

Álison Bigolin

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE MORTE CELULAR
INDUZIDO POR COMPOSTOS EM CÉLULAS DE LINHAGENS
DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Farmácia na Área de Concentração de Análises Clínicas.

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

Co-orientadora: Dra. Lorena Santos Bubniak

Florianópolis
2016

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

Bigolin, Állisson

Investigação do mecanismo de morte celular induzido por compostos em células de linhagens de neoplasias hematológicas / Állisson Bigolin ; orientadora, Maria Claudia Santos da Silva ; coorientadora, Lorena Santos Bubniak. - Florianópolis, SC, 2016.
148 p.

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. citotoxicidade. 3. apoptose. 4. neoplasias hematológicas. I. Santos da Silva, Maria Claudia. II. Santos Bubniak, Lorena. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Dedico este trabalho à minha mãe,
Marisete, por me mostrar que a
dificuldade dos obstáculos depende
da perspectiva de quem os enfrenta.

AGREDECIMENTOS

Escrever essa seção do trabalho talvez tenha sido uma das mais complicadas e por isso a última a ser escrita, pois posso estar cometendo alguma falha ao esquecer de mencionar pessoas que estão indiretamente relacionadas ao desenvolvimento do estudo.

Assim, agradeço aos meus pais, **Clarival** e **Marisete**, por compreenderem o motivo de minha ausência em alguns momentos importantes de nossa família e ainda por todo o estímulo, apoio e amor dedicados a mim sempre que precisei. À minha irmã, **Liandra**, por me fazer sorrir com sua alegria contagiante, por garantir que a conexão afetiva de nossa família se mantenha, mesmo com muitos quilômetros de distância e por ser a pessoa com quem sempre posso contar.

À minha família, em especial a minha avó **Celita** e minha madrinha **Suzimara**, que estão sempre torcendo pelo meu sucesso, que me estimulam a continuar e que me aconselham nos momentos de decisão.

Ao **Rafa**, pela parceria, pelos momentos compartilhados, pela paciência em me ouvir diversas vezes e por dar suporte nas situações necessárias. Aos meus amigos, **Naia** e **Fer**, que chamo de segunda família, pela companhia em diferentes programas, por dialogarem e filosofarem comigo sobre os mais variados temas e pelo carinho constante que sinto vir de vocês. E a **Mari**, que além de ter feito o elo dessa segunda família, é a “irmã” que conheci depois de 22 anos, aquela pessoa com a qual você nem precisa mais trocar palavras, apenas olhares e fica tudo compreendido, além da cumplicidade em incontáveis situações. Sou muito feliz por vocês fazerem parte das “minhas pessoas” e espero que sintam o quanto eu amo vocês.

À minha orientadora, Professora Dr^a. **Maria Claudia Santos da Silva**, pelos vários conselhos e pelo incentivo durante todo o trabalho, pelos ensinamentos que me transmitiu ao longo dos anos, por compreender e acreditar na minha capacidade de conseguir conciliar várias atividades diárias e ainda desenvolver esse trabalho. Assim como eu sinto, espero que tenha ficado o sentimento de uma parceria saudável, com a execução de um bom trabalho e de troca de experiências diante diferentes perspectivas.

À minha co-orientadora, Dr^a. **Lorena Santos Bubniak**, pela contribuição na construção desse trabalho, por meio dos diálogos, do compartilhamento de conhecimento e das sugestões durante todas as fases do estudo.

À Professora Dr^a **Maria Luiza Bazzo**, que me aceitou para compor seu grupo de pesquisa e trabalho, em paralelo ao desenvolvimento desse estudo e por sua capacidade de descobrir o potencial de cada pessoa que faz parte do seu grupo, assim flexibilizar o modo de trabalho e ao mesmo tempo obter bons resultados. Além disso, sou grato pelas várias conversas de assuntos não científicos, pelos conselhos e dicas, por compartilhar suas experiências de vida e por proporcionar a minha formação profissional completa, com diferentes vivências e pontos de vista.

A todos os amigos e colegas do **Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias** e do **Laboratório de Biologia Molecular, Sorologia e Micobactérias**, pela convivência, pelas risadas e pela troca de conhecimento. O companheirismo e apoio de vocês torna o ambiente de trabalho/estudo prazeroso. Obrigado de coração por fazerem parte da minha rotina diária!

Ao Prof. Dr. **Rosendo Augusto Yunes**, ao Prof. Dr. **Ricardo José Nunes**, a Prof. Dr^a. **Louise Domeneghini Chiaradia Delatorre**, a Dr^a. **Alessandra Mascarello**, Dr^a. **Patrícia Devantier Neuenfeldt**, a Prof. Dr^a **Miriam de Barcellos Falkenberg**, a doutoranda **Gabriele Andressa Zatelli**, a mestre **Ana Claudia Philippus** e a Dr^a **Anamika Dhyani** que aceitaram colaborar com esse trabalho, em realizar uma parceria e pela disponibilidade de sempre.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, por permitirem e subsidiarem a realização deste trabalho.

A construção de todo esse trabalho só foi possível com a contribuição direta ou indiretamente de cada um de vocês. Dessa forma, gostaria que compartilhassem comigo o sentimento de realização de uma meta e dever cumprido. Muito Obrigado!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota”.*

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

As neoplasias hematológicas, que incluem as leucemias agudas e o mieloma múltiplo compreendem um grupo heterogêneo de doenças originadas a partir da proliferação anormal e descontrolada de uma célula clonal neoplásica de origem hematopoiética. Não é incomum a observação de células neoplásicas que desenvolvem resistência aos fármacos utilizados e pacientes que apresentam morbidade associada ao uso de quimioterápicos. Dessa forma, há necessidade de se investigar novas estruturas para o desenvolvimento de fármacos que tenham maior eficiência em induzir morte apenas nas células tumorais, que sejam de fácil administração, que não causem resistência e com poucos ou insignificantes efeitos adversos. Duas classes de compostos, as sulfonamidas e as quinonas, são bastante relatadas na literatura com atividade citotóxica. Nessa perspectiva, este estudo objetivou investigar o efeito citotóxico de um grupo de sulfonamidas e de uma quinona (**GE2**, primina) sobre linhagens celulares de neoplasias hematológicas. Entre as 26 sulfonamidas avaliadas, pelo método do MTT, o composto **DFS16** (*N*-(3,3-difenilpropil)-2,4-dinitrobenzenosulfonamida) foi o selecionado para os ensaios posteriores, por apresentar maior atividade citotóxica sobre as três linhagens celulares utilizadas nesse trabalho (K562, Jurkat e MM.1S). Os resultados desse estudo permitem sugerir que a sulfonamida **DFS16** possui atividade citotóxica sobre células K562 e Jurkat pela indução de apoptose (observada na microscopia com brometo de etídio e laranja de acridina, fragmentação de DNA e marcação com Anexina V) por meio da ativação das vias intrínseca e extrínseca, além do envolvimento de alterações do potencial de membrana mitocondrial. A ativação da via intrínseca nessas células parece estar relacionada com a diminuição da expressão da proteína Bcl-2 e aumento da expressão da proteína Bax. Além disso, a diminuição da expressão da proteína de proliferação celular Ki-67 e o aumento da expressão do fator indutor de apoptose, observados por citometria de fluxo, demonstram possível relação com o mecanismo de morte induzido pelo tratamento com **DFS16** nas células Jurkat. A apoptose induzida pela sulfonamida **DFS16** nas células MM.1S sugere que a ativação ocorre por uma via diferente daquelas investigadas nesse trabalho, sem relação com a sinalização de caspases e com o envolvimento do bloqueio na progressão do ciclo celular na fase G2/M. Os resultados encontrados para a quinona **GE2** indicam que a apoptose possivelmente é ativada pelas vias intrínseca e extrínseca

nas células K562, Jurkat e MM.1S, com diminuição do potencial mitocondrial, além de diminuição da expressão da proteína Ki-67. Assim como, a quinona **GE2** apresentou excelente seletividade para as células neoplásicas quando comparado com o tratamento em células não neoplásicas. O conjunto de resultados sugere que os compostos **DFS16** e **GE2** são promissores protótipos para o estudo e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de neoplasias hematológicas.

Palavras-chave: Neoplasias hematológicas. Citotoxicidade. Apoptose. Sulfonamidas. Quinonas.

ABSTRACT

TITLE: INVESTIGATION OF DEATH CELL MECHANISM INDUCED BY COMPOUNDS IN NEOPLASMS HEMATOLOGIC CELL LINES

Hematological malignancies, including acute leukemias and multiple myeloma, comprise a heterogeneous group of diseases originated from an abnormal and uncontrolled proliferation of neoplastic clonal cells of hematopoietic origin. It is not uncommon to observe neoplastic cells that develop resistance to the used drugs, as well as patients with morbidity associated to chemotherapy. Thus, it is necessary to investigate new structures for the development of drugs that present higher efficiency and specificity in inducing tumor cells death, that are easy to administer, that do not cause resistance and that have little or negligible adverse effects. Two classes of compounds, sulfonamides and quinones, were reported in the literature with a wide range of pharmacological properties and among them, the antitumor activity. In this perspective, this study aimed to investigate the cytotoxic effect of a group of sulfonamides and a quinone (**GE2**, primina) on hematological malignancies cell lines. Among the 26 sulfonamides evaluated, by MTT method, the compound **DFS16** (*N*-(3,3-diphenylpropyl)-2,4-dinitrobenzenesulfonamide) was selected for the further tests due to its higher cytotoxic activity against the three cell lines that were analyzed in this study (K562, Jurkat and MM.1S). The results suggest that sulfonamide **DFS16** has cytotoxic activity against K562 and Jurkat cells by apoptosis induction (observed in ethidium bromide and acridine orange microscopy, DNA fragmentation and labeling with Annexin V) by the intrinsic and the extrinsic pathways, involving also the mitochondrial membrane potential. The activation of the intrinsic pathway in these cells appears to be related by decreased Bcl-2 expression and increased Bax expression. Furthermore, the decreased expression of the cellular proliferation protein Ki-67 and the increased expression of apoptosis-inducing factor, observed by flow cytometry, also appear to be related to the death mechanism induced by **DFS16** in Jurkat cells. Apoptosis induced by sulfonamide **DFS16** in MM.1S cells appear to be activated by a different pathway from those investigated in this work, i.e. no relation with caspase signaling and blocking the cell cycle progression at G2/M phase. The quinone **GE2** appears to induce apoptosis by activation of the intrinsic and the extrinsic pathways in K562, Jurkat and MM.1S cell lines, and by decreasing the expression of Ki-67 protein. The results suggest that the compounds **DFS16** and **GE2** are promising

molecules for the use in hematological malignancies therapy or as prototypes for the development of new chemotherapies.

Keywords: Hematological malignancies. Cytotoxicity. Apoptosis. Sulfonamides. Quinones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Conduta de tratamento em paciente com câncer	37
Figura 2 - Tipos de tratamento conforme as principais características biológicas da doença	43
Figura 3 - Sinalização intracelular da apoptose.....	47
Figura 4 - Ciclo celular e seus mecanismos de regulação	48
Figura 5 - Estrutura molecular da primina.	51
Figura 6 – Estrutura química do fármaco amsacrina	52
Figura 7 - Delineamento do estudo (Continua)	55
Figura 8 - Efeito citotóxico dos derivados sulfonamídicos sobre células de linhagem de LMA - K562 (Triagem inicial)	74
Figura 9 - Efeito citotóxico dos derivados sulfonamídicos sobre células da linhagem de LLA – Jurkat (Triagem inicial).....	75
Figura 10- Efeito citotóxico dos derivados sulfonamídicos sobre células de linhagem de mieloma múltiplo - MM.1S (Triagem inicial)	76
Figura 11- Curvas concentração-resposta dos derivados sulfonamídicos DFS8, DFS12, DFS15, DFS16 e Gli5 frente as diferentes linhagens de neoplasias hematológicas	77
Figura 12 - Curvas concentração e tempo-resposta da sulfonamida DFS16	80
Figura 13 - Curvas concentração e tempo-resposta da quinona GE2....	81
Figura 14 - Expressão da proteína Ki-67 nas linhagens celulares tratadas com a sulfonamida DFS16 ou a quinona GE2	86
Figura 15 - Avaliação morfológica da apoptose induzida pela sulfonamida DFS16 e pela quinona GE2 em células K562, Jurkat e MM.1S	87
Figura 16 - Efeito da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 na exposição dos resíduos de fosfatidilserina das três linhagens celulares pelo método da Anexina V conjugada a FITC	88
Figura 17 - Avaliação da indução da fragmentação do DNA das células K562, Jurkat e MM.1S após tratamento com a sulfonamida DFS16 e com a quinona GE2.....	89
Figura 18- Efeito da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 no potencial mitocondrial das células K562, Jurkat e MM.1S	90
Figura 19 - Expressão da proteína antiapoptótica survivina nas células K562, Jurkat e MM.1s após o tratamento com a sulfonamida DFS16 ou quinona GE2.....	91
Figura 20 - Efeito da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 na expressão das proteínas Bcl-2 (Painel A) e Bax (Painel B) em células K562, Jurkat e MM.1S.....	92

Figura 21 - Efeito da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 na expressão da proteína FasR em células K562, Jurkat e MM.1S	93
Figura 22 - Efeito da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 na expressão da proteína AIF em células K562, Jurkat e MM.1S.....	94
Figura 23 - Efeito da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 na expressão da proteína caspase-3 em células K562, Jurkat e MM.1S.....	95
Figura 24 - Efeito citotóxico da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 sobre uma linhagem celular de fibroblastos murinos (L-929)	96
Figura 25 - Efeito citotóxico da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 sobre células mononucleadas de indivíduos saudáveis.	99
Figura 26 - Efeito hemolítico da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2	100

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Rota de síntese da Série Gli.....	61
Esquema 2 - Rota de síntese da Série DFS	62

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo do índice de seletividade.....	65
Equação 2 - Cálculo da taxa de hemólise.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores de CI_{50} obtidos para as células K562, Jurkat e MM.1S após 24 horas de incubação com as sulfonamidas DFS 8, DFS 12, DFS 15, DFS 16 e Gli5.....	78
Tabela 2- Valores de CI_{50} da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 em 24 horas, 48 horas e 72 horas sobre as linhagens K562, Jurkat e MM.1S	82
Tabela 3 - Efeito da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 nas fases do ciclo celular das linhagens de neoplasias hematológicas	84
Tabela 4- Efeito da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 nas fases do ciclo celular das linhagens de neoplasias hematológicas, desconsiderando células na fase sub G0/G1	85
Tabela 5 - Razão entre a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e a proteína pró-apoptótica Bax	93
Tabela 6 - Valores de CI_{50} da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 em 24, 48 e 72 horas sobre a linhagem celular de fibroblastos murinos (L-929)	97
Tabela 7 - Índice de Seletividade da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2	98
Tabela 8 - Sumário de Resultados.....	101

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIF	Fator indutor de apoptose
ANOVA	Análise de variâncias
APAF	<i>Apoptotic protease activating factor</i> – fator ativador da apoptose
Apo	<i>Apoptosis antigen-1</i> – antígeno 1 da apoptose
ATP	Adenosina trifosfato
Bax	<i>Bcl-2-associated protein x</i> – proteína X associada a Bcl-2
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma protein-2</i> – proteína 2 do linfoma de células B
BE/LA	Brometo de etídio/Laranja de acridina
BH	<i>Bcl-2 Homology</i> – proteína homóloga a Bcl-2
Bid	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i> – agonista de morte que interage com o domínio BH3
Caspase	Cysteine-Dependent Aspartate-Specific Proteases – proteases aspartato específicas dependentes de cisteína
CD	<i>Cluster Differentiation</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinases</i> – cinases dependentes de ciclinas
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CI₅₀	Concentração inibitória 50 %
CKI	<i>CDK inhibitors</i> - inibidores de CDK
CTD	Ciclofosfamida, talidomida e dexametasona
DAPK	<i>Death-associated protein kinase</i> – proteína cinase associada a morte
DCM	Diclorometano
DD	<i>Death Domain</i> - domínio de Morte
DIABLO/Smac	<i>Direct IAP binding protein with low pI/ second mitochondria-derived activator of caspases</i> - proteína de ligação direta à IAP com baixo PI/Segundo ativador mitocondrial de caspase
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i> - complexo sinalizador indutor de apoptose
DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido

DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxiribonuclease
DO	Densidade Óptica
DR	<i>Death Receptor</i> – receptor de Morte
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EM	Espectrometria de massa
EPM	Erro padrão da média
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i> – proteína de domínio de morte associada a Fas
FasR	Receptor Fas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Hibridização <i>in situ</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Forward Scatter – padrão de dispersão frontal
G0	<i>Gap 0</i> – intervalo 0
G1	<i>Gap 1</i> – intervalo 1
G2	<i>Gap 2</i> – intervalo 2
GC	Glicocorticoide
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	Ácido <i>N</i> -(2-hidroxietil)piperazina- <i>N'</i> -2-etanossulfónico
IAP	Proteína inibidora da apoptose
IFM	Imunofluorescência Média
IS	Índice de seletividade
IV	Infravermelho
LA	Leucemia aguda
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
M	Mitose
MM	Mieloma múltiplo
MO	MO
MPT	Melfalano, prednisona e talidomida
MPV	Melfalano, prednisona e bortezomibe

MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
NF-κB	<i>Factor nuclear kappa B</i> – fator nuclear kappa B
NK	<i>Natural killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i> - poli(ADP-ribose)polimerase
PBS	Solução tampão de fosfato
PE	Ficoeritrina
PI	Iodeto de propídio
RC	Remissão completa
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Ribonuclease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RS	Rio Grande do Sul
S	Síntese
SBF	Soro bovino fetal
SNC	Sistema nervoso central
SP	Sangue periférico
SSC	<i>Side Scatter</i> – padrão de dispersão lateral
TCHT aut	Transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogo
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCTA	Transplante de células-tronco autólogo
TNF	<i>Tumoral Necrosis Factor</i> – fator de necrose tumoral
TRADD	<i>TNFR-associated death domain protein</i> - proteína de domínio de morte associada a receptor de TNF
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i> – ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UV	Ultravioleta
VAD	Vincristina, doxorrubicina e dexametasona

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	31
2. REVISÃO DA LITERATURA	35
2.1. NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS	35
2.1.1. Leucemias Agudas (LA)	35
2.1.2. Mieloma Múltiplo (MM)	39
2.2. MORTE CELULAR E ALVOS TERAPÊUTICOS	41
2.2.1. Apoptose	44
2.2.2. Ciclo Celular	48
2.3. NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS	49
2.3.1. Quinonas	50
2.3.2. Sulfonamidas	51
3. OBJETIVOS	53
3.1. OBJETIVO GERAL	53
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4. MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1. CULTIVO DE LINHAGENS CELULARES IMORTALIZADAS	57
4.2. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEADAS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS	59
4.3. OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS E TRATAMENTO DAS CÉLULAS	59
4.3.1. Compostos sintéticos: Sulfonamidas	60
4.3.2. Composto Natural: Primina	63
4.3.3. Tratamento das células em cultura	63
4.4. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR E DETERMINAÇÕES DAS CURVAS DE CONCENTRAÇÃO E TEMPO-RESPOSTA (MÉTODO MTT)	64
4.5. ÍNDICE DE SELETIVIDADE	65
4.6. IDENTIFICAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR	66
4.6.1. Alterações morfológicas observadas na morte celular	66
4.6.2. Fragmentação de DNA em gel de agarose	67
4.6.3. Expressão dos resíduos de fosfatidilserina	67
4.7. INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO CICLO CELULAR COM A MORTE CELULAR	68
4.8. AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL NO MECANISMO DE MORTE CELULAR	69
4.9. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS COM A MORTE CELULAR	69
4.10. TESTE DE HEMÓLISE	71
4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	72

5. RESULTADOS	73
5.1. EFEITO CITOTÓXICO DE SULFONAMIDAS SINTÉTICAS SOBRE LINHAGENS CELULARES DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS	73
5.2. EFEITO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 SOBRE AS FASES DO CICLO CELULAR DAS LINHAGENS DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS	82
5.3. EFEITO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 SOBRE A PROTEÍNA KI-67	85
5.4. EFEITO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 NA INDUÇÃO DA APOPTOSE EM LINHAGENS CELULARES DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS	86
5.5. INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 SOBRE O POTENCIAL MITOCONDRIAL DAS CÉLULAS K562, JURKAT E MM.1S	89
5.6. EFEITO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 SOBRE A PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA SURVIVINA	90
5.7. INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 SOBRE A PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA BCL-2 E SOBRE A PROTEÍNA PRÓ-APOPTÓTICA BAX	91
5.8. EFEITO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 SOBRE O RECEPTOR FAS	93
5.9. EFEITO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 SOBRE O FATOR INDUTOR DE APOPTOSE (AIF)	94
5.10. EFEITO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 SOBRE A CASPASE-3	94
5.11. EFEITO CITOTÓXICO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 SOBRE UMA LINHAGEM CELULAR DE FIBROBLASTOS MURINOS	95
5.12. AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE CELULAR DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2	97
5.13. EFEITO CITOTÓXICO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS	98
5.14. AVALIAÇÃO DO EFEITO HEMOLÍTICO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2	99
5.15. SÚMARIO DE RESULTADOS	100
6. DISCUSSÃO	102
7. CONCLUSÃO	115
REFERÊNCIAS	119
APÊNDICES	141

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença mortal na maioria dos casos, principalmente quando não tratado, e desponta como uma das principais causas de mortalidade no mundo (SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A., 2015). É caracterizado pelo desequilíbrio na homeostase de populações celulares com capacidade de autorrenovação, o que resulta em proliferação descontrolada de células tumorais e capacidade de invadir e de se multiplicar em múltiplos microambientes (BERRIDGE; HERST; TAN, 2010; SIVEEN et al., 2014). Está bem estabelecido que a herança de genes mutantes e mutações somáticas derivadas da exposição a agentes carcinogênicos (em cerca de 80% dos casos) desempenham importantes papéis no desenvolvimento da malignidade (SIVEEN et al., 2014).

A denominação câncer é utilizada para um vasto número de neoplasias malignas, que podem ser categorizadas em dois principais grupos: neoplasias sólidas (tumores malignos sólidos) e neoplasias hematológicas. Os tumores malignos sólidos são caracterizados pela formação de massas celulares neoplásicas em tecidos previamente íntegros, os quais são classificados em carcinomas, quando acometem tecidos de revestimento e glandular (representam cerca de 80% de todas as neoplasias sólidas); ou sarcomas, que são tumores formados em tecidos conectivos como músculos, ossos e gordura. Já as neoplasias originadas na MO (MO) e sistema linfático, relacionadas à uma desregulação da hematopoiese normal, são denominadas de neoplasias hematológicas. Integrando esse grupo de neoplasias de células hematopoiéticas encontram-se as leucemias e o mieloma múltiplo (MM), cada um desses com suas subclassificações e diferenças na caracterização da doença (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015).

