos da membrana celular, que em condições homeostáticas não são apresentados para o espaço extracelular. No entanto, em decorrência da desestabilização da membrana plasmática, que ocorre nos estágios iniciais da apoptose, esses resíduos são externalizados e reconhecidos por células fagocíticas, que eliminam as células que expressam esses resíduos através da endocitose (FADOK et al., 1998; NAGATA, 2018). Após o tratamento com ambas as imidazopiridinas, foi observado um aumento significativo na proporção de células com expressão de resíduos de fosfatidilserina, o que, em conjunto com as alterações morfológicas encontradas, sugere que os compostos DSH55 e DSH56 induzem a morte celular das células K562 por apoptose (GALLUZZI et al., 2018b; VITALE et al., 2023b). No entanto, outras formas de morte celular não podem ser descartadas. Por isso, foram realizadas análises da expressão de proteínas envolvidas na apoptose, a fim de

confirmar a indução dessa forma de morte celular, bem como para elucidar o envolvimento da apoptose extrínseca e/ou intrínseca.

A apoptose extrínseca é um tipo de morte celular regulada desencadeada por alterações do microambiente extracelular que levam à sinalização por meio de receptores de membrana conhecidos como receptores de morte celular (GALLUZZI et al., 2018b; VITALE et al., 2023b). Dentre esses, o FasR é um dos mais bem caracterizados (NAGATA, 1999a). Após reconhecer seu ligante, FasL, a porção intracelular do receptor se complexa com a proteína adaptadora FADD e com as pró-caspases 8 e 10, o que dá origem ao DISC, que por sua vez cliva e ativa as caspases 8 e 10, que iniciam a cascata das caspases (NAGATA, 1999b). Após o tratamento com os compostos DSH55 e DSH56, foi observado um aumento considerável da expressão de FasR, o que indica que a apoptose extrínseca está envolvida no mecanismo de morte celular desencadeado pelo tratamento com as imidazopiridinas analisadas.

Além da apoptose extrínseca, neste trabalho também foi avaliada a indução da apoptose intrínseca, na qual um dos eventos cruciais é a formação de poros na membrana mitocondrial externa (GALLUZZI et al., 2018b; VITALE et al., 2023b). As mitocôndrias são organelas responsáveis pela respiração celular, bem como por processos de catálise enzimática do metabolismo redox. Essas organelas contêm duas membranas mitocondriais, e com formação de poros nessas membranas há a perda do  $\Delta\Psi_m$ , estritamente necessário no processo de respiração celular, formação de ATP e manutenção da viabilidade celular (MOLDOVEANU, 2023). Assim, após o tratamento com ambas as imidazopiridinas o  $\Delta\Psi_m$  foi avaliado nas amostras e foi observada uma diminuição expressiva na proporção de células com o  $\Delta\Psi_m$  intacto. A perda do  $\Delta\Psi_m$  pode ocorrer por diversos mecanismos, como a formação de poros na membrana externa ocasionada por um desbalanço na concentração de proteínas pró e anti-apoptóticas da família BCL-2, de tal forma que proteínas pró-apoptóticas como Bax e Bak levam a formação de poros na membrana mitocondrial externa (MOLDOVEANU, 2023). Além de ocasionar a perda do  $\Delta\Psi_m$ , a formação de poros da membrana mitocondrial externa resulta na liberação das proteínas citocromo-c, AIF e SMAC/Diablo, indutoras da apoptose (VAN GURP et al., 2003).

Por esse motivo, após a constatação da perda do  $\Delta\Psi_m$  foi avaliada a expressão das proteínas Bax e Bcl-2 após o tratamento com as imidazopiridinas

estudadas. Como pode ser observado na Figura 15, o tratamento com esses compostos não alterou de forma significativa a expressão de Bax nas células K562, no entanto, diminuiu de forma significativa a expressão da proteína Bcl-2, o que resulta num desequilíbrio entre proteínas pró e antiapoptóticas e uma relação Bax/Bcl-2 aumentada, o que indica a predominância de um estímulo apoptótico e pode explicar a perda de  $\Delta\Psi_m$ . A fim de avaliar a expressão de proteínas liberadas pelas mitocôndrias cujo  $\Delta\Psi_m$  foi perdido, foi avaliada a expressão citoplasmática do AIF, e os resultados mostram que houve um aumento significativo da expressão dessa proteína, quando comparado ao controle negativo. O AIF, após liberado do espaço intermembranar, é capaz de adentrar ao núcleo e induzir a condensação da cromatina, bem como a fragmentação do DNA (KETTIG et al., 2015). Dessa forma, o conjunto de resultados apresentados sugere que o tratamento com ambas as imidazopiridinas testadas induzem a apoptose intrínseca, por meio do desbalanço Bax/Bcl-2, que leva à perda do  $\Delta\Psi_m$ , o que resulta na liberação de AIF no citoplasma das células tratadas com as imidazopiridinas analisadas

Como mostram os resultados apresentados até o momento, ambas as imidazopiridinas induzem as células K562 à morte celular por apoptose extrínseca e intrínseca, no entanto, ambas as vias culminam na ativação da cascata das caspases, responsável pelos eventos observados na apoptose, como formação dos *blebs* de membrana, fragmentação do DNA e exposição dos resíduos de fosfatidilserina. Por isso, para comprovar a execução da apoptose, foi avaliada a expressão da caspase 3 ativada, última proteína da cascata das caspases e cuja expressão determina a finalização da apoptose. Assim, como pode ser observado na Figura 18, a expressão de caspase 3 ativada foi elevada em aproximadamente duas vezes após o tratamento com ambas as imidazopiridinas, esse fato, em conjunto com os outros resultados apresentados, confirma a execução da apoptose extrínseca e intrínseca nas células K562 após o tratamento com DSH55 e DSH56.