De acordo com os dados do GLOBOCAN 2012, o câncer foi responsável por mais de oito milhões de óbitos em 2012. Mais de 60% do total de casos novos anuais do mundo ocorrem na África, Ásia e Américas Central e do Sul, e estes continentes são responsáveis por 70% das mortes por neoplasias no mundo (FERLAY et al., 2015). As estimativas para 2030 indicam 21,4 milhões de casos novos e 13,2 milhões de mortes por câncer no mundo, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução da mortalidade infantil e das mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (FERLAY et al., 2015). A leucemia é a sexta principal causa, entre os demais tipos de neoplasias, que resulta em morte nos Estados Unidos da América (SIEGEL, REBECCA L; MILLER, KIMBERLY D; JEMAL, AHMEDIN, 2015).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2016, também válidas para o ano de 2017, indicam a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer, dentre eles 10.070 novos casos de leucemias, sendo 5.540 em homens e em 4.530 mulheres (INCA, 2015).

Nesse contexto, sabe-se que a prevenção e o controle das neoplasias exigem medidas complexas, multidisciplinares e multifatoriais, enquanto que o diagnóstico e o tratamento requerem elevados recursos financeiros. Tendo em vista que no Brasil cerca de 80% do sistema de saúde, inclusive a assistência oncológica, é financiada por recursos públicos, o câncer tem se consolidado como um importante problema de saúde pública (GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005).

Considerando a incidência previamente citada de leucemias e de mieloma múltiplo, os altos custos com o tratamento dos pacientes, a resistência aos fármacos existentes e a morbidade associada aos quimioterápicos disponíveis atualmente, pode-se constatar que há necessidade de se investigar novos alvos terapêuticos para desenvolver novos fármacos que tenham maior eficiência em induzir morte apenas nas células tumorais, que sejam de fácil administração, que não causem resistência e com poucos ou insignificantes efeitos adversos.

Sabe-se que desde os tempos antigos, os produtos naturais têm desempenhado um papel notável em todo o mundo no tratamento e prevenção de doenças humanas. Uma classe de compostos fenólicos de origem natural, as quinonas, possui uma vasta gama de propriedades farmacológicas, dentre elas a atividade antitumoral (EFFERTH et al., 1996; SILVA, M. N. D.; FERREIRA; SOUZA, 2003). Embora os produtos naturais compreendam uma importante fonte de moléculas biologicamente ativas, a obtenção de bons rendimentos de substâncias isoladas para utilização comercial ainda é difícil. Por essa razão, a síntese de novas moléculas utilizando recursos da química medicinal também é de grande importância no desenvolvimento de novos compostos bioativos. Neste contexto destaca-se o exemplo das sulfonamidas, que são compostos sintéticos utilizados desde 1930 como antibióticos, e que recentemente tiveram sua potencial atividade antiproliferativa demonstrada (SUPURAN, C. T.; CONROY; MAREN, 1996; SUPURAN, C T et al., 2001; CASINI et al., 2002; SCOZZAFAVA et al., 2003; SUPURAN, C. T.; CASINI; SCOZZAFAVA, 2003; PARASCA et al., 2013).

Dessa forma, como estudos em química medicinal e em atividade citotóxica apontam ampla aplicabilidade das quinonas e das sulfonamidas contra células tumorais, com este trabalho pretende-se investigar novos compostos pertencentes a essas classes químicas, os quais possam servir

de estratégia para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das neoplasias hematológicas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Essa revisão da literatura abordará temas como neoplasias hematológicas (leucemias agudas (LA) e MM), informações sobre os tratamentos utilizados atualmente para essas doenças, descrição de tipos de morte celular e seus mecanismos; e informações sobre compostos sintéticos (sulfonamidas) e naturais (primina) como alternativa terapêutica às doenças previamente citadas.

2.1. NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

As neoplasias originadas na MO são denominadas de leucemias; no sistema linfático/imunológico de linfomas; porém, o MM também se origina na MO; e todas podem se disseminar para o sangue periférico (SP) e demais tecidos (SWERDOLW et al., 2008).

2.1.1. Leucemias Agudas (LA)

As leucemias são classificadas de acordo com a linhagem celular acometida e o grau de maturação das células. Assim, quanto à linhagem celular, podem ser agrupadas em leucemias mieloide ou linfoides. As primeiras ocorrem quando o clone leucêmico tem origem em células comprometidas com a linhagem mieloide, as quais, normalmente, dariam origem aos granulócitos, monócitos, eritrócitos e plaquetas. As leucemias linfoides, por sua vez, se originam de células clonais comprometidas com a linhagem linfóide e que, em situações normais, se diferenciariam em células linfóides B, T e células *Natural Killers* (NK). Quanto ao grau de maturação, há as LA caracterizadas pela proliferação clonal acompanhada de bloqueio maturativo e as leucemias crônicas evidenciadas pela expansão clonal de células maduras e não funcionais (SWERDOLW et al., 2008; ALBAKR; KHOJAH, 2014).

As LA são neoplasias malignas do sistema hematopoiético, caracterizadas pela parada da diferenciação hematopoiética normal e pela proliferação clonal de uma única célula indiferenciada anormal, o que resulta no acúmulo de células imaturas na MO e/ou no SP (BAIN, 2007; PUI, 2009; VARDIMAN, 2010).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2008, propôs critérios para o diagnóstico de neoplasias do sistema hematopoiético e linfóide. Esses critérios basearam-se nas características morfológicas, citoquímicas, imunofenotípicas e genéticas das células neoplásicas. Assim, as LAs foram divididas em leucemia mieloide aguda (LMA),

leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia aguda de linhagem ambígua (LALA). As LMA foram subdivididas em sete subcategorias (SWERDOLW et al., 2008):

- i. LMA associada a anormalidades genéticas recorrentes;
- ii. LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia;
- iii. Neoplasias mieloides associadas ao tratamento;
- iv. LMA não categorizada nos itens anteriores;
- v. Sarcoma mieloide;
- vi. Proliferação mieloide relacionada com síndrome de Down;
- vii. Neoplasia de células blásticas dendríticas plasmocitóides.

As LLAs foram subdivididas em três subcategorias (SWERDOLW et al., 2008):

- i. Leucemia/linfoma linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes;
- ii. Leucemia/linfoma linfoblástico B não categorizada nos itens anteriores;
- iii. Leucemia/linfoma linfoblástico T.

Como visto, as LAs constituem um grupo heterogêneo de doenças, e, por isso diferem quanto ao prognóstico e resposta ao tratamento.

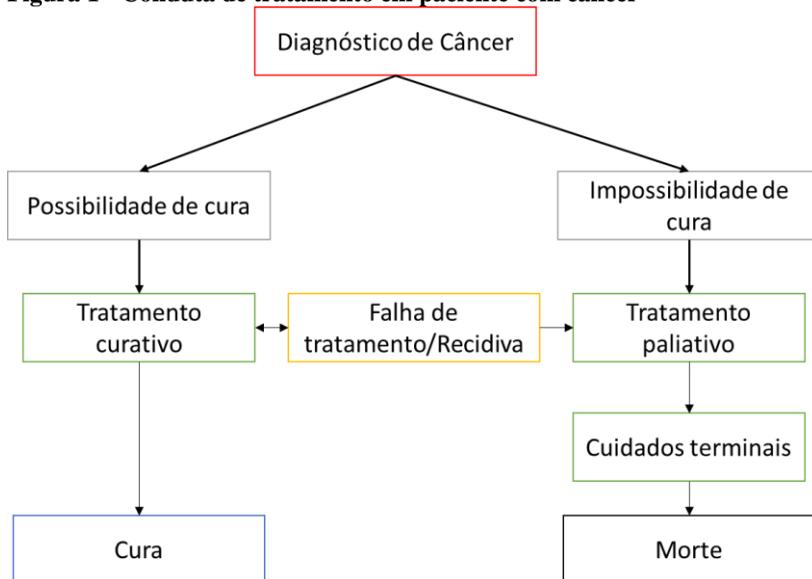
O objetivo no tratamento do câncer é a erradicação das células neoplásicas da doença; no entanto, quando esse não é alcançado, o foco do tratamento passa a ser paliativo, para diminuir os sintomas, evitar as sequelas e melhorar a qualidade de vida do paciente (Figura 1) (KLAustersky et al., 2016).

Para o tratamento curativo das neoplasias malignas existem quatro abordagens: excisão cirúrgica (não aplicável para neoplasias hematológicas), quimioterapia, imunoterapia e radioterapia. Normalmente utiliza-se terapia combinada, onde são associados mais de um tipo de tratamento com o objetivo de aumentar as chances de erradicação das células neoplásicas. A escolha dessas combinações de tratamento, bem como ajustes de cada método, variam de acordo com o tipo de câncer, estágio da doença e prognóstico (ALMEIDA et al., 2005).

Por não se conhecer a causa das leucemias, o tratamento almeja destruir todas as células leucêmicas e permitir que a MO normal se regenere e volte a produzir células normais. Após anos de estudo, verificou-se a possibilidade de cura total da leucemia por meio da associação de medicamentos administrados por via sistêmica (poliquimioterapia), controle de possíveis complicações infecciosas e hemorrágicas e prevenção da disseminação da doença ao sistema nervoso

central (SNC: cérebro e medula espinhal) (ROSE-INMAN; KUEHL, 2014; SAULTZ; GARZON, 2016).

Figura 1 - Conduta de tratamento em paciente com câncer



Fonte: Adaptado de (KLAJSTERSKY et al., 2016)

O tratamento da LMA é dividido em duas fases: indução da remissão (para atingir remissão) e pós-remissão (para manter a remissão). Em uma avaliação inicial é determinado se o paciente é elegível para a quimioterapia de indução intensiva, pela infusão contínua de citarabina com uma antraciclina (mitoxantrona ou daunorrubicina). O primeiro fármaco (citarabina ou citosina arabinosídeo) é um antimetabólico análogo da citidina com uma molécula de açúcar modificada (arabinose ao invés de ribose), que ao sofrer as mesmas reações de fosforilação dos nucleosídeos naturais na célula alvo, é convertido a sua forma trifosfato, competindo com citidina para incorporação no DNA. Uma vez incorporada, o açúcar arabinose impede estereoquimicamente a rotação da molécula de DNA, impedindo a replicação do material genético, especificamente durante a fase S do ciclo celular. Esse agente também inibe a DNA polimerase, resultando numa diminuição na replicação e reparação do DNA. Enquanto que as antraciclinas inibem a síntese e reparo do DNA e a transcrição de RNA em proteínas pela interação mediada pela topoisomerase com o DNA. Após alcançada a remissão

completa, estratégias pós-remissão padrões incluem quimioterapia intensiva convencional, bem como o transplante autólogo ou alogênico de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) (DÖHNER; WEISDORF; BLOOMFIELD, 2015; SAULTZ; GARZON, 2016).

Mesmo que a estratégia terapêutica em pacientes com LMA não tenha sido alterada substancialmente em mais de 30 anos, os pequenos avanços no tratamento tem resultado na melhora substancial das taxas de remissão completa (RC). Com tratamento intenso na fase de indução, aproximadamente 60 a 70 % dos pacientes adultos com LMA conseguem alcançar a RC. No entanto, apenas 45% dos pacientes que atingem a RC conseguem alcançar a cura ou desfrutam de uma sobrevida de 3 anos ou mais. Além disso, a duração da remissão diminui quanto maior a idade do paciente ou quando esse possui fatores de prognósticos desfavoráveis, como: infecção sistêmica no momento do diagnóstico, LMA secundária à tratamento e histórico de síndrome mielodisplásica ou outra neoplasia hematológica (DÖHNER et al., 2015; RAMOS et al., 2015; KADIA et al., 2016; SAULTZ; GARZON, 2016).

O tratamento de pacientes portadores de LLA é dividido em regimes classificados de acordo com o subtipo da LLA diagnosticada, e a maioria desses protocolos de tratamento demoram de dois a três anos para serem concluídos. Em linhas gerais, o tratamento apropriado consiste em um esquema que inclui uma combinação entre vincristina, prednisona e uma antraciclina, no entanto, alguns protocolos incluem ciclofosfamida e asparaginase.

A vincristina, alcaloide natural isolado da planta *Catharanthus roseus*, se liga irreversivelmente aos microtúbulos, interferindo na formação do fuso mitótico, provocando um bloqueio na divisão das células tumorais em metáfase. A prednisona exerce papel imunomodulador: após ligar-se ao receptor da superfície celular, entra na célula, migra para o núcleo, onde se liga aos receptores nucleares específicos, ativando-os, o que resulta em uma expressão gênica alterada e inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, esse agente medicamentoso também diminui o número de linfócitos em circulação, induz a diferenciação celular, e estimula a apoptose em células de tumores sensibilizadas. Assim como a prednisona, a ciclofosfamida age como um agente imunossupressor e antineoplásico, por meio de seus metabólitos ativos que se ligam ao DNA, inibindo a replicação do mesmo e iniciando a morte celular. A asparaginase hidrolisa a L-asparagina à ácido L-aspartico e amônia nas células leucêmicas, o que resulta na depleção de asparagina (aminoácido essencial em células leucêmicas), provocando assim inibição da síntese proteica, interrupção do ciclo

celular na fase G1 e apoptose. Além disso, o mesilato de imatinibe é muitas vezes incorporado no plano terapêutico para pacientes com LLA cromossomo Filadélfia positivo, pois o medicamento inibe a proteína tirosina cinase BCR-ABL, evitando a proliferação celular (PUI ; EVANS 2006; PUI, 2009; BASSAN; HOELZER, 2011).

Apesar da importante inovação tecnológica na área laboratorial para diagnóstico de LAs, o tratamento não é totalmente eficaz, pois em muitos casos os pacientes são refratários ao tratamento e vão a óbito rapidamente ou desenvolvem resistência aos fármacos utilizados e a doença recidiva logo após a fase inicial de indução de quimioterapia. Além disso, a morbidade associada ao tratamento quimioterápico ainda é um obstáculo a ser vencido (VASEKAR et al., 2015).

2.1.2. Mieloma Múltiplo (MM)

O MM, outra neoplasia hematológica, é uma neoplasia de células B clonais malignas na MO (NERI; BAHLIS, 2012). Na maioria dos casos, essas células plasmocitárias produzem uma imunoglobulina monoclonal (proteína M) em excesso, que pode ser observada no plasma e na urina (SLOVAK, 2011). Essa imunoglobulina monoclonal pode ser da classe IgG em cerca de 52 % dos casos, IgA em 20 %, IgD, IgM, IgE ou biclonais em menos de 10 %, e, em 15 % dos casos é produzida somente a cadeia leve da proteína, que pode ser *kappa* ou *lambda*. Em aproximadamente 3 % dos casos de MM não há produção de imunoglobulinas, e por isso, são denominados de MM não secretor (LINARDI, 2010).

Dentre as neoplasias hematológicas malignas, o MM representa apenas 1 % do total de casos, porém é responsável por 19 % das mortes nesse grupo de neoplasias (NERI; BAHLIS, 2012). A incidência do MM no Brasil ainda é desconhecida, principalmente porque não faz parte das estimativas anuais do Instituto Nacional de Câncer (INCA). Porém estudos apontam que a doença atinge 5,6 a cada cem mil pessoas, o que representa aproximadamente 11.350 novos casos por ano entre os brasileiros (PALUMBO; ANDERSON, 2011).

O MM acomete predominantemente adultos com idade entre 50 e 70 anos, é mais prevalente em homens que em mulheres, e ocorre com maior frequência em negros (HUNGRIA et al., 2008; FERRO et al., 2011; LUDWIG et al., 2014). A causa da doença ainda é desconhecida, mas está associada a fatores de risco como obesidade, histórico familiar de neoplasias hematológicas linfóides e exposição a substâncias químicas e radioativas (SLOVAK, 2011).

A apresentação clínica do MM pode ser assintomática ou sintomática. A forma assintomática está associada à presença de um pico monoclonal na eletroforese de proteínas séricas superior a 3,0 g/dL e/ou infiltração da MO com mais de 10 % de células plasmocitárias malignas, com ausência de sinais ou sintomas sistêmicos, enquanto que a forma sintomática do MM apresenta as mesmas alterações laboratoriais, somadas aos achados clínicos, como: lesões ósseas líticas, disfunção renal, anemia e infecções recorrentes (ANDERSON; CARRASCO, 2011).

Considerando a suspeita da doença, o diagnóstico objetivo detectar a presença de células plasmocitárias malignas, a produção exacerbada de imunoglobulinas ou lesões em órgãos ocasionadas pelo MM. Dessa forma, a detecção de clones malignos é avaliada por aspiração ou biópsia da MO, por imunofenotipagem, hibridização *in situ* (FISH), citogenética ou cariótipo convencional. A eletroforese de proteínas séricas e urinárias, juntamente com a imunofixação, contribui na caracterização da imunoglobulina anômala, enquanto que para a avaliação de possíveis lesões em órgãos, recomenda-se a utilização de exames de imagem, como radiografias, ressonância magnética, tomografia computadorizada e tomografia por emissão de pósitrons. Além dos exames citados, testes adicionais podem ser necessários, como, por exemplo, a dosagem de albumina e de $\beta 2$ -microglobulina para o estadiamento da doença, bem como outras análises imunoquímicas (LIN, 2009; LUDWIG et al., 2014).

Em relação ao prognóstico dos pacientes portadores de MM, observa-se uma progressão heterogênea. Na década de 90, a sobrevida global mediana era de aproximadamente três anos. Desde então, com os avanços no diagnóstico, com a introdução de novos fármacos antitumorais (como a talidomida, o bortezomibe e a lenalidomida), além do TCTH autólogo e as melhorias nos cuidados de suporte, as taxas de sobrevida ultrapassaram 75-80 %. Atualmente, a sobrevida média é de mais de cinco anos (RAJKUMAR, 2011).

Ainda assim, o MM é considerado uma doença incurável, apresentando altas taxas de recidiva e resistência ao tratamento, o qual tem mudado dramaticamente na última década. O aumento do número de fármacos originou várias combinações diferentes que podem ser utilizadas na primeira linha de tratamento e em recidivas (RAJKUMAR, 2011).

A escolha da terapia para pacientes com diagnóstico recente é influenciada por uma variedade de fatores, incluindo a idade do paciente, comorbidades e elegibilidade para o transplante de células-tronco (MAHINDRA et al., 2012).

Os pacientes considerados elegíveis para o TCTH autólogo devem ser tratados com três a quatro ciclos de terapia de indução ativa, seguido pela coleta de células-tronco, e terapia de altas doses com transplante de células-tronco. Vários estudos demonstraram a superioridade do protocolo de tratamento com três fármacos, baseado em bortezomibe, quando comparado com o tratamento com VAD (combinação de vincristina, doxorrubicina e dexametasona) ou combinações de dois fármacos, tornando a combinação preferida para a terapia de indução. Em países onde o bortezomibe não está disponível para a terapia de primeira linha, o uso do regime de CTD (ciclofosfamida-talidomida e dexametasona) é uma opção. No entanto, para os pacientes que não são elegíveis para a terapia com altas doses, ou no caso de o procedimento de transplante não ser possível, faz-se o uso dos esquemas MPT (melfalano com prednisona somados a talidomida), MPV (melfalano com prednisona combinados a bortezomibe) e CTD (LUDWIG et al., 2014).

Quase todos os pacientes com MM apresentam recidiva. A duração da remissão em MM recidivante diminui a cada ciclo de resgate utilizado sucessivamente. Em pacientes com recidiva de MM refratário para lenalidomida e bortezomibe, a sobrevida livre de progressão e sobrevida global é ruim, com tempos médios de cinco meses e nove meses, respectivamente (RAJKUMAR, 2011).

Apesar do avanço no tratamento com os novos agentes terapêuticos, tais como a talidomida, lenalidomida e bortezomibe, a doença continua incurável e fatal (ZHANG et al., 2013). Superar a quimioresistência é, sem dúvida, o desafio mais importante na terapia do câncer atualmente (GLAUER et al., 2013). Portanto, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas se faz necessário para melhorar a qualidade de vida dos pacientes portadores de MM.

2.2. MORTE CELULAR E ALVOS TERAPÊUTICOS

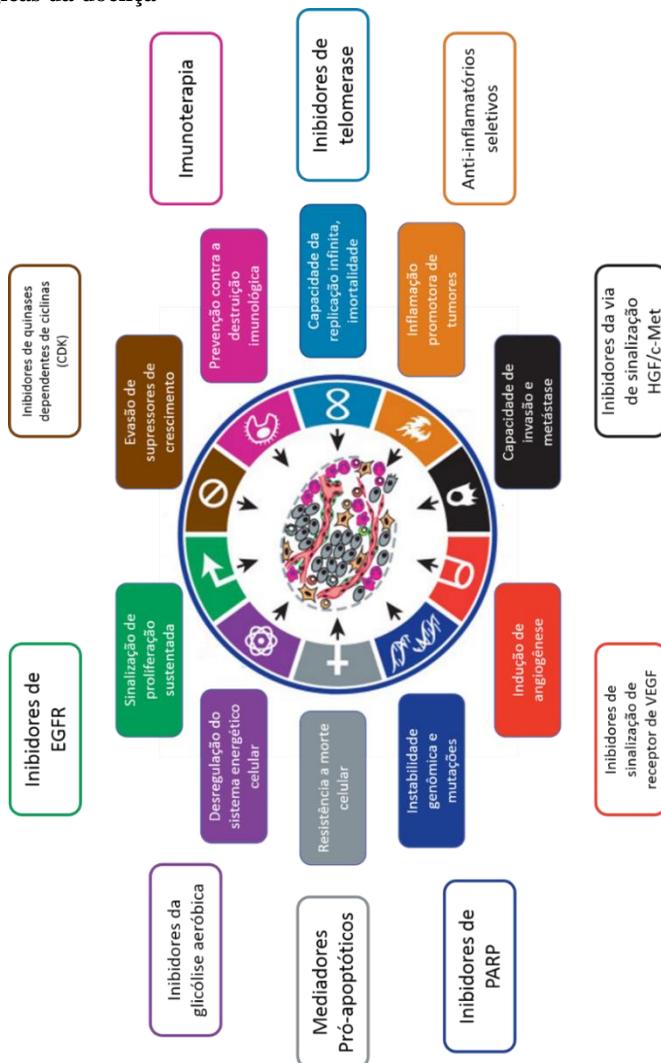
A homeostase de células normais é o resultado de um equilíbrio entre proliferação, diferenciação e morte celular programada. Já os processos malignos são caracterizados pelo aumento excessivo de células tumorais devido a falhas em um ou mais desses processos, tais como mutações que levam à inativação de proteínas pró-apoptóticas ou à expressão desregulada de proteínas antiapoptóticas, as quais podem conduzir à proliferação descontrolada de uma célula e a imortalidade da mesma (FESIK, 2005). Sendo assim, o entendimento dos mecanismos de regulação do ciclo celular e dos mecanismos de morte celular são

fundamentais para identificação de novos alvos na terapia antitumoral (HUNTER; LACASSE; KORNELUK, 2007).

Conforme citado anteriormente, as neoplasias possuem características específicas que garantem o crescimento da população celular, a imortalidade e a disseminação para outros tecidos. Assim, na investigação de novas terapias deve-se considerar a intervenção em alguns desses mecanismos, para que ocorra a indução das células neoplásicas à morte e se obtenha sucesso no tratamento dos pacientes acometidos pela doença (Figura 2).