É importante ressaltar que a apoptose intrínseca e a extrínseca são vias de morte celular regulada conectadas, e que o acionamento de uma das vias pode levar a ativação da outra. Isso ocorre pela ativação da proteína BID (Agonista de morte de domínio de interação BH3) pertencente à família Bcl-2, que é transformada em sua forma truncada (tBID) pela ação da caspase 8 ativada (ESPOSTI, 2002). Dessa forma, um produto da ativação da apoptose intrínseca ativa BID, que por sua vez

modula o balanço Bax/Bcl-2 e ainda, promove diretamente a formação de poros na membrana mitocondrial (FLORES-ROMERO et al., 2022). Essa pode ser uma explicação para a dupla ativação das vias após o tratamento com as imidazopiridinas DSH55 e DSH56, e o papel da proteína BID nesse processo pode ser avaliada no futuro pela expressão de BID em diferentes tempos ou com técnicas como *knockout* ou *knockdown* (NEITEMEIER et al., 2017).

Além da indução da apoptose, outra característica desejável para os compostos antineoplásicos é a capacidade de bloquear o ciclo celular. Esse efeito é desejável em virtude da proliferação descontrolada das células neoplásicas, que se multiplicam na MO e tomam o espaço de progenitores hematopoiéticos saudáveis, que, é principal causa da pancitopenia, muito comum entre os pacientes acometidos pela LMA (WEINZIERL; ARBER, 2013). Dentre os quimioterápicos utilizados na clínica, vários apresentam esse mecanismo de ação (BAR-ON; SHAPIRA; HERSHKO, 2007; SUN et al., 2021) ou agem também de forma citostática.

A fim de elucidar se os compostos DSH55 e DSH56 são capazes de bloquear o ciclo celular, e dessa forma, impedir a proliferação das células K562, foi avaliada a proporção de células em cada estágio do ciclo celular com base na concentração de DNA por meio da marcação com o corante iodeto de propídio. Em comparação com o controle negativo, foi possível observar um aumento significativo na quantidade de células na fase G0/G1 do ciclo celular após tratamento com ambos os compostos, e para o DSH56, também foi observada uma diminuição de células na fase G2/M. As fases G0 e G1 são conhecidas como fases de repouso e de preparação para duplicação do DNA, respectivamente, e o aumento da proporção de células nessas fases indica um bloqueio do ciclo celular. De acordo com a literatura, outras imidazopiridinas são capazes de bloquear o ciclo celular em diversas fases (LEE et al., 2012; LI et al., 2013; SONG et al., 2014), inclusive na fase G1 (BHAVYA et al., 2022; HE et al., 2020; PAN et al., 2023), e os mecanismos propostos para o bloqueio na fase G1 envolvem a inibição da transcrição de RNA e da síntese de proteínas necessárias para duplicação do DNA (FOSTER et al., 2010).

Um dos principais indutores do ciclo celular é o NF- $\kappa$ B, sua ação como promotor da transcrição gênica é essencial na fase G1, visto que é nessa fase em que são transcritos os RNA necessários para duplicação do material genético que será realizada na fase S. Reconhecida como a principal proteína indutora do ciclo

celular, a ciclina D ativa o ciclo celular na fase G1 (Figura 11) (BALDIN et al., 1993) e a expressão do gene *CCND1* é regulada fortemente por três sítios de ligação  $\kappa$ B próximos ao seu promotor (LEDOUX; PERKINS, 2014).

Por isso, com intuito de elucidar se o bloqueio do ciclo celular ocorreu por inibição da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, a concentração intracelular desse fator foi avaliada por western blotting. Conforme citado anteriormente, após o tratamento com ambas as imidazopiridinas foi observado um aumento da proteína p65, uma das proteínas constituintes das subunidades do NF- $\kappa$ B e uma diminuição do conteúdo de NF- $\kappa$ B fosforilado, fator de transcrição que ativa genes ligados à sobrevivência e proliferação celular. De acordo com a literatura, a diminuição da ativação do NF- $\kappa$ B é capaz de induzir bloqueio no ciclo celular (CARRÀ et al., 2020; LEDOUX; PERKINS, 2014), bem como a apoptose, por meio da inibição da expressão de proteínas como Bcl-2 e survivina, intimamente ligadas à sobrevivência e proliferação celular (CATZ; JOHNSON, 2001; TOUALBI-ABED et al., 2007).