Quando um fármaco é utilizado como quimioterápico e induz morte nas células tumorais é desejado que esta ocorra por meio de um mecanismo celular rigorosamente controlado e pouco imunogênico (BOSE; GRANT, 2015). Dentre os tipos de morte celular programada, que contemplam os critérios anteriores, a apoptose (morte celular programada tipo I) é a mais bem estudada na literatura (KROEMER et al., 2009; LI; DEWSON, 2015). Além da apoptose, o Comitê de Nomenclatura em Morte Celular (National Commite of Cell Death, EUA) classificou, de acordo com os aspectos moleculares e bioquímicos, outras formas de morte celular, tais como a autofagia (morte celular programada tipo II), a necrose, a catástrofe mitótica, a netose, a entose, a cornificação e a anoiquia (GALLUZZI et al., 2012).

Figura 2 - Tipos de tratamento conforme as principais características biológicas da doença



EGFR: receptor de fator de crescimento epidérmico (epidermal growth factor receptor); PARP: poli(ADP-ribose)polimerase (Poly(ADP-ribose) polymerase); VEGF: fator de crescimento de endotélio vascular (vascular endothelial growth factor); HGF/c-Met): fator de crescimento de hepatócitos/receptor do fator de crescimento de hepatócitos (hepatocyte growth factor receptor/ MET or hepatocyte growth factor receptor).

Fonte: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG (2011)

2.2.1. Apoptose

Apoptose foi um termo introduzido em 1972 para distinguir um modelo de morte celular envolvida na homeostase dos tecidos, na carcinogênese e com mecanismos endógenos altamente regulados (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; WYLLIE, 2010). É caracterizada morfológicamente pela condensação da cromatina, perda de volume, aumento da granulosidade celular, formação de pregas na membrana plasmática e fragmentação celular em corpos apoptóticos, os quais são digeridos pelos macrófagos, resultando em baixa reação inflamatória. No entanto, há manutenção da estrutura das organelas (KROEMER et al., 2009).

Os principais componentes desse processo de autodestruição das células são os membros de uma família de cisteíno-proteases intracelulares denominadas caspases (proteases citosólicas aspartato específicas) (PHILCHENKOV, 2004). As caspases são divididas em caspases iniciadoras (caspase-8, -2, -9 e -10) envolvidas na inicialização da morte celular, e em caspases efetoras (caspase-3, -6 e 7) envolvidas na execução da morte celular (TESTA; RICCIONI, 2007; DEL POETA et al., 2008). Esquemáticamente, duas vias levam à ativação dessas proteínas: a via extrínseca, iniciada em nível de receptores da família Fas/TNF; e a via intrínseca, ou mitocondrial, controlada pelos membros da família Bcl-2 (proteína 2 do linfoma de células B), que culmina com a liberação do citocromo-c (Figura 3) (NDOZANGUE-TOURIGUINE; HAMELIN; BREARD, 2008).

A via extrínseca é iniciada com a ativação de uma família de receptores localizados na membrana plasmática, através de sinais externos. Esses receptores, denominados receptores de morte, tais como TNF-R, TRAIL-R, DR3 (Apo-2), DR6 e FasR (Apo-1 ou CD95), possuem um domínio citoplasmático (denominado de domínio de morte) que permite a propagação do sinal apoptótico, e um domínio extracelular, responsável pela ligação do receptor com seu ligante específico (ASHKENAZI; DIXIT, 1998; PETER; KRAMMER, 1998; SULIMAN et al., 2001). Quando estimulados pela ligação ao ligante, os receptores recrutam os domínios de morte (DD) tais como FADD (domínio de morte associado a Fas) ou TRADD (domínio de morte associado ao fator de necrose tumoral), os quais, em conjunto com as caspases iniciadoras -8 e -10, formam o complexo DISC (complexo sinalizador indutor de apoptose). O complexo DISC induz a clivagem da pró-caspase-8 e liberação da caspase-8 ativa a qual pode ativar as caspases efetoras -3 e -7, independente da via mitocondrial. Ainda, a caspase-8 é capaz de

induzir a clivagem da proteína BID (proteína agonista do domínio de morte que interage com a BH3), o que leva à formação de um fragmento chamado Bid truncado (tBid), que possibilita o aumento da permeabilidade mitocondrial e liberação de proteínas pró-apoptóticas, o que permite a conexão das duas vias de ativação do processo apoptótico (RÖDER; TRAUZOLD; KALTHOFF, 2011; KOFF; RAMACHANDIRAN; BERNAL-MIZRACHI, 2015).

A via extrínseca pode ser ativada também pelos receptores de dependência, tais como, o UNC5A-D e o DCC. Esses receptores são ativados quando a concentração de seus ligantes específicos extracelulares atingem valores abaixo das basais, permitindo a rápida ativação das caspases executoras, em especial a caspase-3. O receptor DCC, quanto ativo, interage com a proteína adaptadora citoplasmática DRAL para a formação do apoptossoma. Enquanto que o receptor UNC5B, na ausência de seu ligante (neutrina-1), recruta um complexo de sinalização, resultando na desfosforilação de DAPK1 (proteína cinase associada a morte), a qual pode ativar diretamente as caspases executoras ou favorecer a permeabilidade da membrana mitocondrial (PORTER; DHAKSHINAMOORTHY, 2004; MILLE et al., 2009; GUENEBEAUD et al., 2010).

A mitocôndria, além de seu papel no metabolismo energético, apresenta uma importante relação na indução da apoptose por via intrínseca, mediada pela perda da capacidade de troca de metabólitos entre a matriz e o citosol (potencial de membrana mitocondrial). A permeabilização da membrana mitocondrial pode ser provocada por fatores independentes da ligação a receptores, tais como a privação de nutrientes, os danos ao DNA (via gene p53), a ativação de oncogenes, a radiação ultravioleta (UV), e as concentrações elevadas de espécies reativas de oxigênio (EROs) (COSENTINO; GARCÍA-SÁEZ, 2014; SONG et al., 2015).

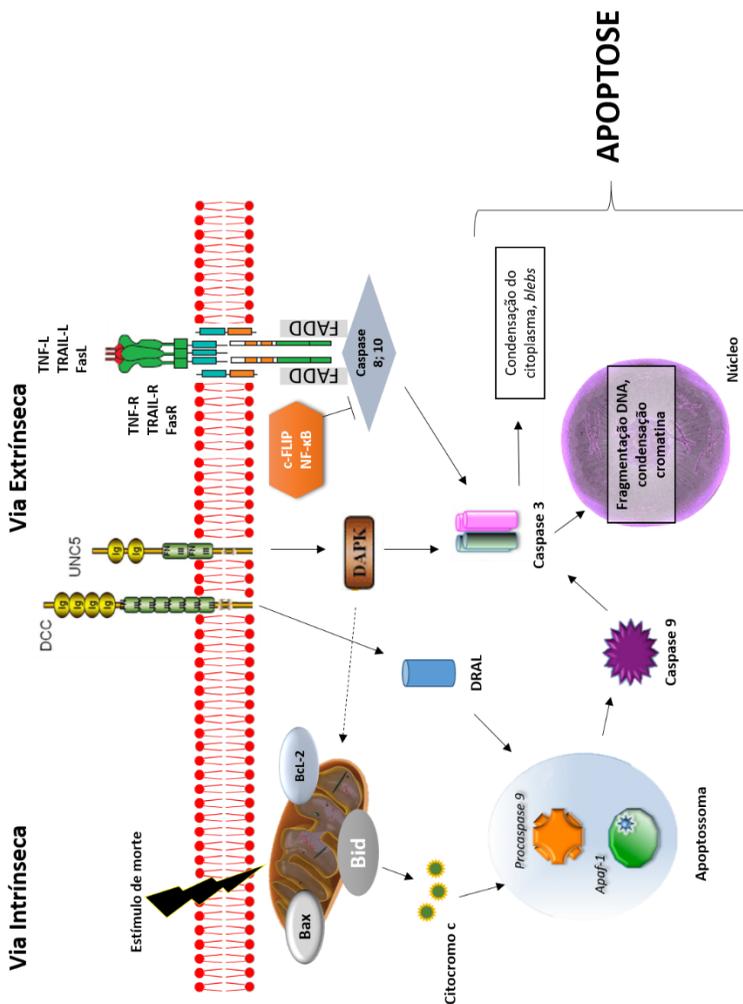
Na via intrínseca, quando ocorre o desequilíbrio entre a quantidade das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 (proteína 2 do linfoma de células B) e das proteínas pró-apoptóticas Bax (proteína X associada a Bcl-2), estão confinadas ao espaço intermembranário mitocondrial, ocorre um sinal capaz de induzir a formação de um canal de alta condutância, descontrolando o fluxo de solutos para o interior da mitocôndria, levando a um aumento da matriz mitocondrial, dissipação do potencial de membrana e liberação de proteínas apoptóticas como citocromo c, DIABLO/Smac (Proteína de ligação direta à IAP (proteínas inibidoras da apoptose) com baixo PI (ponto isoelétrico)/Segundo ativador mitocondrial de caspase), AIF (fator indutor de apoptose), endonuclease

G e pró-caspase-9. A formação desses poros é regulada pela família de proteínas Bcl-2, tais como Bax, Bak, Bok, Bim, Bad, Bid, Bik, Bmf, Puma, Noxa, Hrk, Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, A1 e Bcl-B (SCHULZEBERGMEN; KRAMMER, 2004; ADAMS, J. M.; CORY, S., 2007; ADAMS, J M; CORY, S, 2007).

O AIF e a endonuclease G, após serem liberados da mitocôndria, são deslocados ao núcleo celular, onde promovem a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA, independentemente da ativação das caspases, enquanto que a DIABLO/Smac liga-se às IAPs (proteínas inibidoras de apoptose), prevenindo o bloqueio do processo apoptótico. As IAPs incluem várias proteínas, dentre elas a survivina, considerada antiapoptótica devido à sua capacidade de inibir as caspases. A survivina é expressa na maioria das neoplasias humanas e está envolvida também na resistência ao tratamento. O citocromo c, quando liberado da mitocôndria, liga-se à APAF-1 (fator-1 ativador de protease apoptótica), e esse complexo chamado apoptossoma, na presença de ATP, cliva a pró-caspase-9 em caspase-9 ativa, que por sua vez, ativa a caspase-3 (BROKER; KRUYT; GIACCONE, 2005; FULDA; DEBATIN, 2006; HUNTER et al., 2007; FULDA, 2009; GALLUZZI et al., 2012).

As duas vias (intrínseca e extrínseca) convergem para a ativação da caspase-3, a qual induz a clivagem de proteínas cinases, proteínas do citoesqueleto e proteínas relacionadas ao reparo do DNA, desencadeando uma série de alterações morfológicas pelas quais a apoptose é caracterizada (FULDA, 2009; WYLLIE, 2010).

Figura 3 - Sinalização intracelular da apoptose



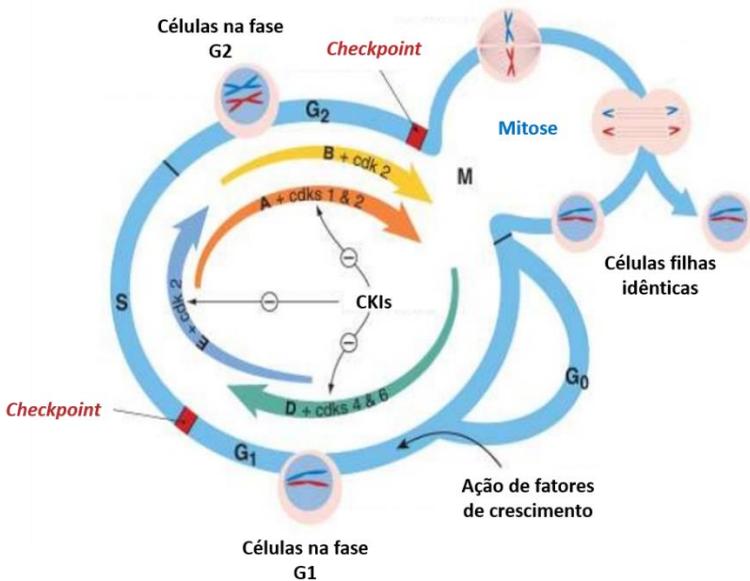
TNF (L/R): fator de necrose tumoral (ligante/receptor); TRAIL (L/R): ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (ligante/receptor); c-Flip: proteína inibidora de FLICE; FADD: proteína de domínio de morte celular associada a Fas; Bcl-2: proteína 2 do linfoma de células B; Bid: agonista de morte que interage com o domínio BH3; Apaf-1: fator 1 ativador da apoptose; NF-KB: fator de necrose *kappa B*; DNA: ácido desoxirribonucleico; DCC e UNC5: receptores de netrina; DAPK: proteína cinase associada a morte; Bax: Proteína X associada a Bcl-2.

Fonte: Adaptado de GALLUZZI et al. (2012) e SILVA, I. T. D. (2013)

2.2.2. Ciclo Celular

As células possuem múltiplos mecanismos de checagem do ciclo celular a fim de monitorar e responder a distúrbios celulares, impedindo a progressão de células alteradas até que os erros sejam reparados ou até a promoção da apoptose. Os dois principais eventos no ciclo celular consistem na síntese do DNA (fase S) e na divisão da célula-mãe em duas células-filhas durante a mitose (fase M). A fase entre a divisão celular e a síntese de DNA é denominada fase G₀/G₁, enquanto a fase entre a síntese do DNA e a mitose é denominada fase G₂/M (Figura 4). Perturbações nos *checkpoints* entre essas fases comprometem a integridade do genoma, promovem o desenvolvimento de neoplasias e afetam significativamente a eficácia das terapias antitumorais (ALBERTS et al., 2004).

Figura 4 - Ciclo celular e seus mecanismos de regulação



Fonte: Adaptado de RANG et al. (2003)

Uma série de enzimas chamadas cinases dependentes de ciclinas (CDKs) que interagem com proteínas específicas (ciclinas), regulam a progressão pelas fases do ciclo celular. A ocorrência de mutações nos genes das CDKs e/ou ciclinas pode resultar em transformações neoplásicas (MOLINARI, 2000).

Quando são identificados erros no processo de replicação celular, o ciclo celular pode ser inibido pela formação de complexos estáveis entre as CDKs e um grupo de proteínas denominadas de inibidores de CDK (CKI). As CKIs impedem que as CDKs se liguem às suas respectivas ciclinas até que o reparo do DNA esteja completo e a progressão do ciclo celular possa continuar (BONELLI et al., 2014).

A proteína supressora de tumor p53 atua no primeiro *checkpoint*, localizado entre as fases G1 e S, pela ativação de vários genes efetores pró-apoptóticos ou inibidores do crescimento. Dentre eles, encontra-se a proteína p21, que transcreve uma proteína homônima que age como efetora em diversas vias supressoras do tumor, levando à parada do ciclo celular a fim de corrigir o dano genômico (ABBAS; DUTTA, 2009). Como a p53 também é capaz de induzir a célula à apoptose, a supressão ou mutação dessa proteína é capaz de contribuir para o desenvolvimento de processos neoplásicos (GHOBRIAL; WITZIG; ADJEL, 2005; HUNTER et al., 2007).

Conforme citado anteriormente, a proliferação celular descontrolada é considerada uma das principais características envolvidas na oncogênese. Células em constante replicação expressam a proteína Ki-67 em concentrações variáveis durante todas as fases do ciclo celular e também durante a mitose, enquanto que células quiescentes na fase G0 não expressam essa proteína. Apesar de a proteína Ki-67 ser considerada um marcador de proliferação celular, suas funções específicas permanecem inconclusivas. Alguns estudos propõem à proteína Ki-67 as funções de organização e manutenção da arquitetura do DNA e a síntese de ribossomos durante a mitose (YANG, J. et al., 2004; YANG, JUN et al., 2006; PATHMANATHAN; BALLEINE, 2013).

2.3. NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS

A descoberta de novos fármacos antitumorais é uma alternativa aos pacientes que não apresentam boas respostas aos tratamentos já disponíveis. Nesse contexto, moléculas bioativas extraídas de diversas fontes naturais, isto é, plantas, animais e microrganismos, são de potencial importância medicinal. Desde os tempos antigos, os produtos naturais têm desempenhado um papel notável em todo o mundo no tratamento e prevenção de doenças humanas (NOBILI et al., 2009; DEMAÏN; VAISHNAV, 2011).

A natureza atua como fonte inesgotável de compostos líderes e fornece a base e discernimento para a semisíntese ou síntese total de novos medicamentos. Atualmente, cerca de 60 % dos medicamentos

utilizados na clínica são produtos naturais ou elaborados com base em produtos naturais. Em 2010, dez das vinte pequenas moléculas que foram aprovadas contra diferentes doenças ou eram compostos naturais ou diretamente derivados deles, sendo a maioria com atividade antitumoral. Um total de 175 medicamentos anticâncer à base de foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), entre 1981 e 2014, desses, 75% foram classificados como produtos naturais ou como fármacos semisintéticos (NEWMAN; CRAGG, 2012; CRAGG, G. M.; NEWMAN, 2013; CRAGG, GORDON M; GROTHAUS; NEWMAN, 2014; KHAZIR et al., 2014; NEWMAN; CRAGG, 2016).

Neste contexto, cabe salientar que o Brasil, com mais de 46.000 espécies de plantas, uma das floras mais ricas do mundo (quase 19% da flora mundial), possui grande potencial para a exploração de produtos naturais com atividades biológicas (GIULIETTI et al., 2005; Flora do Brasil 2020 em construção, 2016).

Entre 1960 e 1985, o *U.S. National Cancer Institute* liderou um programa de triagem de cerca de 600.000 compostos para investigação da atividade antitumoral. Esses compostos, de origens variadas, continham desde moléculas extraídas de plantas até moléculas sintetizadas por indústrias de corantes. Nesse contexto, é possível observar a importância da prospecção de fármacos, tanto de origem natural quanto resultantes de síntese química total como novas alternativas ao tratamento convencional de doenças que persistem incuráveis (DENNY, 2002).

Nesse contexto, as classes químicas das quinonas e das sulfonamidas representam importantes fontes para investigação de novos fármacos com atividade antitumoral.

2.3.1. Quinonas

Alguns trabalhos relataram a atividade antitumoral da espécie *Eugenia hiemalis* Cambessèdes, conhecida popularmente como “guamirim”, e que está distribuída entre os estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul e ainda países como Paraguai e Argentina (FALKENBERG, 1996; ZATELLI, 2015). As espécies do gênero *Eugenia* apresentam, além da atividade antitumoral, marcante atividade antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, associadas à grande quantidade de compostos fenólicos em sua composição (MAGINA et al., 2012; FERREIRA et al., 2014).

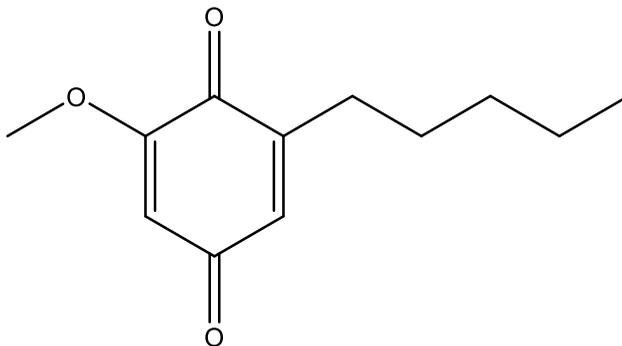
A oxidação de compostos fenólicos com 1,2-dihidroxibenzeno e 1,4-dihidroxibenzeno origina as quinonas, tais como orto-quinonas e para-quinonas, respectivamente, as quais são descritas na literatura por

suas atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral e anticolinesterásica (BERTANHA et al., 2014; RAJENDRAN, 2016). Desta forma, é possível associar os efeitos biológicos resultantes do uso da *Eugenia hiemalis* Cambessèdes com as quinonas presentes nessa planta.

A primina, 2-metoxi-6-n-pentil-p-benzoquinona (GE2) (

Figura 5), é uma benzoquinona natural, identificada em 1927, por Bloch e Karrer em prímulas (*Primulaobconica*) (BRONDANI et al., 2007) e recentemente isolada de folhas de *Eugenia hiemalis* Cambessèdes (ZATELLI, 2015).

Figura 5 - Estrutura molecular da primina.



Fonte: Própria

Em 1974, testes clínicos em 11 pacientes com câncer de pele foram tratados com primina e obtiveram importante atividade antineoplásica, resultando na comercialização da substância por um período. No entanto, devido à baixa busca pela substância e o efeito alergênico (dermatite de contato) relacionado a substância, a comercialização foi interrompida (MELO et al., 1974; NASCIMENTO, 2004). Além disso, estudos *in vivo*, realizados em 1988 e 2007 mostraram excelente atividade antitumoral contra sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich (NASCIMENTO, 2004; BRONDANI et al., 2007).

2.3.2. Sulfonamidas

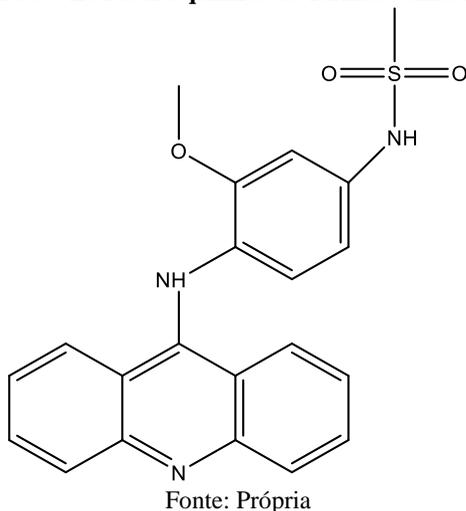
As sulfonamidas foram os primeiros antibióticos de origem sintética a serem utilizados no tratamento de diversas infecções bacterianas. A descoberta da atividade antibacteriana da sulfonamidas em 1935 impulsionou a síntese de novas sulfas, e atualmente, sua ampla

utilização como agentes antimicrobianos deve-se principalmente ao baixo custo, baixa toxicidade e excelente atividade contra infecções bacterianas. Ao longo do tempo, as sulfonamidas passaram a ser utilizadas também como agentes anticancerígenos (PARASCA et al., 2013).

As sulfonamidas constituem uma importante classe de compostos com diferentes ações farmacológicas relatadas, como atividades antibacterianas, antitumorais, diuréticas, hiperglicêmicas, inibidora de protease, inibidora da anidrase carbônica, entre outras (SUPURAN, C. T. et al., 2003).

Apesar das sulfonamidas apresentarem uma função orgânica comum que permite agrupá-las em uma classe, existe uma variedade de alterações estruturais que justificam os diferentes mecanismos de ação relacionados à sua atividade antitumoral, como a inibição da anidrase carbônica, bloqueio do ciclo celular na fase G1 (pela fosforilação proteína do retinoblastoma (pRb), diminuição da expressão de ciclinas A e B1, das proteínas CDK2 e CDC2, e supressão da atividade catalítica de CDK2), disfunção da associação de microtúbulos, supressão funcional do ativador de transcrição NF- κ B e inibição da angiogênese (SCOZZAFAVA et al., 2003). Derivados de metanosulfonamidas são capazes de ligar-se ao DNA e causar um efeito citostático. Como exemplo, pode-se citar o fármaco amsacrina que é utilizado como quimioterápico no tratamento de linfomas e leucemias (Figura 6) (PARASCA et al., 2013).

Figura 6 – Estrutura química do fármaco amsacrina.



3. OBJETIVOS

Para o delineamento deste trabalho foram elaborados os objetivos descritos a seguir.