Muitos tipos de neoplasias hematológicas apresentam atividade constitutiva do NF- $\kappa$ B no núcleo. Essa persistente atividade do NF- $\kappa$ B é crítica para proliferação, resistência à apoptose e formação tumoral (BARGOU et al., 1997; BOSMAN; SCHURINGA; VELLENGA, 2016). A ativação do NF- $\kappa$ B está associada, normalmente, com a fosforilação do I $\kappa$ -B, o que muda sua afinidade pelo NF- $\kappa$ B. Uma vez dissociado do seu inibidor, o NF- $\kappa$ B transloca-se para o núcleo, onde se liga às sequências específicas de DNA presentes nas regiões regulatórias de genes envolvidos nas respostas imunes, inflamatórias, proliferação celular e apoptose, modulando a transcrição desses genes (LIU et al., 2017). Sendo assim, o uso de inibidores de NF- $\kappa$ B, associado ou não a quimioterápicos usados correntemente na clínica oncológica, poderá abrir novos caminhos na terapia das leucemias. Por isso, com intuito de elucidar se o bloqueio do ciclo celular ocorreu por inibição da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, a expressão desse fator foi avaliada por western blotting. Os resultados desta investigação mostram as imidazopiridinas DSH55 e DSH56 causaram inibição da ativação do NF- $\kappa$ B, o que levou a diminuição da expressão de proteínas chave da proliferação celular, como a ciclina D, e antiapoptóticas, como a Bcl-2 (CATZ; JOHNSON, 2001; TOUALBI-ABED et al., 2007), o que levou as células K562 ao bloqueio celular e apoptose. Um resultado promissor no contexto da resistência à quimioterapia (GODWIN et al., 2013;

MORTEZAEI et al., 2019) e um potencial alvo terapêutico para diversas neoplasias (RASMI; SAKTHIVEL; GURUVAYOORAPPAN, 2020; XIA; SHEN; VERMA, 2014; YAMAMOTO; GAYNOR, 2001).

Um dos efeitos da modulação da ativação do NF- $\kappa$ B é o desbalanço do estresse oxidativo (LINGAPPAN, 2018), o que pode levar ao acúmulo de ERO. Outra causa de desbalanço no metabolismo redox é a perda do  $\Delta\Psi_m$ , um efeito causado pelas imidazopiridinas, conforme descrito anteriormente. Por isso, foi avaliada a produção e acúmulo de ERO nas células K562 após o tratamento com as imidazopiridinas.

Como esperado após levar em conta os resultados anteriores, foi constatado um aumento de aproximadamente duas vezes na quantidade de espécies reativas de oxigênio em relação ao controle negativo. O acúmulo de ERO está intimamente relacionado a processos de morte celular (RYTER et al., 2007) e pode estar relacionado ao processo de morte induzido após o tratamento com as imidazopiridinas.

Diversas condições e compostos podem resultar em um ambiente de estresse oxidativo (JUAN et al., 2021) em células neoplásicas e saudáveis. O maior desafio é, portanto, induzir o acúmulo de ERO apenas em células neoplásicas. Assim, a indução do estresse oxidativo por meio do desbalanço Bax/Bcl-2 e supressão da via do NF- $\kappa$ B, possíveis alvos da terapia antineoplásica (HAFEZI; RAHMANI, 2021; YU et al., 2020), demonstra a potencial seletividade do mecanismo proposto para atividade das imidazopiridinas testadas. Além disso, De acordo com a literatura, as imidazopiridinas modulam o balanço redox por inibição de GSH e TrxR (DOS SANTOS et al., 2022), um mecanismo promissor, visto que a resistência ao estresse oxidativo é um importante fator para células neoplásicas em circulação, um ambiente com altas concentrações de  $O_2$  (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020).

Por fim, foi avaliada a expressão da proteína survivina, relacionada a resistência ao tratamento e proliferação descontrolada das células neoplásicas. Interessantemente, o tratamento com DSH55 foi capaz de diminuir a expressão dessa proteína, entretanto, o mesmo não foi observado com o composto DSH56. Em células neoplásicas, a proteína survivina atua por meio da inibição da cascata das caspases (CHEN et al., 2016), e é expressa principalmente durante as fases G2/M do ciclo celular (MITTAL; JAISWAL; GOEL, 2015). Isso pode explicar o mecanismo

responsável pela repressão da expressão de survivina, visto que ambas as imidazopiridinas causaram bloqueio do ciclo celular nas fases G0/G1.

Assim, diante dos resultados apresentados, é possível afirmar que ambas as imidazopiridinas testadas induzem a morte celular regulada pela apoptose extrínseca e intrínseca. Além disso, ambos os compostos foram capazes de bloquear o ciclo celular das células K562 além de modular a atividade do NF- $\kappa$ B. E por fim, foi demonstrado a capacidade da imidazopiridina DSH55 diminuir a expressão da proteína survivina, um importante marcador de resistência aos tratamentos quimioterápicos. Portanto, sugere-se que a imidazopiridina DSH55 é um bom candidato para demais estudos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da LMA.

## 7 CONCLUSÃO

Os compostos DSH55 e DSH56, pertencentes da classe das imidazopiridinas, a qual, de acordo com a literatura, apresenta atividades antineoplásica e hipnótica. Os resultados *in silico* apresentados neste trabalho demonstram que os compostos apresentam características físico-químicas adequadas e podem potencialmente ser utilizados por via oral, que apresentam características de *druglikeness*, e respeitam os parâmetros de biocompatibilidade de PAINS e Brenks.

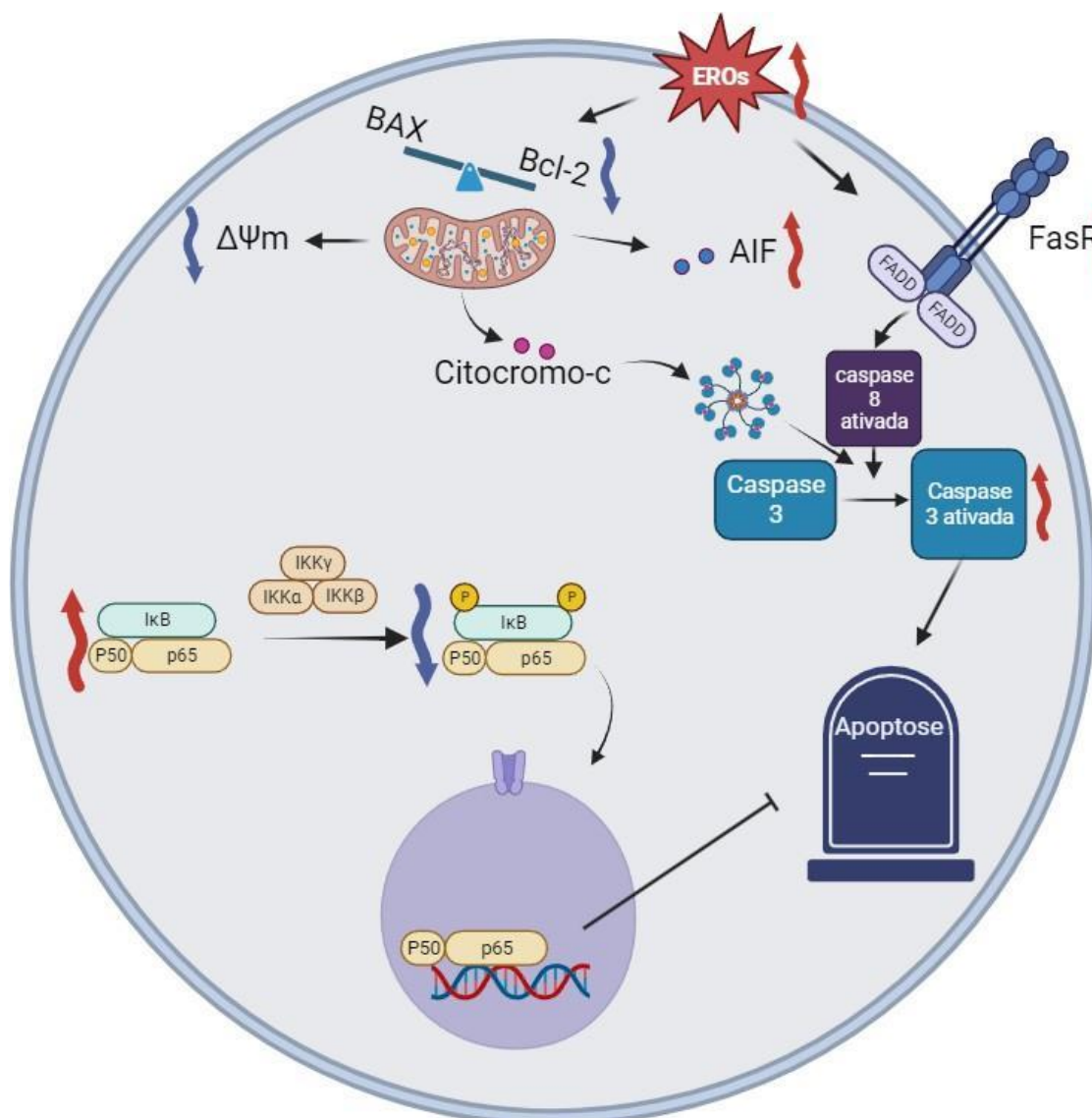
As investigações *in vitro* demonstraram que apesar de pouco seletivos, os compostos DSH55 e DSH56 são citotóxicos para células de uma linhagem de LMA (K562) e não causam hemólise *in vitro* em concentrações pelo menos cinco vezes maiores que a  $CI_{50}$  em células K562.

Em relação aos mecanismos envolvidos no efeito causado pelos compostos DSH55 e DSH56 sobre células K562, os resultados mostram que os compostos levam as células à morte celular por apoptose extrínseca e intrínseca, por meio do aumento da expressão de FasR, desequilíbrio da relação Bax/Bcl-2 e perda do  $\Delta\Psi$ M. Além disso, foi evidenciado um acúmulo de ERO após o tratamento com as imidazopiridinas estudadas, o que pode estar envolvido com os efeitos observados. Adicionalmente, ambas as imidazopiridinas testadas causaram bloqueio do ciclo celular na fase G1, inibição da ativação do NF- $\kappa$ B e, no caso do composto DSH55, diminuição da expressão de survivina (Figura 21).