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial efeito citotóxico de 26 sulfonamidas sintéticas e uma quinona natural (primina) isolada do extrato bruto de *Eugenia hiemalis*, sobre linhagens celulares de neoplasias hematológicas (leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda e mieloma múltiplo), e avaliar *in vitro* o possível mecanismo de morte celular dos compostos mais ativos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial efeito citotóxico, através de triagem, de duas séries de sulfonamidas sintéticas, uma com 16 compostos (série DFS) e outra com 10 compostos (série Gli), sobre linhagens celulares de leucemia mieloide aguda (K562), de leucemia linfoblástica aguda (Jurkat) e de mieloma múltiplo (MM.1S);
- Selecionar as sulfonamidas sintéticas com maior atividade citotóxica na triagem, e em conjunto com a primina, determinar a resposta citotóxica dos compostos em relação à concentração e ao tempo de incubação, sobre as linhagens celulares de leucemia mieloide aguda (K562), de leucemia linfoblástica aguda (Jurkat) e de mieloma múltiplo (MM.1S);
- Verificar se os compostos selecionados e avaliados induzem morte celular por necrose ou apoptose nas células de leucemia mieloide aguda (K562), de leucemia linfoblástica aguda (Jurkat) e de mieloma múltiplo (MM.1S);
- Avaliar a seletividade dos compostos com maior atividade citotóxica, investigando sua citotoxicidade em linhagens de fibroblastos murinos normais (L-929) e em células mononucleadas de sangue periférico isoladas de voluntários saudáveis;
- Analisar o efeito dos compostos selecionados no ciclo celular e na expressão do marcador de proliferação celular Ki-67 das células de linhagem de leucemia mieloide aguda (K562), de leucemia linfoblástica aguda (Jurkat) e de mieloma múltiplo (MM.1S);
- Explorar o efeito dos compostos selecionados sobre o potencial de membrana mitocondrial das células de linhagem de leucemia mieloide

aguda (K562), de leucemia linfoblástica aguda (Jurkat) e mieloma múltiplo (MM.1S);

- Investigar se a atividade citotóxica dos compostos selecionados envolve alterações nos seguintes fatores reguladores de apoptose: caspase-3, proteína antiapoptótica Bcl-2, proteína pró-apoptótica Bax, receptor FasR, proteína antiapoptótica survivina e o fator indutor de apoptose (AIF).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção irá abordar os procedimentos, as técnicas e os reagentes utilizados para a obtenção dos resultados desse trabalho, conforme o delineamento apresentado na Figura 7.

Figura 7 - Delineamento do estudo (Continua)

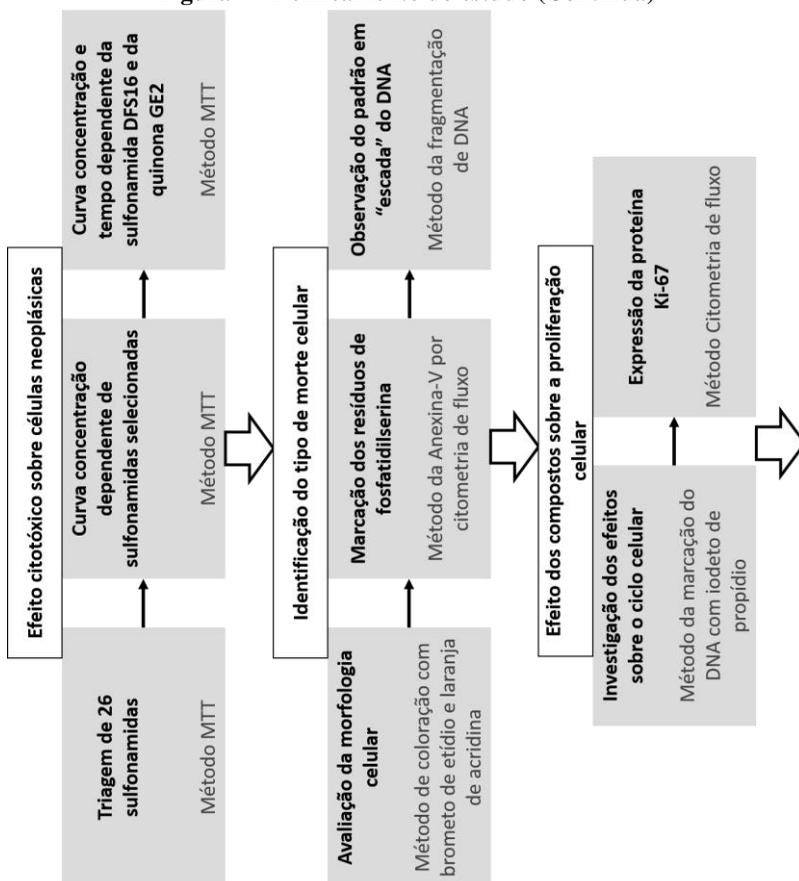
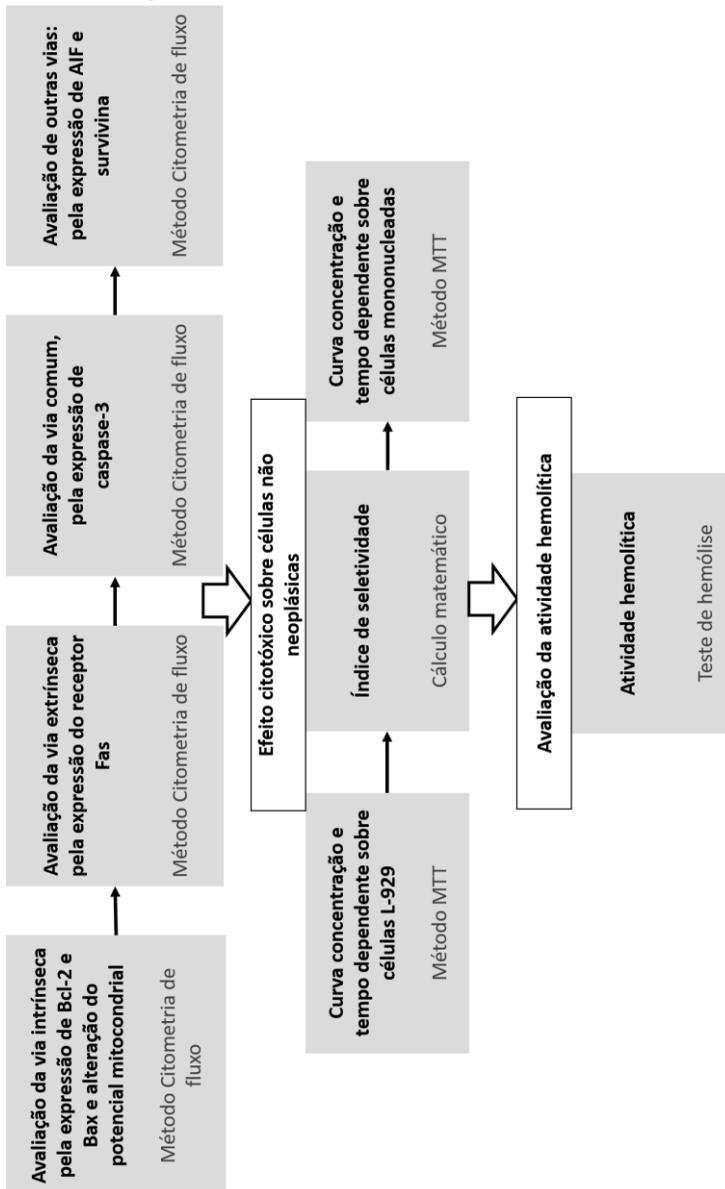


Figura 7 - Delineamento do estudo (Conclusão)



Fonte: Própria

4.1. CULTIVO DE LINHAGENS CELULARES IMORTALIZADAS

As quatro linhagens celulares utilizadas nesse trabalho foram as seguintes: K562 (LMA secundária a LMC) e Jurkat (LLA-T) cedidas pelo Prof. Dr. Alberto Orfao, do *Centro de Investigación del Cáncer* da Universidade de Salamanca; MM.1S (MM) cedida pela Dra. Anamika Dhyani do Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas; e L-929 (fibroblasto murino) cedidas pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná.

A linhagem celular K562 foi a primeira linhagem de leucemia mieloide humana imortalizada e foi estabelecida em 1970 de uma efusão pleural de uma paciente de 53 anos de idade com leucemia mieloide crônica em crise blástica, em que as células para sua maturação e permanecem como mieloblastos (KOEFFLER; GOLDE, 1980). As células K562, quando em cultura, não possuem capacidade de se aderir em frascos plásticos, possuem formato arredondado e são positivas para o gene de fusão BCR-ABL (LOZZIO; LOZZIO, 1975).

A linhagem celular Jurkat foi estabelecida em 1976 do SP de um paciente de 14 anos com a primeira recidiva de LLA de células T (SCHNEIDER; SCHWENK; BORNKAMM, 1977). As células Jurkat ou JM são utilizadas para estudos de sinalização de células T e para avaliação da expressão de vários receptores de quimiocinas susceptíveis à entrada de vírus, em particular o HIV; no entanto, a sua principal utilização é para determinar o mecanismo de susceptibilidade do câncer a drogas e radiação (MICHEAU et al., 1997; OTTOSON et al., 2001; ABRAHAM; WEISS, 2004; COHLY et al., 2005). *In vitro*, não possuem capacidade de se aderir em frascos plásticos, possuem formato arredondado e capacidade de formar aglomerados.

Em 1986, a linhagem celular MM.1S foi isolada a partir de células do SP de um paciente com MM secretor de imunoglobulina A. A partir de um único paciente com MM, duas linhagens de células foram estabelecidas, a MM1.S e a MM.1R e podem ser distinguidas com base na sua sensibilidade aos esteroides, tais como glicocorticoides (GCs). As células MM.1S são sensíveis a dexametasona, utilizada no tratamento convencional do MM, enquanto que a MM.1R é resistente à essa terapia (GREENSTEIN et al., 2003). Quando em cultivo, as células MM.1 crescem em suspensão individualmente ou em pequenos grupos e secretam imunoglobulinas de cadeia leve lambda (GOLDMAN-LEIKIN et al., 1989).

Sabe-se que a MO contém um estroma complexo, consistindo de uma matriz de tecido conjuntivo e uma diversidade de tipos celulares,

incluindo fibroblastos (ANJOS; ALVARES-SILVA; BORELLI, 2000). Assim, a utilização da linhagem celular L-929 nesse trabalho é devido à sua característica de célula fibroblástica de tecido conjuntivo e consequente capacidade de mimetizar o comportamento de uma célula não neoplásica do nicho medular. A linhagem L-929 é um subclone da linhagem parental L, uma linhagem celular estabelecida no ano de 1940 e foi uma das primeiras linhagens celulares a serem estabelecidas em cultura contínua. A linhagem L é um fibroblasto derivado do tecido aureolar subcutâneo e adiposo de um camundongo macho C3H/An de 100 dias. Quando em cultivo, essas células são capazes de gerar uma monocamada aderida aos fracos plásticos de cultivo celular (SANFORD; EARLE; LIKELY, 1948).

As células desse estudo foram cultivadas em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI, Gibco®) 1640 suplementados com 10 % de soro fetal bovino (SBF, Gibco®), 10.000 U/ml de penicilina (Gibco®), 10.000 µg/mL de estreptomicina (Gibco®) e 10 mM de tampão de ácido *N*-[2-Hidroxietil]piperazina-*N'*-[2-etanosulfônico] (HEPES, Gibco®), pH 7,4 e mantidas em frascos de cultura estéreis de 25 cm² e 75 cm² a 37 °C, em atmosfera umedecida de 5 % de CO₂. As células foram semeadas em uma densidade de 10⁶ células/garrafa e repicadas a cada 48 horas em cabine de segurança biológica (MAIORAL, 2013).

Para a realização dos experimentos, as células em suspensão (K562, Jurkat e MM.1S) foram centrifugadas com rotação de 264 x *g* por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular suspenso em meio de cultura RPMI 1640 para contagem do número de células (LOUIS; SIEGEL, 2011; MAIORAL, 2013).

As células aderidas (L-929) foram soltas da garrafa com auxílio de 1,5 mL de uma solução de tripsina/ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) 0,25 %. Quando as células adquiriram um aspecto redondo e individualizado, o processo foi interrompido com a adição de 5 mL de meio RPMI com SBF a 10 %. Como o soro possui alfa 1-anti-tripsina, ele neutraliza a ação da tripsina. É importante que a neutralização com soro se faça logo após o descolamento da camada celular, pois a membrana, por ser lipoproteica, sofre a ação protelítica da tripsina. Com o descolamento da camada celular, as células suspensas em meio RPMI foram centrifugadas com rotação de 264 x *g* por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular suspenso em meio RPMI para contagem do número de células.

Em todos os experimentos, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan (0,5 %) (EVANS; SCHULEMANN, 1914), em meio RPMI 1640, na proporção

1:1. Apenas as amostras com viabilidade celular superior a 95 % foram utilizadas nos experimentos.

O tempo de tratamento e a placa utilizada (6, 12, 24 ou 96 poços) foram definidos de acordo com cada experimento realizado e as condições requeridas pelo mesmo, no entanto, mantendo-se a relação de 5×10^4 células/poço para o tempo de tratamento de 24 horas, $2,5 \times 10^4$ células/poço para 48 horas e $1,25 \times 10^4$ células/poço para 72 horas para as células K562, MM.1S e L-929 e 1×10^5 células/poço para o tempo de tratamento de 24 horas, 5×10^4 células/poço para 48 horas e $2,5 \times 10^4$ células/poço para 72 horas para as células (MAIORAL, 2013).

4.2. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEADAS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

As amostras de sangue periférico de seis doadores saudáveis, não fumantes e voluntários foram coletadas por punção venosa em tubo com anticoagulante EDTA e processadas logo em seguida. Todos os indivíduos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) presente no projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH-UFSC) sob parecer nº 746.486 /2014.

Para obtenção das células mononucleadas do sangue periférico, as amostras foram diluídas em tampão fosfato (PBS) na proporção de 1:1. Após a diluição, as amostras foram transferidas cuidadosamente para um tubo cônico sobre uma solução de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077 g/mL; Sigma-Aldrich®) na proporção 1:1 e centrifugadas a $300 \times g$ por 30 minutos. A interfase com as células mononucleadas foi transferida para um novo tubo cônico, suspensa em 10 mL de tampão PBS e centrifugada a $264 \times g$ por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram novamente suspensas em PBS e centrifugadas. O sobrenadante foi desprezado e as células foram suspensas em 1 mL de meio RPMI1640 para avaliação do número de células viáveis, pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan (0,5 %) (BÖYUM, 1968).

4.3. OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS E TRATAMENTO DAS CÉLULAS

Nesse trabalho foi investigada a atividade citotóxica de 27 compostos, sendo 26 de origem sintética e um de origem natural. Todos foram obtidos a partir de parcerias firmadas entre o Laboratório de

Oncologia Experimental e Hemopatias e outros laboratórios da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.3.1. Compostos sintéticos: Sulfonamidas

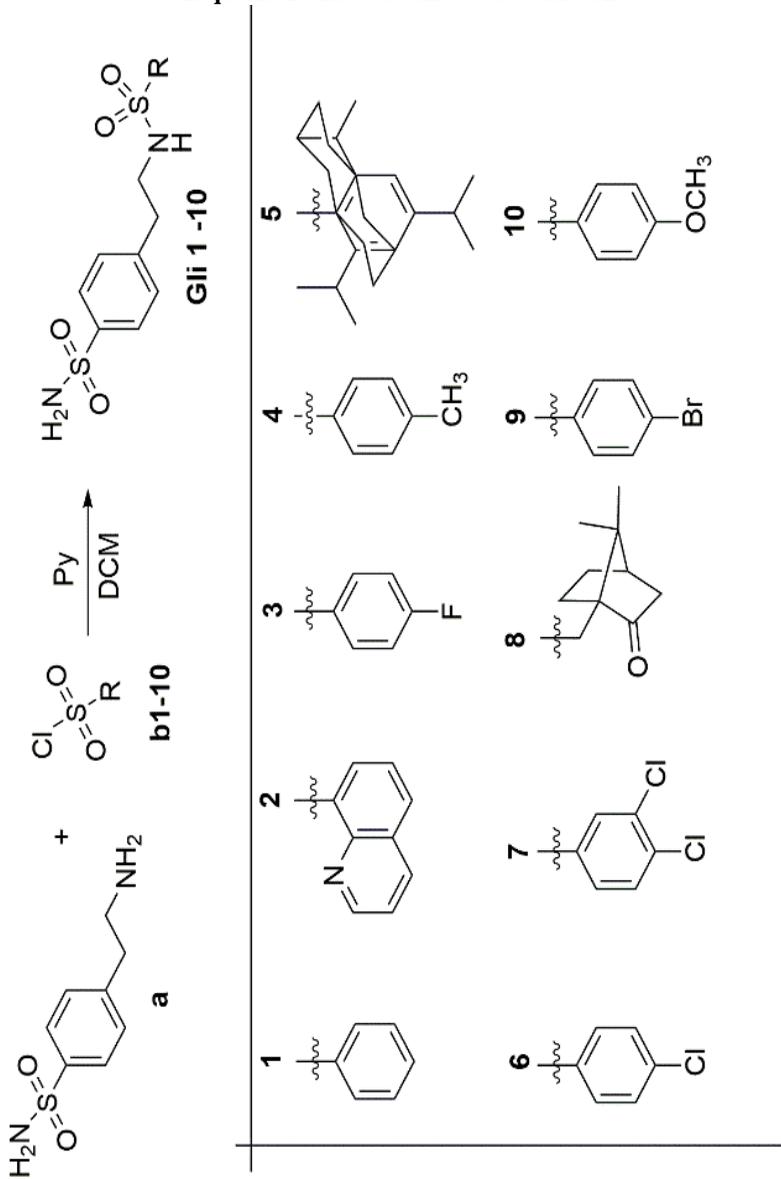
Os compostos sintéticos, 26 sulfonamidas, foram cedidos pela Dra. Patrícia Devantier Neuenfeldt, pela Dra. Alessandra Mascarello e pela Dra. Louise Domeneghini Chiaradia-Delatorre, do grupo de pesquisa do Laboratório Estrutura e Atividade do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), coordenado pelo Prof. Dr. Ricardo José Nunes, com colaboração do Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes.

Das 26 sulfonamidas sintéticas estudadas, 10 são derivadas da 4-(2-aminoetil)benzenossulfonamida (Série Gli) e 16 da 3,3-difenilpropilamina (Série DFS).

As sulfonamidas **Gli 1 – 10** e **DFS 1 - 16** foram sintetizadas pela reação de 1mmol da amina correspondente (**a** ou **f**), 1 mmol do cloreto de sulfonila **b1-10** ou **d1-16**, respectivamente, e 1 mmol de piridina em 15 mL de diclorometano (DCM) (Esquema 1 e Esquema 2). As reações ocorreram em temperatura ambiente, sob agitação magnética por 16 horas. Após esse tempo, o DCM foi evaporado em rotaevaporador, o produto bruto foi solubilizado em metanol e vertido sobre gelo picado. O produto foi filtrado a vácuo e recristalizado com o solvente apropriado quando necessário (MASCARELLO, 2012). As sulfonamidas são solúveis em DMSO e acetona. As estruturas dos compostos foram caracterizadas por ressonância magnética nuclear de espectroscopia (RMN) de ^1H e de ^{13}C , espectros de infravermelho (IV) e espectrometria de massa (EM).

As sulfonamidas sintetizadas são inéditas na literatura, exceto as DFS1, DFS 8 e DFS14. As sulfonamidas DFS1 e DFS 14 possuem apenas relatos de síntese química, enquanto que a sulfonamida DFS8 possui um trabalho relatando sua atividade como inibidora da proteína *heat shock* 90 e conseqüentemente tem uma ação anticâncer (GENSLER; ROCKETT, 1955; GENSLER; DHEER, 1981; DODDAREDDY et al., 2011; ZHOU et al., 2015).

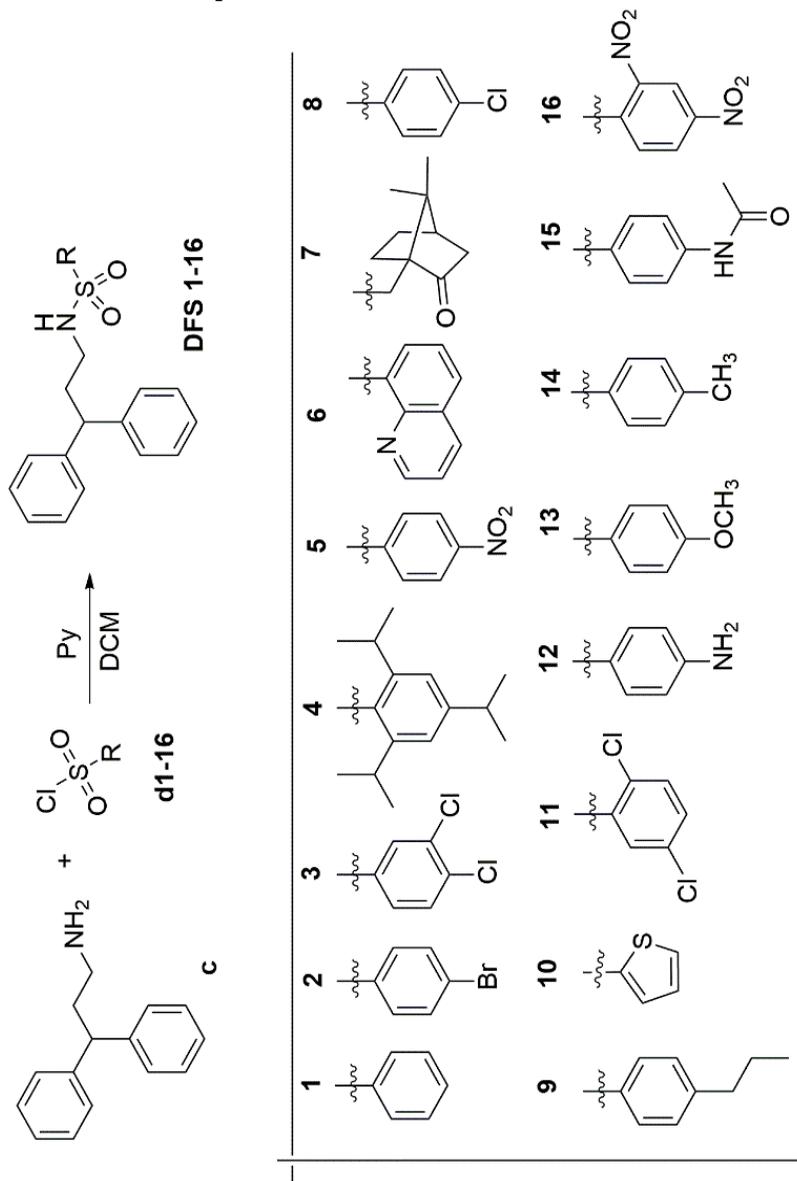
Esquema 1 - Rota de síntese da Série Gli



R=

Fonte: Própria

Esquema 2 - Rota de síntese da Série DFS



R=

Fonte: Própria

4.3.2. Composto Natural: Primina

O composto natural primina (GE2) foi cedido pela doutoranda Gabriele Andressa Zatelli e pela mestre Ana Cláudia Philippus, do grupo de Estudos de Produtos Naturais e Sintéticos da Universidade Federal de Santa Catarina, coordenado pela Profa. Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg.