Em resumo, os compostos DSH55 e DSH56 são bons candidatos para serem investigados para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da LMA, e, entre eles, o composto DSH55 apresenta características desejáveis como a inibição de survivina e melhor índice de seletividade em relação ao composto DSH56.



Figura 21 Mecanismo proposto para ação das imidazopiridinas



Resumo gráfico dos efeitos observados após o tratamento de células K562 com as imidazopiridinas DSH55 e DSH56 sobre processos centrais de morte celular regulada. Setas vermelhas representam o aumento e setas azuis a diminuição da expressão proteica. Criado com Biorender.com. Fonte: O autor

## REFERÊNCIAS

- AMANI, J. et al. Cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs) and the DNA damage response: The link between signaling pathways and cancer. **DNA Repair**, v. 102, p. 103103, jun. 2021.
- AROOZ, T. et al. On the Concentrations of Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases in Extracts of Cultured Human Cells. **Biochemistry**, v. 39, n. 31, p. 9494–9501, 1 ago. 2000.
- BACCON-SOLLIER, P. LE et al. Imidazopyridine-fused [1,3]diazepinones: modulations of positions 2 to 4 and their impacts on the anti-melanoma activity. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 935–949, 1 jan. 2020.
- BAELL, J. B.; HOLLOWAY, G. A. New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2719–2740, 8 abr. 2010.
- BALDIN, V. et al. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. **Genes & Development**, v. 7, n. 5, p. 812–821, maio 1993.
- BALDWIN, A. S. THE NF- $\kappa$ B AND I $\kappa$ B PROTEINS: New Discoveries and Insights. **Annual Review of Immunology**, v. 14, n. 1, p. 649–681, abr. 1996.
- BAO, R. et al. CUDC-305, a Novel Synthetic HSP90 Inhibitor with Unique Pharmacologic Properties for Cancer Therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 12, p. 4046–4057, 15 jun. 2009.
- BARGOU, R. C. et al. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 12, p. 2961–2969, 15 dez. 1997.
- BARNUM, K. J.; O'CONNELL, M. J. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. Em: [s.l.: s.n.]. p. 29–40.
- BHAVYA, K. et al. Novel imidazo[1,2-a]pyridine derivatives induce apoptosis and cell cycle arrest in non-small cell lung cancer by activating NADPH oxidase mediated oxidative stress. **Life Sciences**, v. 294, p. 120334, abr. 2022.
- BONETTI, J. Mass spectral differentiation of positional isomers using multivariate statistics. **Forensic Chemistry**, v. 9, p. 50–61, jun. 2018.
- BOSE, P.; GRANT, S. Rational Combinations of Targeted Agents in AML. **Journal of Clinical Medicine**, v. 4, n. 4, p. 634–664, 10 abr. 2015.
- BOSMAN, M. C. J.; SCHURINGA, J. J.; VELLENGA, E. Constitutive NF- $\kappa$ B activation in AML: Causes and treatment strategies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 98, p. 35–44, fev. 2016.

BRENK, R. et al. Lessons Learnt from Assembling Screening Libraries for Drug Discovery for Neglected Diseases. **ChemMedChem**, v. 3, n. 3, p. 435–444, 14 mar. 2008.

CANNATARO, V. L.; MANDELL, J. D.; TOWNSEND, J. P. Attribution of Cancer Origins to Endogenous, Exogenous, and Preventable Mutational Processes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 39, n. 5, 3 maio 2022.

CARRÀ, G. et al. P53 vs NF- $\kappa$ B: the role of nuclear factor-kappa B in the regulation of p53 activity and vice versa. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 22, p. 4449–4458, 22 nov. 2020.

CATZ, S. D.; JOHNSON, J. L. Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor  $\kappa$ B and its significance in prostate cancer. **Oncogene**, v. 20, n. 50, p. 7342–7351, 1 nov. 2001.

CAVALCANTE, G. C. et al. A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 17, p. 4133, 24 ago. 2019.

CHEN, X. et al. Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 3, p. 314–323, 2016.

CONITEC. **Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas da Leucemia Mieloide Aguda do Adulto**. Brasília Secretaria de Atenção à Saúde, , 2014.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42717, 3 mar. 2017.

DAMGHANI, T. et al. Imidazopyridine hydrazone derivatives exert antiproliferative effect on lung and pancreatic cancer cells and potentially inhibit receptor tyrosine kinases including c-Met. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 3644, 11 fev. 2021.

DE KOUCHKOVSKY, I.; ABDUL-HAY, M. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. **Blood Cancer Journal**, v. 6, n. 7, p. e441–e441, 1 jul. 2016.

DE LIMA, M. C. et al. Acute Myeloid Leukemia: analysis of epidemiological profile and survival rate. **Jornal de Pediatria**, v. 92, n. 3, p. 283–289, maio 2016.

DE SALLES, H. et al. Imidazo[1,2-a]pyridine A3-Coupling Catalyzed by a Cu/SiO<sub>2</sub> Material. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2019.