A primina foi isolada a partir das folhas de *Eugenia hiemalis* Cambessèdes (Mirtaceae) coletadas em abril de 2013 no município de Porto Alegre (RS, Brasil). A identificação botânica foi realizada no Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pelo Prof. Dr. João André Jarenkow e uma exsicata (ICN 127910) foi depositada no Herbário do Instituto de Ciências Naturais da UFRGS (ZATELLI, 2015).

Para a extração, as folhas da planta foram rasuradas e maceradas com diclorometano. Após sete dias, o extrato diclorometano foi concentrado em evaporador rotatório. Uma alíquota do extrato bruto diclorometânico das folhas (3,45 g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico por cromatografia líquida a vácuo utilizando-se sílica gel 60 e como fase móvel um gradiente de solventes com aumento de polaridade. Esse procedimento originou 15 frações. Da purificação das frações 5 e 7, foi possível isolar o composto puro GE2, de peso molecular de 208,110 g/mol (ZATELLI, 2015).

4.3.3. Tratamento das células em cultura

As sulfonamidas e o composto GE2 foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck Millipore®) na concentração de 10 mM para estocagem entre 2-8 °C. Para sua utilização nos experimentos, foram utilizadas soluções preparadas a partir dessa solução estoque e diluídas em meio de cultura, sempre respeitando o limite de toxicidade do DMSO de 2 % na concentração final do experimento.

O tratamento foi realizado pela adição dos compostos às células em um volume máximo de 20 µL, variando conforme o experimento. Em seguida, as células foram incubadas conforme protocolo experimental nas condições descritas previamente.

Em todos os experimentos foram utilizados dois grupos controle, um de células sem tratamento, e outro acrescido do solvente (DMSO) ao meio de cultura.

4.4. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR E DETERMINAÇÕES DAS CURVAS DE CONCENTRAÇÃO E TEMPO-RESPOSTA (MÉTODO MTT)

O estudo dos compostos sintéticos iniciou com uma triagem das 26 sulfonamidas em células K562, Jurkat e MM.1S, na concentração de 100 μM , a fim de avaliar seus potenciais efeitos citotóxicos.

Os compostos que apresentaram maior atividade citotóxica foram selecionados para a realização de curvas de resposta concentração e tempo dependentes, nas mesmas linhagens celulares malignas e também nas linhagens não neoplásicas (L-929 e células mononucleadas de SP). Para isso, as células foram incubadas com as sulfonamidas em concentrações crescentes (1, 5, 10, 25, 50 e 100 μM) e após 24, 48 e 72 horas de incubação, e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT.

Esse método é um ensaio colorimétrico sensível e quantitativo, que consiste em medir a atividade das desidrogenases mitocondriais que reduzem o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio; Amresco[®]), um composto hidrossolúvel de cor amarelo-pálido, ao seu derivado formazan de cor roxa, não solúvel em água, indicando o funcionamento mitocondrial e, por conseguinte, a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Após o tempo de incubação das células com os compostos em cada experimento, as placas de 96 poços foram centrifugadas, o sobrenadante removido, e adicionado novo meio de cultura contendo 10 % (v/v) de uma solução de MTT (5 mg/mL em PBS). Depois de três horas de incubação a 37 °C, as placas foram novamente centrifugadas e o sobrenadante removido. Os precipitados formados em cada poço foram dissolvidos em solução ácida de isopropanol (isopropanol/HCl 0,04 N) e em seguida foi realizada a leitura das absorbâncias no espectrofotômetro Microwell Systems (Organon Teknika[®]) no comprimento de onda 540 nm (MOSMANN, 1983).

Os valores de absorbância medidos para cada concentração de composto foram transformados em porcentagens de viabilidade, em relação aos controles celulares, considerados 100 % viáveis.

A concentração inibitória 50 % (CI₅₀) foi obtida a partir da análise de regressão linear dos gráficos plotados com os valores de porcentagem de viabilidade celular *versus* concentração, utilizando-se o *software* GraphPad Prism 6.

O ensaio de viabilidade celular para o composto GE2, foi realizado nas mesmas condições descritas para os compostos sintéticos,

modificando-se apenas as concentrações utilizadas, variando de 0.01 a 50 μM .

No ensaio de viabilidade celular em células mononucleadas de indivíduos saudáveis, como grupos controle com tratamento, as células foram incubadas com paclitaxel (10 μM , CI_{50} em 24 horas em células K562, em solução com o solvente que acompanhava o fármaco, disponibilizado pelo fabricante) e também com o solvente DMSO na maior concentração utilizada nos experimentos (0,26 μM , 2 %).

4.5. ÍNDICE DE SELETIVIDADE

O índice de seletividade (IS) pode indicar a capacidade de um composto induzir morte celular de forma seletiva para uma linhagem neoplásica ou mostrar não ser citotóxico para células normais quando comparadas às células neoplásicas, possibilitando sugerir o potencial uso dessa substância em testes clínicos. Assim, nesse estudo, o índice foi calculado pela razão entre a CI_{50} de linhagem de células que serão utilizadas como padrão de comparação e a CI_{50} de outra linhagem de células para qual se deseja verificar se o composto é seletivo.

Por exemplo, para verificar se determinado composto é seletivo para células neoplásicas (K562) quando comparadas as células não neoplásicas (L-929), utiliza-se a Equação 1:

Equação 1 - Cálculo do índice de seletividade

$$IS = \frac{\text{CI}_{50} \text{ em células L - 929}}{\text{CI}_{50} \text{ em K562}}$$

Fonte: Própria

Assim, valores altos de IS significam que a CI_{50} em células não neoplásicas é muito superior à CI_{50} em células neoplásicas, indicando que o composto avaliado é seletivo para as células neoplásicas.

Valores de IS entre 1 e 2 representam baixa seletividade, valores entre 2 e 3, moderada seletividade e valores maiores que 3, expressam alta seletividade do composto (PRAYONG; BARUSRUX; WEERAPREEYAKUL, 2008; MACHANA et al., 2011; AWANG et al., 2015; DAHHAM et al., 2015).

4.6. IDENTIFICAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR

Para os compostos que apresentaram alta citotoxicidade, com consequente baixa CI_{50} , foram realizados métodos de identificação do tipo de morte celular, tais como a investigação da morfologia celular por coloração com brometo de etídio e laranja de acridina em microscopia de fluorescência, o ensaio de fragmentação de DNA por eletroforese em gel de agarose e a avaliação da expressão dos resíduos de fosfatidilserina.

4.6.1. Alterações morfológicas observadas na morte celular

O ensaio baseia-se na diferença de permeabilidade da membrana plasmática das células aos corantes brometo de etídio e laranja de acridina (BE/LA). O corante laranja de acridina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) é permeável à membrana intacta e confere fluorescência verde às células; já o brometo de etídio é impermeável na concentração 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, e é capaz de se intercalar ao DNA fragmentado das células apoptóticas, conferindo-lhes fluorescência laranja. Assim, as células viáveis apresentam fluorescência verde com núcleo uniforme; as células em apoptose inicial apresentam membranas intactas e, conseqüentemente, núcleo verde, corado de forma não uniforme, com cromatina condensada e fragmentação nuclear; as células em apoptose tardia apresentam núcleo com fluorescência laranja, pois nas fases finais do processo há perda da integridade da membrana, cromatina condensada ou fragmentada e presença de corpos apoptóticos; células necróticas apresentam fluorescência laranja uniforme (RENVOIZE et al., 1998; KOSMIDER et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2004).

Doze horas após o tratamento com as sulfonamidas e a primaína, na CI_{50} de 24 horas, as células neoplásicas (K562, Jurkat e MM.1S) foram lavadas com tampão PBS e o sedimento celular foi suspenso em 40 μL do reagente fluorescente, uma mistura de volumes iguais de laranja de acridina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e de brometo de etídio (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (MAIORAL et al., 2013). Uma alíquota de 25 μL da mistura de células e corantes fluorescentes foi transferida para uma lâmina de vidro, coberta com lamínula e observada em microscópio de fluorescência (Olympus BX-FLA, Olympus®). Campos representativos foram fotografados com câmera fotográfica (Olympus BX40, Olympus®), em aumento de 400 vezes.

4.6.2. Fragmentação de DNA em gel de agarose

Uma das principais características da morte celular por apoptose é a degradação do DNA nuclear em unidades nucleossomais (NAGATA, 2000). Com o objetivo de investigar o padrão de morte celular induzido pelas sulfonamidas e a primina, foi realizado ensaio de eletroforese de DNA em gel de agarose. As células (K562, Jurkat e MM.1S), na concentração de $3,0 \times 10^6$ células/poço, foram tratadas com os compostos na CI_{50} e incubadas durante 24 horas em estufa úmida a $37^\circ C$ com 5 % de CO_2 . Após a incubação, a extração de DNA foi realizada utilizando-se um kit comercial (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen[®]) conforme orientações do fabricante. As amostras de DNA extraídas foram transferidas para um microtubo livre de RNase e DNase e submetidas a eletroforese em gel de agarose 2 %, corado com brometo de etídio (1 $\mu g/mL$). Por fim, foram visualizados os padrões de separação do DNA formados e fotografados sob iluminação UV de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT, Biosystems[®]). Como controle positivo para apoptose, as células foram tratadas com paclitaxel 10 μM nas mesmas condições anteriores.

4.6.3. Expressão dos resíduos de fosfatidilserina

Com o propósito de confirmar a morte das células neoplásicas por apoptose, neste estudo foi avaliada a expressão dos resíduos de fosfatidilserina. Considerando que um dos primeiros sinais do processo apoptótico é a externalização dos resíduos de fosfatidilserina na membrana plasmática celular, é possível identificar e quantificar as células apoptóticas, pois estes resíduos de fosfatidilserina ligam-se a anexina V quando em solução (KOOPMAN et al., 1994; VAN ENGELAND et al., 1998).

As células (K562, Jurkat e MM.1S), na concentração de 5×10^5 células/poço, foram tratadas com os compostos nas CI_{50} e incubadas durante 12 horas em estufa úmida a $37^\circ C$ com 5 % de CO_2 . Após esse período, as células foram lavadas com tampão PBS e foi realizada a marcação celular com o kit comercial Annexin V- FITC Apoptosis Detection (Immunostep[®]) conforme as recomendações do fabricante. Assim, após a lavagem das células, o sedimento celular foi suspenso em 1 mL do tampão de anexina fornecido pelo fabricante. Desta suspensão foi retirada uma alíquota de 100 μL , na qual foi adicionado 5 μL de Annexin V – FITC. Após a incubação por 15 minutos, em temperatura

ambiente e no escuro, foi adicionado 400 μ L de tampão PBS na solução e realizada a aquisição da amostra no citômetro de fluxo.

O controle de marcação celular no experimento foi preparado com as células sem tratamento, a fim de definir a quantidade inicial de células já positivas para a marcação com Anexina-V. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson®) e os resultados analisados no *software Infinicyt* (Cytognos®) versão 1.7. Foram adquiridos 10.000 eventos e os dupletes foram retirados utilizando-se as características de *Forward Scatter* (FSC) *High* e FSC área das células.

4.7. INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO CICLO CELULAR COM A MORTE CELULAR

Para avaliar os efeitos das sulfonamidas sintéticas sobre as fases do ciclo celular, foi utilizado o *PI/RNASE Solution Kit* (Immunostep®), cujo princípio consiste na coloração dos ácidos nucléicos pelo iodeto de propídio (PI) após a digestão do RNA. O PI, dependendo da fase do ciclo celular e de acordo com as variações no conteúdo de DNA, emite diferentes intensidades de fluorescência que, por sua vez, são captadas pelos detectores fotomultiplicadores do citômetro de fluxo por variações no conteúdo de DNA celular, e, dessa forma, quantifica a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular (POZAROWSKI; DARZYNKIEWICZ, 2004).

As células (5×10^5 células/poço) foram tratadas durante 12 horas com os compostos estudados, na CI_{50} de 24 horas correspondente a linhagem celular, e incubadas em estufa úmida a 37 °C contendo 5 % de CO_2 . Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS. O procedimento de marcação celular foi realizado conforme recomendações do fabricante do kit. Assim, as células foram fixadas com etanol 70 % e incubadas durante 30 minutos a -4 °C. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS contendo 2 % de albumina bovina e centrifugadas em $264 \times g$ durante 10 minutos. Por fim, foi adicionado ao sedimento celular a solução de PI contendo RNase. A suspensão foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente antes da aquisição no citômetro de fluxo BD FACSCanto II e, posteriormente, foram analisadas no *software Infinicyt* (Cytognos®) versão 1.7. Foram adquiridos 20.000 eventos com *gate* no canal PE (510 - 595 nm). O controle negativo foi preparado com células sem tratamento para caracterização dos parâmetros a serem analisados no citômetro de fluxo.

4.8. AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL NO MECANISMO DE MORTE CELULAR

Para avaliar os efeitos das sulfonamidas e da primina no potencial mitocondrial das células neoplásicas, foi utilizado o *kit MitoView 633* (Biotium®). Segundo o fabricante, o MitoView 633 é composto por um corante mitocondrial fluorescente, capaz de emitir luz no comprimento de onda correspondente à cor vermelha (648 nm). Esse corante, ao ser colocado em contato com a solução de células, se difunde através da membrana plasmática e se acumula na mitocôndria em concentrações nanomolares. As mitocôndrias com potencial fisiológico íntegro são coradas com o MitoView 633 e fluorescem devido ao acúmulo do corante no ambiente lipídico das mitocôndrias. Quando há diminuição no potencial mitocondrial, induzido por algum fator externo, as mitocôndrias perdem essa fluorescência, em consequência da baixa quantidade do corante em seu interior.

Assim, como nos experimentos anteriores, as células ($5,0 \times 10^5$ células/poço) foram tratadas na CI_{50} (24 horas) de cada composto correspondente e incubadas durante 12 horas em estufa úmida a 37 °C com 5 % de CO_2 . Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas a $264 \times g$ por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, sobre o sedimento celular foi adicionada a solução de MitoView 633 diluído 1:10.000, de acordo com as instruções do fabricante. Após a adição do corante, as células foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente (20 a 25 °C) e ao abrigo da luz. Por fim, as placas contendo as células foram novamente centrifugadas, o sobrenadante descartado e o sedimento suspenso em PBS. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II e analisadas no *software Infinicyt* versão 1.7 (Citognos®). Em cada experimento foram adquiridos 10.000 eventos e os dupletes foram retirados utilizando-se as características de *FSC High* e *Side Scatter* (SSC) área das células. O controle negativo foi preparado com células sem tratamento para caracterização dos parâmetros a serem analisados no citômetro de fluxo.

4.9. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS COM A MORTE CELULAR

Após a identificação do tipo de morte celular, foram estudadas proteínas que poderiam estar envolvidas com o mecanismo de morte. As células (5×10^5 /poço) foram tratadas com os compostos, na CI_{50} , e incubadas por 12 horas em estufa úmida a 37 °C a 5 % de CO_2 . Após o

período de incubação, as células foram centrifugadas durante 10 minutos a 264 x g e o sobrenadante foi removido e, posteriormente, o sedimento celular foi lavado duas vezes com PBS. Nos tubos de amostra em foram marcadas as proteínas Bax, Bcl-2, Bcl-xL, AIF, Survivina, Ki-67 e Caspase-3, inicialmente foi feita a permeabilização da membrana citoplasmática com o permeabilizante *BD Fix/Perm* (Becton Dickinson Immunocytometry Systems®), pois os epítomos de ligação dos anticorpos nas proteínas são intracelulares.

Após 20 minutos de incubação a 8 °C, as células foram lavadas com tampão de lavagem *Fix/Perm*. Posteriormente, as células foram incubadas com os volumes de anticorpos estabelecidos pelos fabricantes, a 8 °C ao abrigo da luz. A marcação de Bax, Bcl-2 e Caspase-3 foi feita no mesmo tubo de amostra, utilizando-se diferentes fluorocromos para cada um dos anticorpos. As demais proteínas foram marcadas em tubos independentes de amostras, pois os anticorpos eram conjugados com fluorocromos que coincidiam com aqueles utilizados no tubo anterior (Quadro 1).

Quadro 1 - Anticorpos utilizados na análise de proteínas relacionadas com a morte celular

Marcador	Clone	Fabricante	Código do Catálogo	Volume Utilizado	Fluorocromo
Bcl-2	124	Dako - Agilent Technologies	M0887	5 µL	FITC
Bax	B-9	Santa Cruz Biotechnology	sc-7480	5 µL	PerCP
FasR	B-10	Santa Cruz Biotechnology	sc-8009	5 µL	PE
AIF	E-1	Santa Cruz Biotechnology	sc-13116	5 µL	FITC
Caspase-3	E-8	Santa Cruz Biotechnology	sc-7272	5 µL	PE
Ki-67	Ki-67	Santa Cruz Biotechnology	sc-23900	5 µL	FITC
Survivina	91630	RD Systems	IC6472P	7 µL	PE

Fonte: Própria

Por fim, as células foram lavadas e suspensas com PBS para a aquisição no citômetro de fluxo BD FACSCanto II. Após adquiridas, os arquivos de resultados foram avaliados no *software Infinicyt* versão 1.7 (Citognos®). O controle negativo foi preparado com células sem tratamento. Em cada experimento foram adquiridos 10.000 eventos e os

dupletes foram retirados utilizando-se as características de FSC *High* e SSC área das células.

4.10. TESTE DE HEMÓLISE

Também foi avaliada a capacidade dos compostos citotóxicos de induzir ruptura na membrana dos eritrócitos, consequentemente hemólise e extravasamento do conteúdo celular.

Para o ensaio, as amostras de SP de seis doadores saudáveis, não fumantes e voluntários foram coletadas por punção venosa em tubo com anticoagulante citrato de sódio e processadas em até três horas. Todos os indivíduos assinaram o TCLE presente no projeto de pesquisa aprovado pelo CEPESH-UFSC sob parecer nº 746.486 /2014.

Os eritrócitos foram isolados do restante do conteúdo sanguíneo (plasma e leucócitos) por centrifugação (10 minutos em 264 x g), lavagens com solução salina (cloreto de sódio 0,9 %) e descarte do sobrenadante. O sedimento de eritrócitos foi diluído a fim de obter a dispersão estoque, com valor de absorbância entre 1,8 e 2,2, quando lida em espectrofotômetro a 540 nm. A partir da dispersão de estoque de eritrócitos foram montados os ensaios: controle negativo ou zero por cento de hemólise (50 µL de dispersão de eritrócitos com adição de 950 µL de salina), controle positivo ou 100 % de lise celular (50 µL de dispersão de eritrócitos com adição de 950 µL de água destilada) e amostras testes (50 µL de dispersão de eritrócitos com adição de 950 µL de solução salina contendo diferentes concentrações dos compostos analisados). Cada amostra foi incubada a 37 °C por 1 hora sobre agitação de 100 x g (WANG, J.-J. et al., 2009). Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 500 x g por 5 minutos e a absorbância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro Microwell Systems a 540 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A taxa de hemólise foi calculada (Equação 2) de acordo com a densidade óptica de cada amostra e controles, que demonstram a quantidade de hemoglobina liberada no sobrenadante devido a ruptura dos eritrócitos.

Equação 2 - Cálculo da taxa de hemólise

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

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

Fonte: Própria

4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos experimentos foram expressos como a média \pm erro-padrão da média (EPM). Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes. Para a avaliação do efeito dos compostos em células neoplásicas, para a avaliação da expressão da fosfatidilserina e da alteração do potencial mitocondrial, foi utilizado o teste t, comparando cada ponto com o grupo controle. Os testes de citotoxicidade em células neoplásicas, células não neoplásicas e células mononucleadas de SP foram avaliados estatisticamente utilizando-se a análise de variância (ANOVA) *one way* ou *two way*, complementada pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. A análise estatística do ciclo celular e a avaliação da expressão das proteínas pró e antiapoptóticas foram realizadas por ANOVA *one way* seguida de Bonferroni. Em todas as análises foi adotado um nível de confiança de 95 %. Para a análise dos resultados e testes estatísticos foram utilizados os *softwares* GraphPad Prism 6 e SPSS IBM v.22.

5. RESULTADOS

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos nos experimentos realizados durante o estudo, conforme descrito anteriormente na seção materiais e métodos.

5.1. EFEITO CITOTÓXICO DE SULFONAMIDAS SINTÉTICAS SOBRE LINHAGENS CELULARES DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Com o propósito de conduzir o estudo somente com os compostos que demonstrassem potencial atividade citotóxica, inicialmente foi realizada uma triagem com 26 sulfonamidas sintéticas (Série DFS e Série Gli) (Figura 8, Figura 9 e Figura 10) sobre três diferentes linhagens celulares de neoplasias hematológicas (K562, Jurkat e MM.1S). O efeito citotóxico nas linhagens celulares de neoplasias hematológicas foi avaliada pelo método do MTT, após 24 horas de incubação com os compostos na concentração de 100 μ M. A viabilidade celular obtida após a incubação com cada composto foi comparada com um grupo controle (células não tratadas). Os resultados de viabilidade celular após tratamento com somente o solvente DMSO não foram exibidos por não apresentarem diferenças em relação o grupo controle de células sem tratamento.

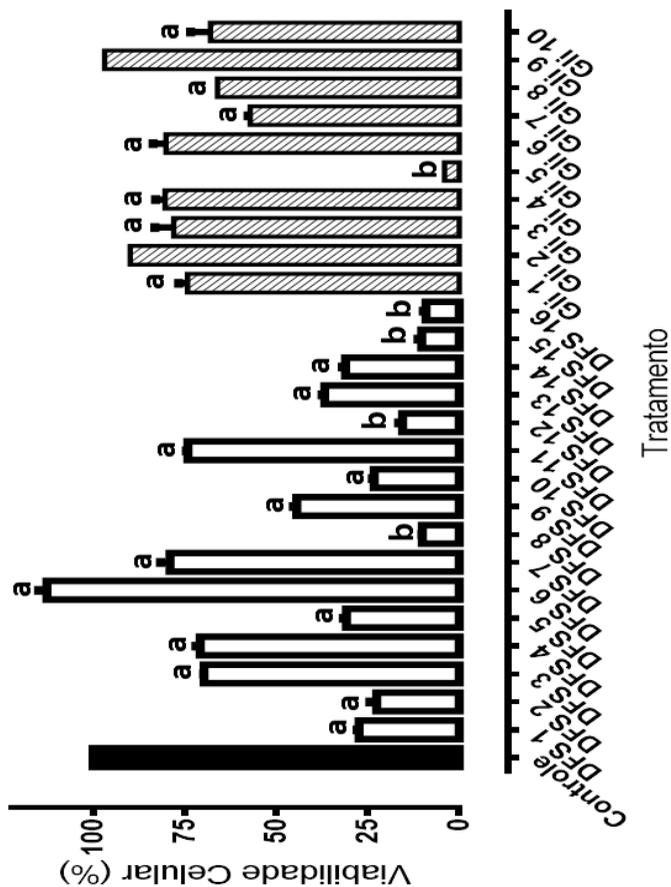
A escolha dos compostos de cada série para a realização da curva concentração-resposta foi realizada de acordo com o seguinte critério: para cada linhagem celular foram escolhidos os compostos que apresentaram maior citotoxicidade na triagem. Assim, as sulfonamidas selecionadas para a realização das curvas concentração resposta foram: **DFS8, DFS12, DFS15, DFS16** e **Gli5** para a linhagem celular K562; **DFS12, DFS15, DFS16** e **Gli5** para a linhagem celular Jurkat e **DFS8, DFS15, DFS16** e **Gli5** para a linhagem celular MM.1S.