DOS SANTOS, D. C. et al. IP-Se-06, a Selenylated Imidazo[1,2-a]pyridine, Modulates Intracellular Redox State and Causes Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  and MAPK Signaling Inhibition, Promoting Antiproliferative Effect and Apoptosis in Glioblastoma Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 1–18, 22 mar. 2022.

EGAN, W. J.; MERZ, , KENNETH M.; BALDWIN, J. J. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 21, p. 3867–3877, 1 out. 2000.

ENGELAND, K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. **Cell Death & Differentiation**, v. 29, n. 5, p. 946–960, 31 maio 2022.

ESTROV, Z. et al. Resveratrol blocks interleukin-1 $\beta$ -induced activation of the nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. **Blood**, v. 102, n. 3, p. 987–995, 1 ago. 2003.

FILPPULA, A. et al. Potent mechanism-based inhibition of CYP3A4 by imatinib explains its liability to interact with CYP3A4 substrates. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 8, p. 2787–2798, 23 abr. 2012.

FOSTER, D. A. et al. Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). **Genes & Cancer**, v. 1, n. 11, p. 1124–1131, 1 nov. 2010.

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

GARNAR-WORTZEL, L. et al. Chemical Inhibition of ENL/AF9 YEATS Domains in Acute Leukemia. **ACS Central Science**, v. 7, n. 5, p. 815–830, 26 maio 2021.

GHOSE, A. K.; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 55–68, 12 jan. 1999.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF- $\kappa$ B AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. **Annual Review of Immunology**, v. 16, n. 1, p. 225–260, abr. 1998.

GODWIN, P. et al. Targeting Nuclear Factor-Kappa B to Overcome Resistance to Chemotherapy. **Frontiers in Oncology**, v. 3, 2013.

GÜÇLÜ, D. et al. Synthesis of novel imidazopyridines and their biological evaluation as potent anticancer agents: A promising candidate for glioblastoma. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 15, p. 2647–2651, ago. 2018.

HA, C. E.; BHAGAVAN, N. V. Drug metabolism. Em: **Essentials of Medical Biochemistry**. [s.l.] Elsevier, 2023. p. 795–805.

HAFEZI, S.; RAHMANI, M. Targeting BCL-2 in Cancer: Advances, Challenges, and Perspectives. **Cancers**, v. 13, n. 6, p. 1292, 14 mar. 2021.

- HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 1 jan. 2022.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.
- HARIKUMAR, K. B. et al. Modification of the cysteine residues in I $\kappa$ B $\alpha$  kinase and NF- $\kappa$ B (p65) by xanthohumol leads to suppression of NF- $\kappa$ B–regulated gene products and potentiation of apoptosis in leukemia cells. **Blood**, v. 113, n. 9, p. 2003–2013, 26 fev. 2009.
- HAYES, J. D.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TEW, K. D. Oxidative Stress in Cancer. **Cancer Cell**, v. 38, n. 2, p. 167–197, ago. 2020.
- HE, L.-J. et al. <p>A Novel Imidazopyridine Derivative Exhibits Anticancer Activity in Breast Cancer by Inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling</p>. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 13, p. 10111–10121, out. 2020.
- HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 1, p. 86, 2013.
- INCA. **Atlas de Mortalidade por Câncer**.
- JEAN-QUARTIER, C. et al. In silico cancer research towards 3R. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 408, 12 dez. 2018.
- JORDHEIM, L. P. et al. Sensitivity and gene expression profile of fresh human acute myeloid leukemia cells exposed ex vivo to AS602868. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 97–105, 16 jul. 2011.
- JUAN, C. A. et al. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4642, 28 abr. 2021.
- KALE, J.; OSTERLUND, E. J.; ANDREWS, D. W. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 1, p. 65–80, 17 jan. 2018.
- KANTARJIAN, H. M. et al. Acute myeloid leukemia: Treatment and research outlook for 2021 and the MD Anderson approach. **Cancer**, v. 127, n. 8, p. 1186–1207, 15 abr. 2021.
- KHATUN, S. et al. Imidazopyridine, a promising scaffold with potential medicinal applications and structural activity relationship (SAR): recent advances. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, n. 24, p. 14279–14302, 26 dez. 2022.

KHOURY, J. D. et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. **Leukemia**, v. 36, n. 7, p. 1703–1719, 22 jul. 2022a.

KHOURY, J. D. et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. **Leukemia**, v. 36, n. 7, p. 1703–1719, 22 jul. 2022b.

KOSCHADE, S. E. et al. Relapse surveillance of acute myeloid leukemia patients in first remission after consolidation chemotherapy: diagnostic value of regular bone marrow aspirations. **Annals of Hematology**, v. 101, n. 8, p. 1703–1710, 20 ago. 2022.

KOU, L. et al. Transporter-Targeted Nano-Sized Vehicles for Enhanced and Site-Specific Drug Delivery. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 2837, 1 out. 2020.

LEDOUX, A. C.; PERKINS, N. D. NF- $\kappa$ B and the cell cycle. **Biochemical Society Transactions**, v. 42, n. 1, p. 76–81, 1 fev. 2014.