O efeito citotóxico das sulfonamidas **DFS8, DFS12, DFS15, DFS16** e **Gli5** foi avaliado em diferentes concentrações (1, 5, 10, 25, 50 e 100 μ M) sobre as células K562, Jurkat e MM.1S. Conforme mostra a Figura 11, as cinco sulfonamidas avaliadas apresentaram efeito citotóxico nas linhagens celulares escolhidas, pois reduziram significativamente a viabilidade celular de maneira concentração dependente quando comparadas com o grupo controle, às quais se atribuiu a viabilidade de 100 % (células sem tratamento).

Além disso, na Figura 11 é possível observar que a sulfonamida **DFS16** apresentou importante atividade citotóxica, visto que é capaz de diminuir a viabilidade celular em todas as linhagens celulares em

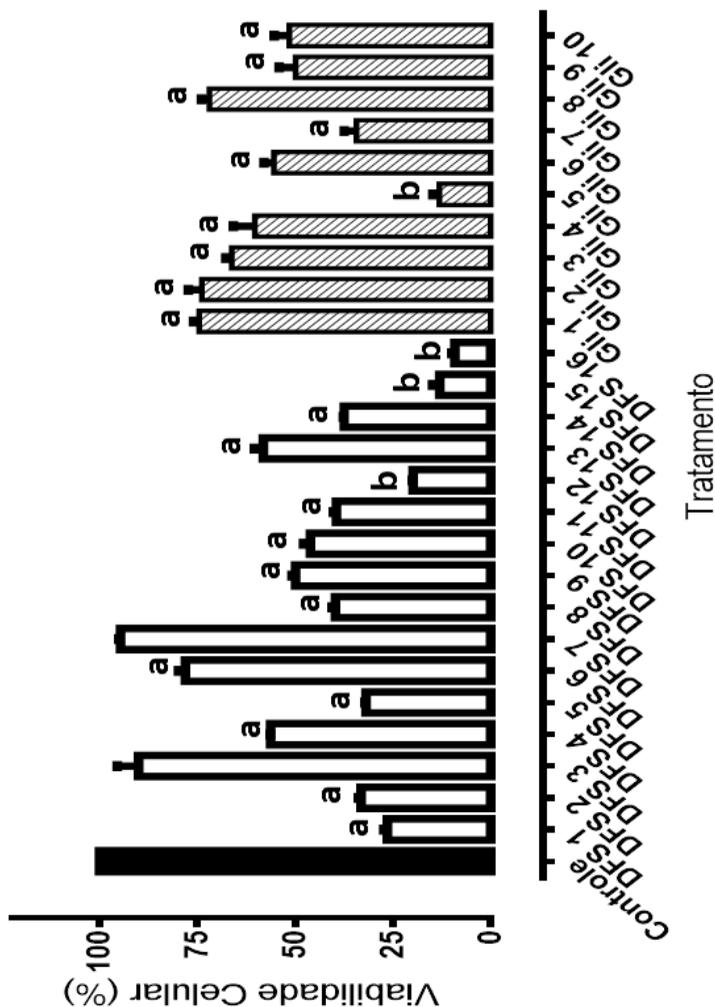
concentrações baixas (1 μM para as células K562 e Jurkat e 5 μM para as células MM.1S).

Figura 8 - Efeito citotóxico dos derivados sulfonamídicos sobre células de linhagem de LMA - K562 (Triagem inicial)



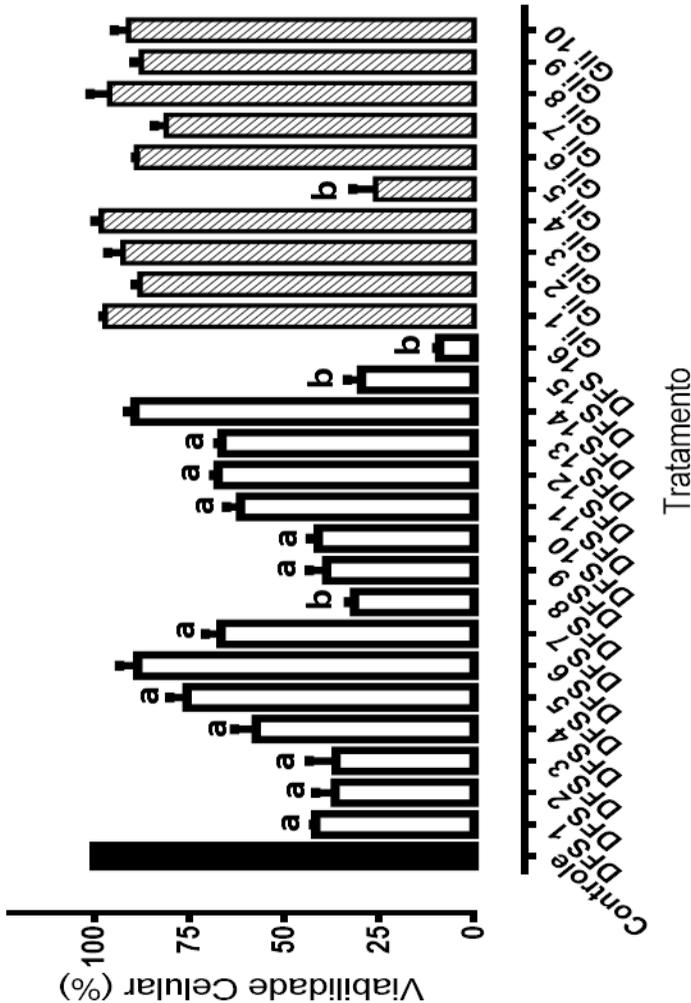
As células K562 (5×10^4 células/poço) foram incubadas com as sulfonamidas sintéticas na concentração de 100 μM por 24 horas. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. ^aDiferença estatística em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, Teste ANOVA *one way*, seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni. ^b Diferença estatística em relação ao grupo controle e com os demais tratamentos, $p \leq 0,05$, Teste ANOVA *one way*, seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Figura 9 - Efeito citotóxico dos derivados sulfonamídicos sobre células da linhagem de LLA – Jurkat (Triagem inicial)



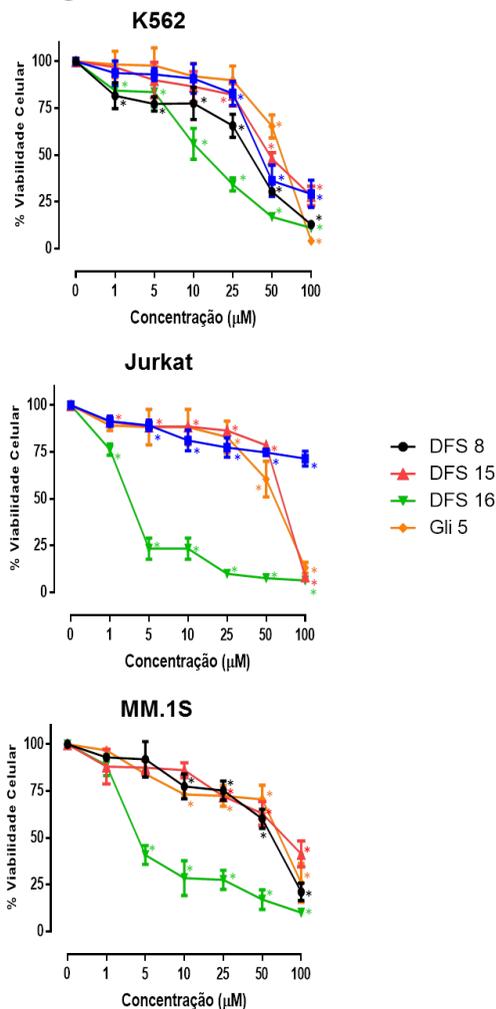
As células Jurkat (1×10^5 células/poço) foram incubadas com as sulfonamidas sintéticas na concentração de $100 \mu\text{M}$ por 24 horas. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. ^aDiferença estatística em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, Teste ANOVA *one way*, seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni. ^b Diferença estatística em relação ao grupo controle e com os demais tratamentos, $p \leq 0,05$, Teste ANOVA *one way*, seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Figura 10- Efeito citotóxico dos derivados sulfonamídicos sobre células de linhagem de mieloma múltiplo - MM.1S (Triagem inicial)



As células MM.1S (5×10^4 células/poço) foram incubadas com as sulfonamidas sintéticas na concentração de $100 \mu\text{M}$ por 24 horas. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. ^aDiferença estatística em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, Teste ANOVA *one way*, seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni. ^b Diferença estatística em relação ao grupo controle e com os demais tratamentos, $p \leq 0,05$, Teste ANOVA *one way*, seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Figura 11- Curvas concentração-resposta dos derivados sulfonamídicos DFS8, DFS12, DFS15, DFS16 e Gli5 frente as diferentes linhagens de neoplasias hematológicas



As células K562 (5×10^4 células/poço), Jurkat (1×10^5 células/poço) e MM.1S (5×10^4 células/poço) foram incubadas com as sulfonamidas sintéticas selecionadas para cada tipo celular, nas concentrações 1, 5, 10, 25, 50 e 100 μM por 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa média \pm EPM de três experimentos independentes. * Diferença significativa em relação ao grupo controle (células sem tratamento), $p \leq 0,05$, ANOVA *one way* seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Quando os compostos foram comparados quanto à citotoxicidade em cada concentração testada, a sulfonamida **DFS16** teve efeito citotóxico mais expressivo do que as demais sulfonamidas nas concentrações de 10, 25 e 50 μM para as células K562, e nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 μM para as células Jurkat, e MM.1S (ANOVA *one way*, $p \leq 0,05$).

Os valores de CI_{50} encontrados para os derivados sulfonamídicos avaliados (Tabela 1) confirmam que a sulfonamida **DFS16** apresentou a diminuição da viabilidade celular mais significativa dentre os compostos avaliados, com CI_{50} de $13,03 \pm 0,34 \mu\text{M}$, $6,13 \pm 0,49 \mu\text{M}$ e $5,53 \pm 0,37 \mu\text{M}$ para as células K562, Jurkat e MM.1S, respectivamente. Sendo assim, a sulfonamida **DFS16** foi selecionada para os demais ensaios na sequência do estudo.

Tabela 1- Valores de CI_{50} obtidos para as células K562, Jurkat e MM.1S após 24 horas de incubação com as sulfonamidas DFS 8, DFS 12, DFS 15, DFS 16 e Gli5

Compostos	Valores de IC_{50} (μM)		
	K562	Jurkat	MM.1S
DFS8	$27,66 \pm 1,10$	-	$51,26 \pm 1,59$
DFS12	$52,68 \pm 1,78$	$142,30 \pm 5,43$	-
DFS15	$55,79 \pm 1,49$	$67,96 \pm 3,71$	$71,73 \pm 1,56$
DFS16	$13,03 \pm 0,34^*$	$6,13 \pm 0,49^*$	$5,53 \pm 0,37^*$
Gli5	$79,28 \pm 3,31$	$58,36 \pm 2,31$	$64,20 \pm 2,47$

* Diferença significativa em relação às demais sulfonamidas avaliadas $p \leq 0,05$, ANOVA *one way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Considerando a disponibilidade de apenas um composto natural da classe das quinonas para este trabalho e que, segundo Efferth e colaboradores (1996), já teve demonstrada a sua potencial atividade citotóxica, optou-se por iniciar os ensaios com a quinona **GE2** pela curva de concentração- e tempo-resposta.

Dessa forma, a viabilidade celular das linhagens celulares K562, Jurkat e MM.1S foi avaliada pelo método do MTT, após a incubação com a sulfonamida **DFS16** ou a quinona **GE2**, nos tempos de 24, 48 e 72 horas, variando-se as concentrações de tratamento, entre 1 e 100 μM .

A Figura 12 ilustra as curvas de concentração e tempo resposta da sulfonamida **DFS16** nas linhagens estudadas. Observa-se que a sulfonamida **DFS16** induz citotoxicidade dependente da concentração em todas as linhagens celulares nos três tempos avaliados. No entanto, essa

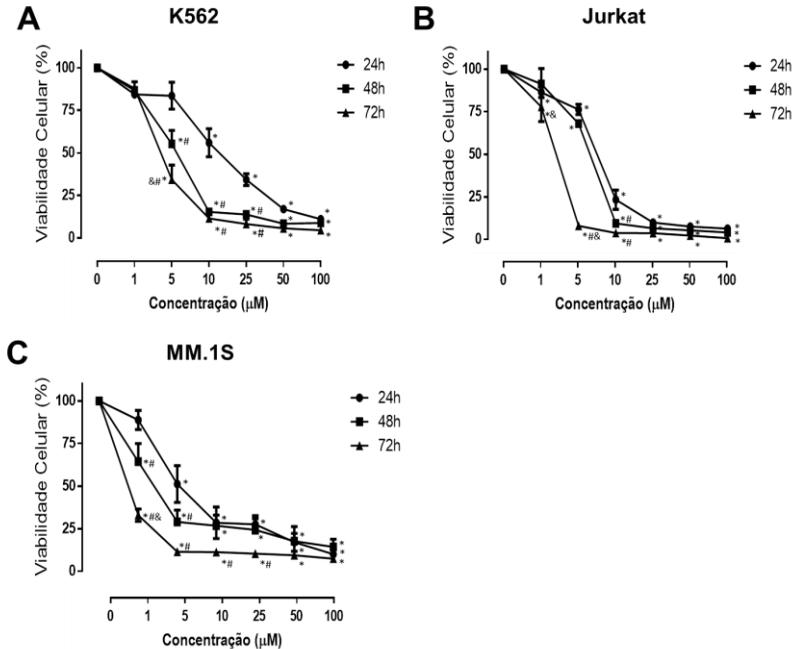
linearidade se mantém até cerca de 25 μM , pois concentrações maiores não resultam em variação significativa da viabilidade celular.

A Figura 13 ilustra as curvas de concentração e tempo resposta da quinona **GE2** nas linhagens estudadas. Observa-se que a quinona **GE2** induz citotoxicidade dependente da concentração em todas as linhagens celulares nos três tempos avaliados. No entanto, essa linearidade se mantém até cerca de 10 μM .

A Figura 12, a Figura 13 e a Tabela 2 demonstram que tanto **DFS16** quanto **GE2** diminuem a viabilidade celular de modo tempo dependente em baixas concentrações, próximas aos valores de CI_{50} . No entanto, a sulfonamida **DFS16** apresentou atividade citotóxica diferente nas células K562 entre os tempos de 24 horas e 48/72 horas, sendo mais efetiva quando a incubação com o composto foi superior a 24 horas. Para o tratamento das células MM.1S com a quinona **GE2**, não há diferença significativa entre a incubação nos tempos de 24 e 48 horas, porém há maior efeito citotóxico quando as células foram incubadas por 72 horas com o composto.

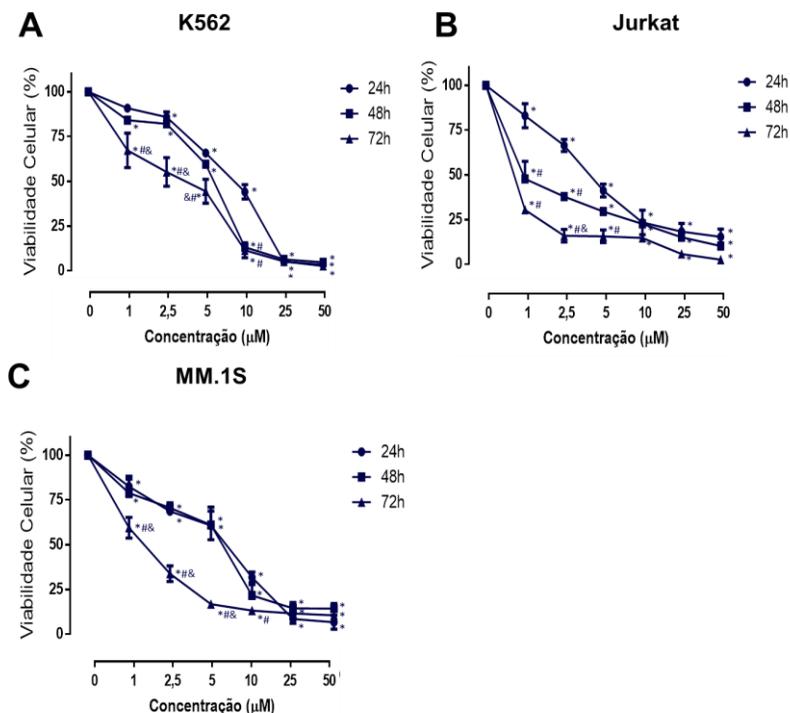
Ainda em relação aos valores de CI_{50} , é possível observar que a sulfonamida **DFS16** e a quinona **GE2** apresentaram valores estatisticamente semelhantes nas três linhagens celulares para os tempos de 24 horas e 48 horas. No entanto, para a sulfonamida **DFS16**, a CI_{50} nas células MM.1S é significativamente menor no tempo de 72 horas em relação às demais linhagens celulares. Para a quinona **GE2**, a CI_{50} nas células Jurkat e MM.1S são significativamente menores no tempo de 72 horas em relação a CI_{50} nas células K562

Figura 12 - Curvas concentração e tempo-resposta da sulfonamida DFS16



Painéis A, B, C: As células K562 (5×10^4 células/poço - 24 horas, $2,5 \times 10^4$ células/poço - 48 horas, $12,5 \times 10^3$ células/poço - 72 horas), Jurkat (1×10^5 células/poço - 24 horas, 5×10^4 células/poço - 48 horas, $2,5 \times 10^4$ células/poço - 72 horas) e MM.1S (5×10^4 células/poço - 24 horas, $2,5 \times 10^4$ células/poço - 48 horas, $12,5 \times 10^3$ células/poço - 72 horas) foram incubadas com a sulfonamida DFS16 nas concentrações 1, 5, 10, 25, 50 e 100 µM. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa média \pm EPM de três experimentos independentes. * Diferença significativa em relação ao grupo controle (células sem tratamento), $p < 0,05$, ANOVA *one way* seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni. # Diferença significativa em relação as mesmas concentrações no tempo de 24 horas, $p \leq 0,05$, ANOVA *two way* seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni. & Diferença significativa em relação as mesmas concentrações no tempo de 48 horas, $p \leq 0,05$, ANOVA *two way* seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Figura 13 - Curvas concentração e tempo-resposta da quinona GE2



Painéis A, B, C: As células K562 (5×10^4 células/poço - 24 horas, $2,5 \times 10^4$ células/poço - 48 horas, $12,5 \times 10^3$ células/poço - 72 horas), Jurkat (1×10^5 células/poço - 24 horas, 5×10^4 células/poço - 48 horas, $2,5 \times 10^4$ células/poço - 72 horas) e MM.1S (5×10^4 células/poço - 24 horas, $2,5 \times 10^4$ células/poço - 48 horas, $12,5 \times 10^3$ células/poço - 72 horas) foram incubadas com a quinona GE2 nas concentrações 1, 2,5, 5, 10, 25 e 50 µM. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa média \pm EPM de três experimentos independentes. * Diferença significativa em relação ao grupo controle (células sem tratamento), $p < 0,05$, ANOVA *one way* seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni. # Diferença significativa em relação as mesmas concentrações no tempo de 24 horas, $p \leq 0,05$, ANOVA *two way* seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni. & Diferença significativa em relação as mesmas concentrações no tempo de 48 horas, $p \leq 0,05$, ANOVA *two way* seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Tabela 2- Valores de CI₅₀ da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 em 24 horas, 48 horas e 72 horas sobre as linhagens K562, Jurkat e MM.1S

Compostos	DFS16 (µM)			GE2 (µM)		
	K562	Jurkat	MM.1S	K562	Jurkat	MM.1S
Tempo/ Células						
24 horas	13,0 ± 0,34	6,13 ± 0,49	5,94 ± 0,34	7,54 ± 0,46	4,16 ± 0,25	5,31 ± 0,28
48 horas	4,32 ± 0,37 ^a	4,64 ± 0,62 ^a	2,87 ± 0,56 ^a	4,93 ± 0,49 ^a	1,50 ± 0,50 ^a	5,11 ± 0,36 ^a
72 horas	2,71 ± 0,35 ^a	1,37 ± 0,89 ^b	0,59 ± 0,20 ^b	2,65 ± 0,30 ^b	0,55 ± 0,14 ^b	1,36 ± 0,36 ^b

^a Diferença significativa em relação ao tempo de 24 horas na mesma linhagem celular, $p \leq 0,05$, teste *t* de Student. ^b Diferença significativa em relação ao tempo de 48 horas na mesma linhagem celular, $p < 0,05$, teste *t* de Student.

5.2. EFEITO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 SOBRE AS FASES DO CICLO CELULAR DAS LINHAGENS DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Quando comparadas ao grupo controle (células sem tratamento), as três linhagens celulares (K562, Jurkat e MM.1S) tratadas com os compostos apresentaram aumento significativo da proporção de células na fase sub G0/G1, o que indica um aumento de morte celular, sugestivo de apoptose (Tabela 3).

Para avaliar se ocorreu bloqueio do ciclo celular em alguma das fases, os dados foram reanalisados, eliminando-se as células que estavam na fase sub G0/G1, ou em morte celular (Tabela 4). Assim, não se observou diferença estatística entre o grupo controle e as células tratadas com os compostos na linhagem celular K562.

Para as células Jurkat, somente a quinona **GE2** causou alteração significativa em uma das fases do ciclo celular, diminuiu de $18,96 \pm 0,59$ % (grupo controle) para $15,17 \pm 0,71$ % a quantidade de células na fase S, no entanto, não foi verificada alteração significativa do número de células em outra fase do ciclo celular (Tabela 4).

A sulfonamida **DFS16** induziu modificações significativas na progressão do ciclo celular da linhagem celular MM.1S: diminuiu de $64,39 \pm 2,46$ % (grupo controle) para $54,44 \pm 0,09$ % o percentual de células na fase G0/G1 ($p = 0,0293$), e aumentou de $16,11 \pm 1,87$ % (grupo controle) para $26,17 \pm 0,49$ % o percentual de células na fase G2/M ($p = 0,0180$), sugerindo bloqueio do ciclo celular nessa fase. A quinona **GE2** não provocou alterações na progressão do ciclo celular da linhagem de células MM.1S (Tabela 4).