LEE, H. et al. A novel imidazopyridine analogue as a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor against human breast cancer. **Cancer Letters**, v. 318, n. 1, p. 68–75, maio 2012.

LI, G.-Y. et al. A novel imidazopyridine derivative, HS-106, induces apoptosis of breast cancer cells and represses angiogenesis by targeting the PI3K/mTOR pathway. **Cancer Letters**, v. 329, n. 1, p. 59–67, fev. 2013.

LIN, J. H.; YAMAZAKI, M. Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 1, p. 59–98, 2003.

LIN, T. L.; PAGANO, L. The important role of intensive induction chemotherapy in the treatment of acute myeloid leukemia. **Expert Review of Hematology**, v. 14, n. 3, p. 303–314, 4 mar. 2021.

LINGAPPAN, K. NF- $\kappa$ B in oxidative stress. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 81–86, fev. 2018.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25. 1. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 3–26, mar. 2001.

LIU, T. et al. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. 1, p. 17023, 14 jul. 2017.

LYNCH, T.; PRICE, A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. **American family physician**, v. 76, n. 3, p. 391–6, 1 ago. 2007.

MARTÍNEZ-URBINA, M. A. et al. 6-Substituted 2-(N-trifluoroacetyl-amino)imidazopyridines induce cell cycle arrest and apoptosis in SK-LU-1 human cancer cell line. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 1211–1219, mar. 2010.

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

MITTAL, R.; JAISWAL, P.; GOEL, A. Survivin: A molecular biomarker in cancer. **Indian Journal of Medical Research**, v. 141, n. 4, p. 389, 2015.

MORTEZAEI, K. et al. NF- $\kappa$ B targeting for overcoming tumor resistance and normal tissues toxicity. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 10, p. 17187–17204, 25 out. 2019.

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

MUEGGE, I.; HEALD, S. L.; BRITTELLI, D. Simple Selection Criteria for Drug-like Chemical Matter. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 12, p. 1841–1846, 1 jun. 2001.

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

NEITEMEIER, S. et al. BID links ferroptosis to mitochondrial cell death pathways. **Redox Biology**, v. 12, p. 558–570, ago. 2017.

OMSLAND, M. et al. Tunneling nanotube (TNT) formation is downregulated by cytarabine and NF- $\kappa$ B inhibition in acute myeloid leukemia (AML). **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p. 7946–7963, 31 jan. 2017.

PALAZOLA, K. C.; LERNER, J.; ZARET, K. S. A changing paradigm of transcriptional memory propagation through mitosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 1, p. 55–64, 12 jan. 2019.

PAN, M. et al. Identification of an Imidazopyridine-based Compound as an Oral Selective Estrogen Receptor Degradator for Breast Cancer Therapy. **Cancer Research Communications**, v. 3, n. 7, p. 1378–1396, 27 jul. 2023.

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

PAZHANG, Y. et al. Synergism between NF-kappa B inhibitor, celastrol, and XIAP inhibitor, embelin, in an acute myeloid leukemia cell line, HL-60. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 12, n. 1, p. 155, 2016.

PENZO, M. et al. High-throughput screening of the Plasmodium falciparum cGMP-dependent protein kinase identified a thiazole scaffold which kills erythrocytic and sexual stage parasites. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 7005, 7 maio 2019.

PIETSCH, E. C. et al. The p53 family and programmed cell death. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6507–6521, 27 out. 2008.

PILOTTO HEMING, C. et al. P-glycoprotein and cancer: what do we currently know? **Heliyon**, v. 8, n. 10, p. e11171, out. 2022.

RASMI, R. R.; SAKTHIVEL, K. M.; GURUVAYOORAPPAN, C. NF-κB inhibitors in treatment and prevention of lung cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 130, p. 110569, out. 2020.

REIKVAM, H. Inhibition of NF-κB Signaling Alters Acute Myelogenous Leukemia Cell Transcriptomics. **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1677, 12 jul. 2020.

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

RYTER, S. W. et al. Mechanisms of Cell Death in Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 1, p. 49–89, jan. 2007.

SANTOS, M. DE O. et al. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, 6 fev. 2023.

SANTOS-PIRATH, Í. M. et al. Molecular events and cytotoxic effects of a novel thiosemicarbazone derivative in human leukemia and lymphoma cell lines. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy**, v. 14, n. 1, p. 51–64, mar. 2021.

SCHAFER, K. A. The Cell Cycle: A Review. **Veterinary Pathology**, v. 35, n. 6, p. 461–478, 26 nov. 1998.

SCHMIDT, D. R. et al. Metabolomics in cancer research and emerging applications in clinical oncology. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 4, p. 333–358, 13 jul. 2021.

SHARBEL WEIDNER MALUF. **Citogenética humana**. [s.l.: s.n.].

SHARMA, A.; BOISE, L.; SHANMUGAM, M. Cancer Metabolism and the Evasion of Apoptotic Cell Death. **Cancers**, v. 11, n. 8, p. 1144, 9 ago. 2019.

SHARMA, P. et al. Imidazoles as Potential Anticancer Agents: An Update on Recent Studies. **Molecules**, v. 26, n. 14, p. 4213, 11 jul. 2021.