Tabela 3 - Efeito da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 nas fases do ciclo celular das linhagens de neoplasias hematológicas

Células	Tratamentos	Sub G0/G1 (%) (Morte celular)	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
K562	Controle	13,56 ± 2,97	61,84 ± 5,75	9,70 ± 0,75	14,90 ± 5,65
	DFS16	45,88 ± 7,27*	35,90 ± 4,00*	7,87 ± 1,75	10,57 ± 1,75
	GE2	29,10 ± 5,92*	52,51 ± 7,51	7,68 ± 0,48*	10,71 ± 2,02
Jurkat	Controle	11,38 ± 1,10	62,56 ± 1,16	16,81 ± 0,67	9,25 ± 1,70
	DFS16	40,95 ± 8,17*	41,53 ± 5,64*	10,31 ± 1,79*	7,45 ± 1,25
	GE2	44,78 ± 10,78*	41,24 ± 8,48*	8,35 ± 1,61*	5,63 ± 1,12*
MM.1S	Controle	14,23 ± 2,39	55,30 ± 3,63	16,70 ± 0,03	13,78 ± 1,26
	DFS16	24,73 ± 4,47	40,98 ± 2,37*	14,57 ± 0,56*	19,72 ± 1,54
	GE2	62,87 ± 3,03*	25,07 ± 3,00*	6,35 ± 0,01*	5,72 ± 0,04*

* Diferença estatística em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, teste t Student.

Tabela 4- Efeito da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 nas fases do ciclo celular das linhagens de neoplasias hematológicas, desconsiderando células na fase sub G0/G1

Células	Tratamentos	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
K562	Controle	71,68 ± 6,84	11,20 ± 0,64	17,10 ± 6,18
	DFS16	66,75 ± 2,16	14,26 ± 1,96	18,98 ± 1,11
	GE2	73,24 ± 4,89	10,88 ± 0,41	15,87 ± 4,55
Jurkat	Controle	70,64 ± 2,18	18,96 ± 0,59	10,39 ± 1,81
	DFS16	69,36 ± 3,36	17,33 ± 1,22	12,64 ± 1,62
	GE2	74,48 ± 2,45	15,17 ± 0,71*	10,34 ± 1,75
MM.1S	Controle	64,39 ± 2,46	19,49 ± 0,58	16,11 ± 1,87
	DFS16	54,44 ± 0,09*	19,38 ± 0,40	26,17 ± 0,49*
	GE2	67,29 ± 2,50	17,21 ± 1,44	15,49 ± 1,15

* Diferença estatística em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, teste t Student.

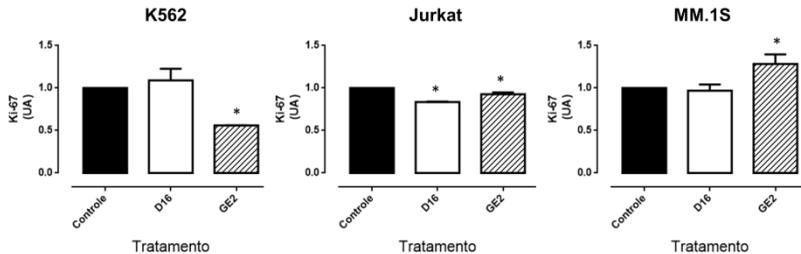
5.3. EFEITO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 SOBRE A PROTEÍNA KI-67

As células K562, Jurkat e MM.1S foram incubadas por 12 horas com os compostos nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas com o objetivo de investigar o efeito do composto na expressão da proteína Ki-67.

Como pode ser observado na Figura 14, a sulfonamida **DFS16** reduziu 16 % a expressão da proteína Ki-67 nas células Jurkat.

Em contraste, a quinona **GE2** diminuiu de forma significativa a expressão de Ki-67 nas células K562 e Jurkat em 44 % e 7 %, respectivamente. No entanto, esse composto aumentou a expressão da proteína em 28 % nas células MM.1S.

Figura 14 - Expressão da proteína Ki-67 nas linhagens celulares tratadas com a sulfonamida DFS16 ou a quinona GE2



As células K562, Jurkat e MM.1S (1×10^6 células/poço), foram incubadas por 12 horas na ausência, grupo controle, e na presença dos compostos nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas. A intensidade média de fluorescência foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-Ki-67. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCantoTM II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* Infinicyt versão 1.7. UA: Unidades Arbitrárias. * Diferença estatística em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, teste t Student.

5.4. EFEITO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 NA INDUÇÃO DA APOPTOSE EM LINHAGENS CELULARES DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

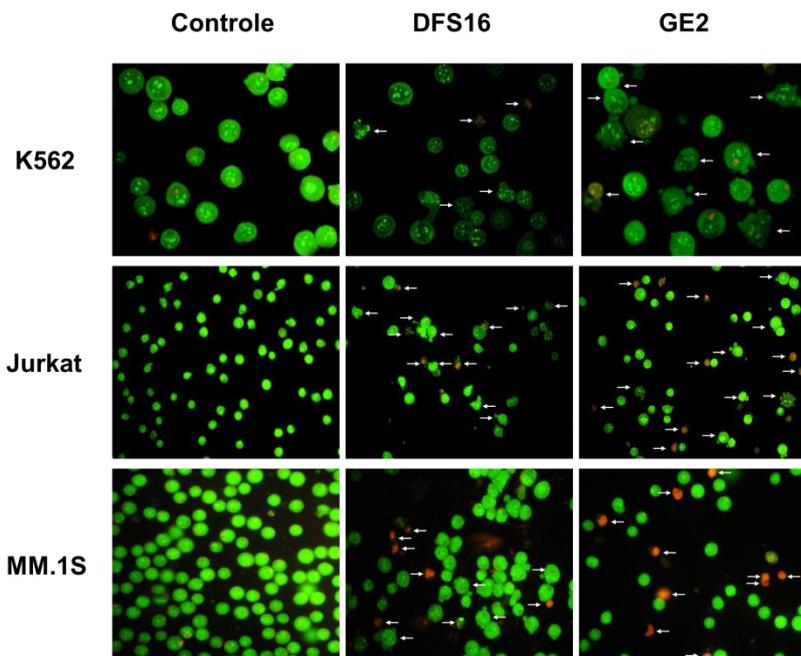
Para avaliar se a sulfonamida **DFS16** e a quinona **GE2** induziram as células K562, Jurkat e MM.1S à morte por apoptose ou necrose, inicialmente foi realizada a observação da morfologia celular por microscopia de fluorescência, após coloração com brometo de etídio e laranja de acridina.

Após 12 horas de tratamento com os compostos nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas, as três linhagens celulares demonstraram características morfológicas típicas de células em apoptose tardias, com formação de corpos apoptóticos e perda de integridade da membrana (indicada pela fluorescência alaranjada) (Figura 15). O tratamento da linhagem celular K562 com os compostos **DFS16** e **GE2** apresentou várias células em apoptose inicial, caracterizadas pela membrana íntegra (indicada pela fluorescência verde) com condensação da cromatina.

A apoptose induzida pelos compostos foi confirmada e quantificada pela externalização da fosfatidilserina, a qual foi detectada pelo método da anexina V conjugada a FITC. Conforme pode ser observado na Figura 16, a sulfonamida **DFS16** e a quinona **GE2**, após 12

horas de incubação em cada linhagem celular com as CI_{50} respectivas, aumentou de forma significativa a expressão dos resíduos de fosfatidilserina na membrana das células nas três linhagens estudadas, indicando morte celular por apoptose.

Figura 15 - Avaliação morfológica da apoptose induzida pela sulfonamida DFS16 e pela quinona GE2 em células K562, Jurkat e MM.1S

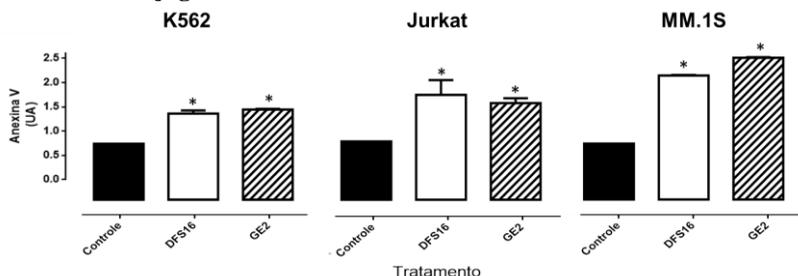


As células (1×10^6 células/poço) foram incubadas com os compostos nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas por 12 horas e então coradas com uma solução 1:1 de brometo de etídio e laranja de acridina. Os grupos controle representam as células sem tratamento. As células foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX41) na magnitude de 400 x e campos representativos foram fotografados com câmera digital (Olympus BX40, Japão). Setas indicam células em apoptose. Os resultados foram obtidos de pelo menos três experimentos independentes.

Ainda na Figura 16, na linhagem celular K562, a sulfonamida **DFS16** induziu um aumento na exposição dos resíduos de fosfatidilserina de $53,7 \pm 0,55$ % em relação ao grupo controle, enquanto a quinona **GE2** ocasionou um aumento de $60,9 \pm 0,11$ %. Para as células Jurkat, os tratamentos com a sulfonamida **DFS16** e com a quinona **GE2** resultaram

em um aumento da exposição de resíduos de fosfatidilserina de $79,8 \pm 2,56$ % e $65,8 \pm 0,83$ %, respectivamente. Por fim, observou-se acréscimo de $121,60 \pm 0,10$ % da externalização de fosfatidilserina induzido pela sulfonamida **DFS16** nas células MM.1S e de $153,4 \pm 0,15$ % em resposta à quinona **GE2**.

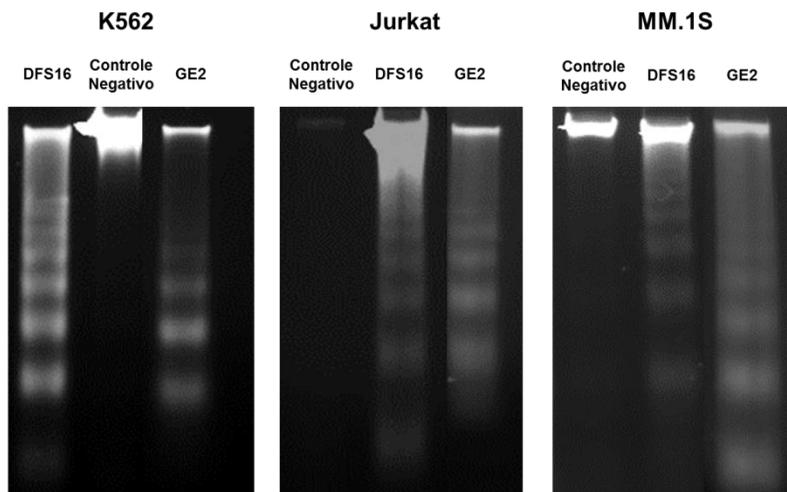
Figura 16 - Efeito da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 na exposição dos resíduos de fosfatidilserina das três linhagens celulares pelo método da Anexina V conjugada a FITC



As células K562, Jurkat e MM.1S (1×10^6 células/poço), foram incubadas por 12 horas na ausência (grupo controle) e na presença dos compostos nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas. A determinação da intensidade de fluorescência média foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o Anexina V conjugada ao fluorocromo FITC. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* Infinicyt versão 1.7. UA: Unidades Arbitrárias. * Diferença estatística em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, teste t Student.

A fim de confirmar a morte celular por apoptose por meio de uma terceira metodologia, as três linhagens celulares foram submetidas ao ensaio de fragmentação do DNA. Como pode ser observado na Figura 17, a sulfonamida **DFS16** e a quinona **GE2** induziram claramente o padrão de fragmentação “em escada”, característico das células mortas por apoptose, o que não pode ser visualizado no grupo controle (células sem tratamento).

Figura 17 - Avaliação da indução da fragmentação do DNA das células K562, Jurkat e MM.1S após tratamento com a sulfonamida DFS16 e com a quinona GE2



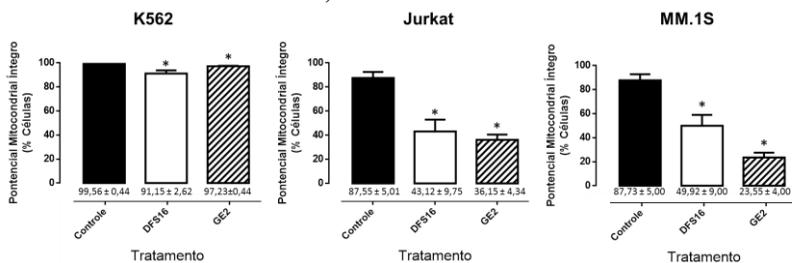
As células (3×10^6 células/poço) foram incubadas com os compostos nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas. Os grupos controle representam as células sem tratamento. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e o DNA foi extraído. O DNA das amostras foi separado por eletroforese em gel de agarose 2 % e corado com brometo de etídio ($1 \mu\text{g/mL}$). Por fim, foram visualizados e fotografados sob iluminação UV de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT® Biosystems).

5.5. INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 SOBRE O POTENCIAL MITOCONDRIAL DAS CÉLULAS K562, JURKAT E MM.1S

Com o objetivo de avaliar se a morte celular causada pelos compostos envolveu a via intrínseca da apoptose, o potencial mitocondrial das células K562, Jurkat e MM.1S foi analisado após 12 horas de tratamento, com cada composto avaliado na CI_{50} de 24 horas para cada linhagem celular.

Como pode ser observado na Figura 18, a sulfonamida **DFS16** e a quinona **GE2** reduziram de forma significativa a porcentagem de células com o potencial mitocondrial intacto em todas as linhagens celulares.

Figura 18- Efeito da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 no potencial mitocondrial das células K562, Jurkat e MM.1S



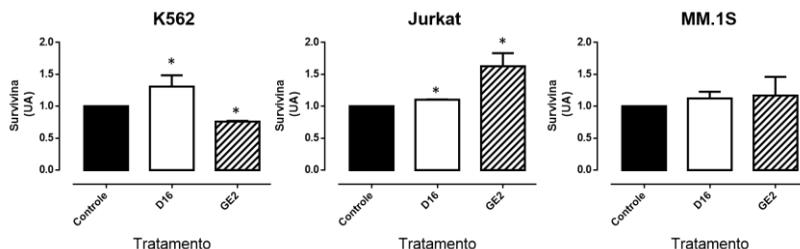
As células K562, Jurkat e MM.1S (1×10^6 células/poço), foram incubadas por 12 horas na ausência (grupo controle), e na presença dos compostos nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas. A determinação do percentual de células com o potencial mitocondrial intacto foi determinada por citometria de fluxo após a utilização do kit MitoView 633. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* Infinicyt versão 1.7 * Diferença estatística em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, teste t Student.

5.6. EFEITO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 SOBRE A PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA SURVIVINA

As células K562, Jurkat e MM.1S foram incubadas por 12 horas com os compostos nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas com o objetivo de testar seus efeitos na expressão da proteína antiapoptótica survivina.

Como pode ser observado na Figura 19, a expressão da survivina nas células K562 aumentou estatisticamente (31 %) quando em tratamento com a sulfonamida **DFS16** e diminuiu (24 %) quando tratadas com a quinona **GE2**. Nas células Jurkat, ambos os compostos induziram o aumento da expressão de survivina, sendo 11 % quando tratadas com a sulfonamida **DFS16** e 63 % quando tratadas com a quinona **GE2**. A expressão de survivina nas células MM.1S não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle quando estas foram tratadas com os compostos.

Figura 19 - Expressão da proteína antiapoptótica survivina nas células K562, Jurkat e MM.1s após o tratamento com a sulfonamida DFS16 ou quinona GE2



As células K562, Jurkat e MM.1S (1×10^6 células/poço), foram incubadas por 12 horas na ausência, grupo controle, e na presença dos compostos nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas. A determinação da intensidade de fluorescência média foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-survivina. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* Infinicyt versão 1.7. UA: Unidades Arbitrárias. * Diferença estatística em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, teste t Student.

5.7. INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 SOBRE A PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA BCL-2 E SOBRE A PROTEÍNA PRÓ-APOPTÓTICA BAX

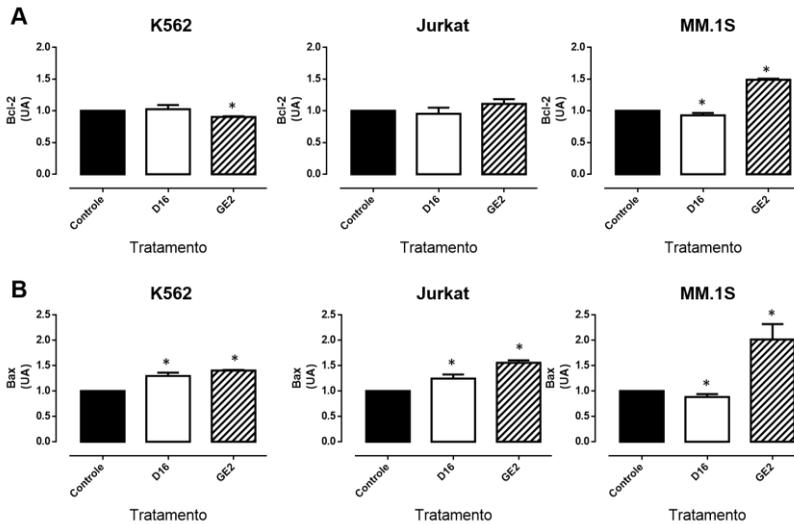
Como pode ser observado na Figura 20, Painel A, a sulfonamida **DFS16** não apresentou diferença estatística da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 nas células K562 e Jurkat após 12 horas de tratamento. Nas células MM.1S, houve diferença significativa após 12 horas de tratamento com a sulfonamida **DFS16**, o que representa uma diminuição na expressão da proteína Bcl-2 de aproximadamente 7%. Ainda na Figura 20, Painel A, é possível verificar que a quinona **GE2** diminuiu 10% na expressão da proteína Bcl-2 nas células K562 e aumentou 49% nas células MM.1S. O tratamento das células Jurkat com a quinona **GE2** não alterou a expressão da proteína Bcl-2.

A Figura 20, Painel B, mostra que a sulfonamida **DFS16** causou aumento respectivamente, de 30% e 25%, na expressão da proteína antiapoptótica Bax nas células K562 e Jurkat, após 12 horas de tratamento. Nas células MM.1S houve diferença significativa após 12 horas de tratamento com a sulfonamida **DFS16**, com uma diminuição na expressão da proteína Bax de aproximadamente 12%. Além disso, na Figura 20, Painel B, é possível observar que a quinona **GE2** aumentou a

expressão da proteína Bax nas células K562, Jurkat e MM.1S em 41 %, 56 % e 101 % em relação ao grupo controle, respectivamente.

Quando analisada a razão entre a proteína antiapoptótica Bcl-2 e a proteína pró-apoptótica Bax (Tabela 5), há o predomínio da expressão da proteína Bax em relação à proteína Bcl-2 em praticamente todas as linhagens celulares tratadas com a sulfonamida **DFS16** ou com a quinona **GE2**. A única exceção ocorreu quando as células MM.1S foram incubadas com a sulfonamida **DFS16**, as quais demonstraram o predomínio da expressão da proteína Bcl-2 em relação a proteína Bax.

Figura 20 - Efeito da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 na expressão das proteínas Bcl-2 (Painel A) e Bax (Painel B) em células K562, Jurkat e MM.1S



As células K562, Jurkat e MM.1S (1×10^6 células/poço), foram incubadas por 12 horas na ausência (grupo controle) e na presença dos compostos nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas. A determinação da intensidade de fluorescência média foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-Bcl-2 e/ou anticorpo anti-Bax. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* Infinicyt versão 1.7. UA: Unidades Arbitrárias. * Diferença estatística em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, teste t Student.

Tabela 5 - Razão entre a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e a proteína pró-apoptótica Bax

Compostos	Células	Bcl-2 (IFM)	Bax (IFM)	Razão Bcl-2/Bax
DFS16	K562	1,024	1,297	0,78
	Jurkat	0,952	1,142	0,84
	MM.1S	0,928	0,883	1,05
GE2	K562	0,903	1,407	0,64
	Jurkat	1,246	1,559	0,80
	MM.1S	1,492	2,018	0,74

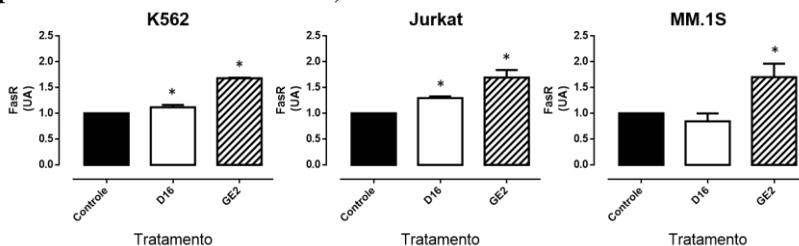
IFM: Intensidade de Fluorescência Média

5.8. EFEITO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 SOBRE O RECEPTOR FAS

Como pode ser observado na Figura 21, a sulfonamida **DFS16** aumentou a expressão de FasR nas células K562 e Jurkat de forma significativa após 12 horas de tratamento em aproximadamente 12 % e 30 %, respectivamente. No entanto, não alterou a expressão de FasR nas células MM.1S.

Além disso, houve um aumento significativo na expressão do receptor Fas em todas as linhagens celulares tratadas com a quinona **GE2**, com acréscimo de 68 %, 69 % e 70 % em relação ao grupo controle nas células K562, Jurkat e MM.1S, respectivamente (Figura 21).

Figura 21 - Efeito da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 na expressão da proteína FasR em células K562, Jurkat e MM.1S



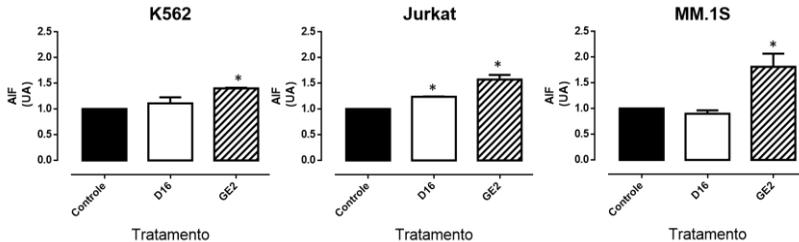
As células K562, Jurkat e MM.1S (1×10^6 células/poço), foram incubadas por 12 horas na ausência (grupo controle) e na presença dos compostos nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas. A determinação da intensidade de fluorescência média foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-FasR. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCantoTM II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e

avaliadas pelo *software* Infinicyt versão 1.7. UA: Unidades Arbitrárias. * Diferença estatística em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, teste *t* Student.

5.9. EFEITO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 SOBRE O FATOR INDUTOR DE APOPTOSE (AIF)

Como pode ser observado na Figura 22, a sulfonamida **DFS16** aumentou significativamente a expressão do AIF em 24 % nas células Jurkat; no entanto, não houve diferença estatística em relação ao grupo controle nas células K562 e MM.1S. Já a quinona **GE2** aumentou a expressão de AIF significativamente em 40 %, 57 % e 81 % nas células K562, Jurkat e MM.1S, respectivamente.

Figura 22 - Efeito da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 na expressão da proteína AIF em células K562, Jurkat e MM.1S

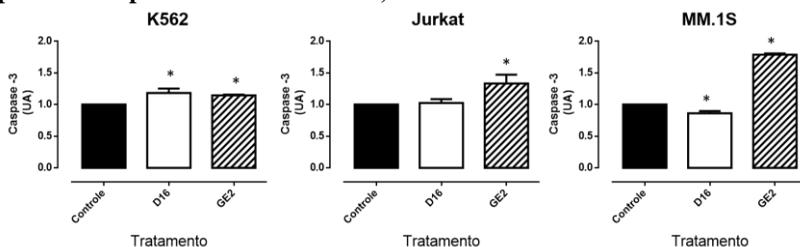


As células K562, Jurkat e MM.1S (1×10^6 células/poço), foram incubadas por 12 horas na ausência, grupo controle, e na presença dos compostos nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas. A determinação da intensidade de fluorescência média foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-AIF. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* Infinicyt versão 1.7. UA: Unidades Arbitrárias. * Diferença estatística em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, teste *t* Student.