SHIBATA, Y. et al. Plausible drug interaction between cyclophosphamide and voriconazole via inhibition of CYP2B6. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 39, p. 100396, ago. 2021.

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

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021.

SWERDLOW, S. H. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2375–90, 19 maio 2016.

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. NF- $\kappa$ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 5, p. 309–324, 22 maio 2018.

TENNANT, J. R. EVALUATION OF THE TRYPAN BLUE TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF CELL VIABILITY. **Transplantation**, v. 2, n. 6, p. 685–694, nov. 1964.

TETALI, S. R. et al. Current advances in the clinical development of anti-tubercular agents. **Tuberculosis**, v. 125, p. 101989, dez. 2020.

THOL, F.; GANSER, A. Treatment of Relapsed Acute Myeloid Leukemia. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 21, n. 8, p. 66, 29 ago. 2020.

TOUALBI-ABED, K. et al. Jun D cooperates with p65 to activate the proximal B site of the cyclin D1 promoter: role of PI3K/PDK-1. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 3, p. 536–543, 4 out. 2007.

UPADHYAY, A. Cancer: An unknown territory; rethinking before going ahead. **Genes & Diseases**, v. 8, n. 5, p. 655–661, set. 2021.

VAN OPDENBOSCH, N.; LAMKANFI, M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. **Immunity**, v. 50, n. 6, p. 1352–1364, jun. 2019.

VARGAS-CARRETERO, C. J. et al. Etiology and clinico-hematological profile of pancytopenia: experience of a Mexican Tertiary Care Center and review of the literature. **Hematology**, v. 24, n. 1, p. 399–404, 1 jan. 2019.

VEBER, D. F. et al. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 1 jun. 2002.

VITALE, I. et al. Apoptotic cell death in disease—Current understanding of the NCCD 2023. **Cell Death & Differentiation**, v. 30, n. 5, p. 1097–1154, 26 maio 2023.

WALKER, J. M. The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. Em: **Basic Protein and Peptide Protocols**. New Jersey: Humana Press, [s.d.]. p. 5–8.

WANG, Y. et al. Pathway-Dependent Inhibition of Paclitaxel Hydroxylation by Kinase Inhibitors and Assessment of Drug–Drug Interaction Potentials. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 42, n. 4, p. 782–795, abr. 2014.

WONG, S. H. M. et al. The TRAIL to cancer therapy: Hindrances and potential solutions. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 143, p. 81–94, nov. 2019.

WU, H.; MEDEIROS, L. J.; YOUNG, K. H. Apoptosis signaling and BCL-2 pathways provide opportunities for novel targeted therapeutic strategies in hematologic malignances. **Blood Reviews**, v. 32, n. 1, p. 8–28, jan. 2018.

WU, S. Y. et al. Central Nervous System Prophylaxis and Treatment in Acute Leukemias. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 23, n. 12, p. 1829–1844, 13 dez. 2022.

XIA, L. et al. Role of the NF $\kappa$ B-signaling pathway in cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 11, p. 2063–2073, abr. 2018.

XIA, Y.; SHEN, S.; VERMA, I. M. NF- $\kappa$ B, an Active Player in Human Cancers. **Cancer Immunology Research**, v. 2, n. 9, p. 823–830, 1 set. 2014.

YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R. B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 2, p. 135–142, 15 jan. 2001.

YOUSEFSANI, B. SADAT; AKBARIZADEH, N.; POURAHMAD, J. The antioxidant and neuroprotective effects of Zolpidem on acrylamide-induced neurotoxicity using Wistar rat primary neuronal cortical culture. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 233–240, 2020.

YU, H. et al. Targeting NF- $\kappa$ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 209, 21 set. 2020.

ZEIDAN, A. M. et al. Patterns of care and clinical outcomes with cytarabine-anthracycline induction chemotherapy for AML patients in the United States. **Blood Advances**, v. 4, n. 8, p. 1615–1623, 28 abr. 2020.

ZHANG, M. et al. CDK inhibitors in cancer therapy, an overview of recent development. **American journal of cancer research**, v. 11, n. 5, p. 1913–1935, 2021.

ZHOU, J.; CHING, Y. Q.; CHNG, W.-J. Aberrant nuclear factor-kappa B activity in acute myeloid Leukemia: from molecular pathogenesis to therapeutic target. **Oncotarget**, v. 6, n. 8, p. 5490–5500, 20 mar. 2015.

ZHU, G.-H. et al. Curcumin induces apoptosis and suppresses invasion through MAPK and MMP signaling in human monocytic leukemia SHI-1 cells. **Pharmaceutical Biology**, p. 1–9, jul. 2015.

ZINATIZADEH, M. R. et al. The Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling in cancer development and immune diseases. **Genes & Diseases**, v. 8, n. 3, p. 287–297, maio 2021.

## ANEXO A – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE APRECIÇÃO ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



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 integra 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

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 composto in vitro e sua aprovação para ensaios clínicos. No entanto, a proposta da presente pesquisa de investigar o efeito de novo 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 Profª. Drª. 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

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

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

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

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

FLORIANOPOLIS, 22 de Agosto de 2018

---

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

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