5.10. EFEITO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 SOBRE A CASPASE-3

Como pode ser observado na Figura 23, a sulfonamida **DFS16** aumentou significativamente a expressão da caspase-3 em 18 % nas células K562, não houve diferença significativa em relação ao grupo controle nas células Jurkat, e diminuiu de forma significativa (14 %) nas células MM.1S. A quinona **GE2** aumentou 15 %, 34 % e 79 % a expressão de caspase-3 nas células K562, Jurkat e MM.1S, respectivamente.

Figura 23 - Efeito da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 na expressão da proteína caspase-3 em células K562, Jurkat e MM.1S



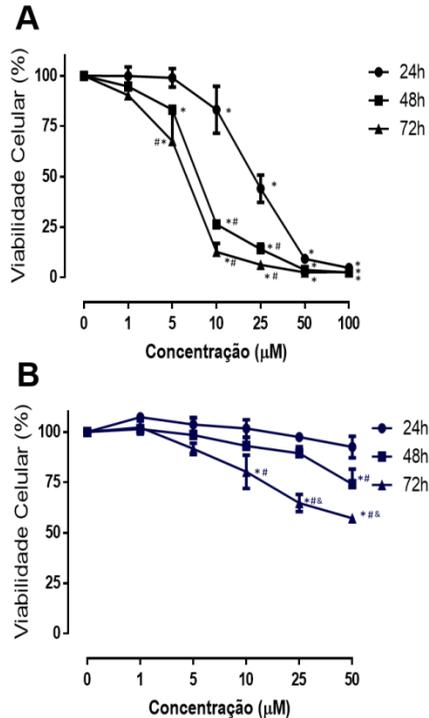
As células K562, Jurkat e MM.1S (1×10^6 células/poço), foram incubadas por 12 horas na ausência, grupo controle, e na presença dos compostos nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas. A determinação da intensidade de fluorescência média foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-Caspase-3. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* Infinicyt versão 1.7. UA: Unidades Arbitrárias. * Diferença estatística em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, teste *t* Student.

5.11. EFEITO CITOTÓXICO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 SOBRE UMA LINHAGEM CELULAR DE FIBROBLASTOS MURINOS

O efeito citotóxico da sulfonamida **DFS16** e da quinona **GE2** foi avaliado em células de fibroblastos murinos (L-929) como um modelo de células não neoplásicas. Os resultados mostram que a viabilidade das células L-929 tratadas com a sulfonamida **DFS16** diminui de forma concentração e tempo dependentes. Esses resultados são mais proeminentes nos tempos de 48 horas e 72 horas. Para as células L-929 tratadas com a quinona **GE2** somente há diferença significativa em relação ao grupo controle na concentração de $50 \mu\text{M}$ no tempo de 48 horas, ou acima de $10 \mu\text{M}$ no tempo de 72 horas (Figura 24).

Em relação aos valores de CI_{50} (Tabela 6), é possível inferir que os valores obtidos no tratamento das células L-929 com a sulfonamida **DFS16** e com a quinona **GE2** são diferentes estatisticamente dos encontrados para as linhagens celulares neoplásicas nos tempos de 24 horas e 48 horas. No entanto, a CI_{50} em 72 horas apresenta semelhança de valores para as linhagens celulares L-929 e K562.

Figura 24 - Efeito citotóxico da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 sobre uma linhagem celular de fibroblastos murinos (L-929)



Painel A: As células L-929 ($5,0 \times 10^4$ células/poço- 24 horas, $2,5 \times 10^4$ células/poço- 48 horas, $12,5 \times 10^3$ células/poço – 72 horas) foram incubadas com a sulfonamida DFS16 nas concentrações 1, 5, 10, 25, 50 e 100 μM . **Painel B:** As células L-929 ($5,0 \times 10^4$ células/poço- 24 horas, $2,5 \times 10^4$ células/poço- 48 horas, $12,5 \times 10^3$ células/poço – 72 horas) foram incubadas com a quinona GE2 nas concentrações 1, 5, 10, 25 e 50 μM . A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa média \pm EPM de três experimentos independentes. * Diferença significativa em relação ao grupo controle (células sem tratamento), $p \leq 0,05$, ANOVA *one way* seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni. # Diferença significativa em relação as iguais concentrações no tempo de 24 horas, $p \leq 0,05$, ANOVA *two way* seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni. & Diferença significativa em relação as iguais concentrações no tempo de 48 horas, $p \leq 0,05$, ANOVA *two way* seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Tabela 6 - Valores de CI_{50} da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 em 24, 48 e 72 horas sobre a linhagem celular de fibroblastos murinos (L-929)

Tempo	CI_{50} (μM)	
	DFS 16	GE 2
24 horas	20,94 \pm 1,35*	936,5 \pm 111,26*
48 horas	7,23 \pm 0,68*	166,90 \pm 5,25*
72 horas	4,67 \pm 0,62	54,64 \pm 1,21*

*Diferença significativa em relação as demais linhagens celulares no mesmo tempo de incubação, $p \leq 0,05$, teste ANOVA *one way* seguido de teste post-hoc de Bonferroni.

5.12. AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE CELULAR DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2

Para avaliar se os compostos são seletivos para um tipo celular, foi calculado o índice de seletividade (IS), pela divisão da CI_{50} de 24 horas de uma linhagem celular pela CI_{50} da outra linhagem celular, para a qual se investiga se o composto é seletivo. Conforme pode ser verificado na Tabela 7, a sulfonamida **DFS16** parece ser mais seletiva para a linhagem celular MM.1S em relação às outras duas linhagens celulares neoplásicas. A quinona **GE2** não parece ser seletiva para nenhuma das linhagens celulares de neoplasias hematológicas.

No entanto, quando comparado o índice de seletividade em linhagem celular normal, a sulfonamida DFS16 apresentou moderada seletividade quando comparadas com as células K562, porém apresenta alta seletividade em relação as demais linhagens celulares (Jurkat e MM.1S).

A quinona **GE2** mostrou excelente seletividade para as células neoplásicas, quando comparadas com a linhagem de células normais.

Tabela 7 - Índice de Seletividade da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2

Compostos	Células	Numerador			
		Células Neoplásicas			Célula Normal
		K562	Jurkat	MM.1S	L-929
DFS16 (CI₅₀)	K562	-	0,47	0,46	1,61
	Jurkat	2,12	-	0,96	3,41
	MM.1S	2,18	1,03	-	3,52
GE2 (CI₅₀)	K562	-	0,55	0,70	124,20
	Jurkat	1,81	-	1,28	225,12
	MM.1S	1,42	0,78	-	176,36

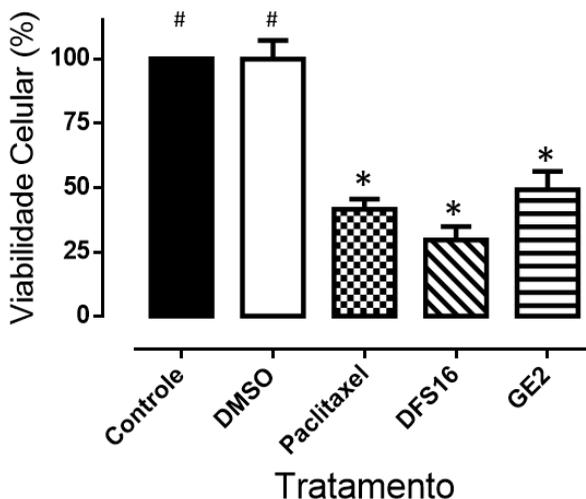
Não seletivo: 0 – 1; Baixa seletividade: 1 - 2; moderada seletividade: 2 – 3; alta seletividade: >3.

5.13. EFEITO CITOTÓXICO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2 EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

A fim de continuar investigando o possível efeito não citotóxico da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 em células normais, células mononucleadas de SP de seis indivíduos saudáveis foram incubadas com a CI₅₀ de cada composto por 24 horas.

Conforme pode ser observado na Figura 25, o paclitaxel, a sulfonamida **DFS16** e a quinona **GE2** diminuiram a viabilidade celular de células mononucleadas para 41,54 %, 29,68 % e 19,14 %, respectivamente. O solvente DMSO não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle de células sem tratamento. Além disso, verificou-se que os valores encontrados para a sulfonamida **DFS16** e a quinona **GE2** foram semelhantes ao obtido para o paclitaxel.

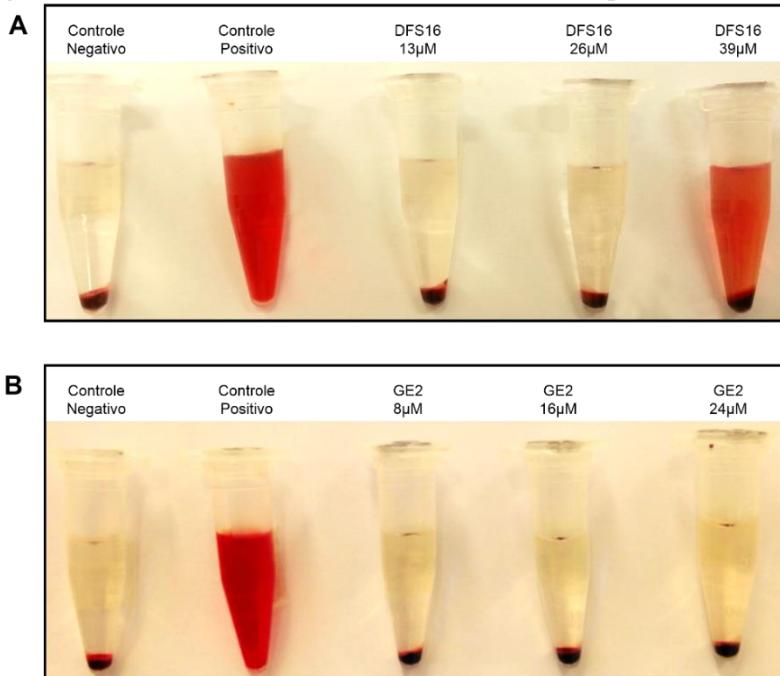
Figura 25 - Efeito citotóxico da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2 sobre células mononucleadas de indivíduos saudáveis.



As células mononucleadas ($1,0 \times 10^6$ células/poço) foram incubadas por 24 horas com os compostos nas suas CI_{50} , exceto o DMSO, que foi utilizado na maior concentração utilizada nos experimentos. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (células sem tratamento) foi definida como 100 % de viabilidade celular. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, ANOVA *one way* seguido de teste *post-hoc* de Tukey. #Diferença estatisticamente significativa em relação ao paclitaxel, $p \leq 0,05$, ANOVA *one way* seguido de teste *post-hoc* de Tukey.

5.14. AVALIAÇÃO DO EFEITO HEMOLÍTICO DA SULFONAMIDA DFS16 E DA QUINONA GE2

O teste de hemólise utilizou sangue venoso de seis indivíduos saudáveis para o preparo da solução de hemácias. A sulfonamida **DFS16** e a quinona **GE2** foram avaliadas nas concentrações respectivas às suas CI_{50} , dobro da CI_{50} e triplo da CI_{50} . Para o controle negativo foi utilizada solução salina e para o controle positivo foi utilizada água destilada. Como pode ser observado na Figura 26, os compostos avaliados não provocaram hemólise significativa ($p \leq 0,05$, Teste *t* Student), com valores de 0,29 %, 1,18 % e 24,10 % para a sulfonamida **DFS16** e 1,68 %, 1,92 % e 2,83 % para a quinona **GE2**.

Figura 26 - Efeito hemolítico da sulfonamida DFS16 e da quinona GE2

As amostras de sangue venoso foram coletadas em tubo contendo citrato de sódio e a solução de hemácias foi preparada conforme o protocolo experimental. Os ensaios foram realizados em triplicata, com pelo menos três amostras coletadas de diferentes indivíduos.

5.15. SÚMARIO DE RESULTADOS

Para compreensão geral deste estudo, a Tabela 8 apresenta um sumário dos resultados obtidos.

Tabela 8 - Sumário de Resultados

Linagem Celular	DFS16				GE2				
	K562	Jurkat	MM.1S	K562	Jurkat	MM.1S	K562	Jurkat	MM.1S
Cl ₅₀ (µM) – 24 horas	13,0	6,13	5,94	7,54	4,16	5,31	4,16	4,16	5,31
Externalização dos resíduos de fosfatidilserina	↑ 54 %	↑ 80 %	↑ 122 %	↑ 61 %	↑ 66 %	↑ 153 %	↑ 61 %	↑ 66 %	↑ 153 %
Morfologia celular em BE/LA	Apoptose	Apoptose	Apoptose	Apoptose	Apoptose	Apoptose	Apoptose	Apoptose	Apoptose
Fragmentação de DNA	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Bloqueio do Ciclo Celular	-	-	Fase G2/M	-	-	-	-	-	-
Expressão de KI-67	-	↓ 16 %	-	↓ 44 %	↓ 7 %	↑ 28 %	↓ 44 %	↓ 7 %	↑ 28 %
Potencial mitocondrial intacto	↓ 8 %	↓ 44 %	↓ 38 %	↓ 2 %	↓ 51 %	↓ 64 %	↓ 2 %	↓ 51 %	↓ 64 %
Expressão de Survivina	↑ 31 %	↑ 11 %	-	↓ 24 %	↑ 63 %	-	↓ 24 %	↑ 63 %	-
Expressão de Bcl-2	-	-	↓ 7 %	↓ 10 %	-	↑ 49 %	↓ 10 %	-	↑ 49 %
Expressão de Bax	↑ 30 %	↑ 25 %	↓ 12 %	↑ 41 %	↑ 56 %	↑ 101 %	↑ 41 %	↑ 56 %	↑ 101 %
Expressão de FasR	↑ 12 %	↑ 30 %	-	↑ 68 %	↑ 69 %	↑ 70 %	↑ 68 %	↑ 69 %	↑ 70 %
Expressão de AIF	-	↑ 24 %	-	↑ 40 %	↑ 57 %	↑ 81 %	↑ 40 %	↑ 57 %	↑ 81 %
Expressão de Caspase-3	↑ 18 %	-	↓ 14 %	↑ 15 %	↑ 34 %	↑ 78 %	↑ 15 %	↑ 34 %	↑ 78 %

BE/LA: Brometo de Etídio e Laranja de Acridina; DNA: Ácido Desoxirribonucleico; AIF: Fator Indutor da Apoptose; CI50: Concentração Inibitória de 50%.

6. DISCUSSÃO

Apesar do câncer ter sido descrito há várias décadas, e mesmo considerando os grandes avanços nas pesquisas básicas e clínicas, sua etiologia não está totalmente esclarecida, e, por isso, permanece sendo uma das principais causas de morte no mundo. Embora o uso de quimioterápicos seja relatado desde meados de 1900, altas taxas de mortalidade ainda estão relacionadas com o insucesso no tratamento, pois até o momento não há uma terapia anticâncer totalmente eficaz e segura (PETERS; BROWN, 2015).

Estratégias terapêuticas atuais incluem uma variedade de fármacos quimioterápicos e agentes hormonais que interferem na homeostasia celular e induzem as células à morte (SUDHAKAR, 2009; URRUTICOECHEA et al., 2010; HOJJAT-FARSANGI, 2015). No entanto, esses tratamentos apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade associadas à baixa especificidade celular, e por isso são citotóxicos para um grande número de células normais, além das neoplásicas (PETERS; BROWN, 2015). Além disso, alguns pacientes que demonstravam remissão satisfatória da proliferação das células neoplásicas, evoluem para recidiva em consequência da resistência ao tratamento que estava sendo utilizado (FOO; MICHOR, 2014; HOUSMAN et al., 2014).

Considerando essas observações, a necessidade da busca por novas opções terapêuticas ao tratamento do câncer permanece como desafio à comunidade científica. Nesse contexto, sabe-se que o uso de produtos naturais como uma alternativa ao tratamento de doenças tem acompanhado a história do desenvolvimento humano. Essa relação é justificada pelo grande número de estruturas químicas geradas como metabólitos secundários pelos organismos presentes na natureza e que são capazes de interagir especificamente com alvos biológicos encontrados em humanos.

As quinonas aparecem como uma classe de compostos fenólicos de origem natural com uma vasta gama de propriedades farmacológicas, fundamentada na medicina tradicional onde várias plantas ricas em quinonas são utilizadas para o tratamento de diversas doenças (SILVA, M. N. D. et al., 2003). Dentre as quinonas, um estudo de Efferth e colaboradores, publicado em 1996, demonstrou os primeiros sinais de que a primina (**GE2**) exibe potencial atividade antitumoral. Com essa perspectiva, o presente estudo teve por objetivo investigar essa possível atividade biológica em modelos de neoplasias hematológicas (LMA, LLA

e MM), assim como analisar o mecanismo envolvido na indução de morte celular.

Embora os produtos naturais suportem uma importante fonte de moléculas biologicamente ativas, estes geralmente apresentam uma complexidade estrutural incapaz de ser reproduzida, assim como dificuldade de obtenção de bons rendimentos de substâncias isoladas para a utilização comercial. Por essa razão, a síntese de novas moléculas através de recursos da química medicinal, também são de grande importância no desenvolvimento de novos compostos bioativos. Dessa forma, é possível criar moléculas de variadas complexidades e otimizar as etapas de síntese para obtenção de bons rendimentos.

Nesse contexto, as sulfonamidas são compostos sintéticos que surgiram na década de 1930 e integraram a classe dos primeiros antibióticos de uso sistêmico. Entretanto, com a progressão dos estudos científicos, novas atividades biológicas foram demonstradas para essa classe de compostos, como diurética (SUPURAN, C. T. et al., 1996), hipoglicemiante (WOUTERS et al., 2000), inibição da protease do vírus da imunodeficiência humana (FRESKOS et al., 1996); e também, potencial atividade antitumoral (FUKUOKA et al., 2001; SUPURAN, C T et al., 2001; CASINI et al., 2002; SCOZZAFAVA et al., 2003; LIU, Z.-L. et al., 2012; PARASCA et al., 2013).

Assim, além de investigar a atividade citotóxica de um produto natural (**GE2**), o presente estudo também teve como finalidade analisar detalhadamente a ação de um composto da classe das sulfonamidas (**DFS16**), escolhido dentre 26 moléculas de duas séries (**DFS e Gli**), que pudesse ter ação antitumoral.

Inicialmente, o efeito citotóxico das 26 sulfonamidas foi analisado nas linhagens de neoplasias hematológicas (K562, Jurkat e MM.1S) como triagem, por meio do tratamento das células com os compostos na concentração de 100 μ M por 24 horas e posterior verificação da viabilidade celular pelo método do MTT. Como mostra a Figura 8, os compostos da série DFS que apresentaram maior citotoxicidade em células K562, foram o DFS8, o DFS12, o DFS15 e o DFS16. Para a linhagem celular Jurkat, os compostos da série DFS que foram mais citotóxicos foram o DFS12, DFS15 e DFS16 (Figura 9), enquanto que para as células MM.1S, os compostos que tiveram maior atividade foram o DFS8, o DFS15 e o DFS16 (Figura 10). Para a série de sulfonamidas Gli, o único composto que apresentou importante atividade citotóxica foi o Gli5, nas três linhagens celulares. Dessa forma, os compostos citados

que apresentaram significante atividade citotóxica foram selecionados para a realização das curvas de concentração-resposta.

Conforme observado na Figura 11, as cinco sulfonamidas selecionadas mostraram atividade citotóxica dependente da concentração nas três linhagens celulares avaliadas.

Quando analisado o Esquema 2, é possível observar que as quatro sulfonamidas mais ativas da série DFS apresentam um grupamento eletronegativo na posição 4 do anel aromático ligado ao átomo de enxofre da molécula, o que parece ser uma característica importante para determinação de um farmacóforo. Os compostos da série DFS com 2 átomos de cloro (DFS3 e DFS11) também apresentaram efeito citotóxico, porém não tão significantes quanto os demais compostos com outros grupos eletronegativos.

Porém, quando comparada as estruturas químicas da sulfonamidas DFS5 e DFS16, as quais possuem um grupo NO_2 na posição 4 do anel aromático, foi verificado que a presença de apenas um grupamento NO_2 não é suficiente para melhorar a atividade citotóxica, visto que há uma grande diferença na citotoxicidade entre estes dois compostos. Essa diferença parece estar associada ao grupo NO_2 na posição 2 do anel aromático da sulfonamida DFS16, que confere mais atividade à estrutura.

Segundo Burger e Fiebig (2014), compostos com $\text{CI}_{50} > 30 \mu\text{M}$ são considerados inativos. Portanto, a sulfonamida **DFS16** foi a única selecionada entre as sulfonamidas para a realização das curvas concentração-resposta, a qual se mostrou ativa para as três linhagens de neoplasias testadas, com CI_{50} de $13,03 \pm 0,34 \mu\text{M}$, $6,13 \pm 0,49 \mu\text{M}$ e $5,53 \pm 0,37 \mu\text{M}$ para Jurkat, K562 e MM.1S, respectivamente, após 24 horas de tratamento.

Considerando que a sulfonamida **DFS16** apresentou atividade citotóxica superior às demais sulfonamidas, essa foi escolhida como representante dos compostos sintéticos para o seguimento do estudo juntamente com a quinona **GE2**, de origem natural.

A sulfonamida **DFS16** demonstrou citotoxicidade de maneira dependente do tempo e da concentração nas três linhagens celulares (Tabela 2 – CI_{50} 24 horas: $5,94 \pm 0,34 \mu\text{M}$ a $13,03 \pm 0,34 \mu\text{M}$; CI_{50} 48 horas: $2,87 \pm 0,56 \mu\text{M}$ a $4,32 \pm 0,37 \mu\text{M}$; CI_{50} 72 horas: $0,59 \pm 0,20 \mu\text{M}$ a $2,71 \pm 0,35 \mu\text{M}$).

O efeito citotóxico de sulfonamidas vem sendo investigado em diferentes estudos. Supuran e colaboradores (2001) demonstraram o efeito antitumoral de benzenosulfonamidas, cujo efeito citotóxico é atribuído à inibição das enzimas anidrases carbônicas, as quais estão

associadas ao desenvolvimento do câncer. Naquele trabalho foi demonstrado o efeito de três sulfonamidas sobre as células Molt-4, que assim como a linhagem Jurkat, são oriundas de pacientes com LLA-T; e células RPMI-8226, que como as células MM.1S são originadas de pacientes com MM, onde foram observadas CI_{50} (48 horas) variando entre 0,010 - 62 μM e 18 - 22 μM , respectivamente. Os resultados são similares aos encontrados com o tratamento das células neoplásicas com **DFS16**, onde para Jurkat foi obtido a CI_{50} (48 horas) de 4,64 μM e para as células MM.1S a CI_{50} (48 horas) de 2,87 μM .

Hu e colaboradores (2006 e 2007) demonstraram, em dois estudos independentes, o efeito de benzenosulfonamidas ligadas a grupos carbazóis substituídos sobre as linhagens celulares CEM e Molt-3, que são análogas à linhagem celular Jurkat. Nesses trabalhos, os autores obtiveram CI_{50} entre 46 e 6.252 nM para os compostos mais ativos após o tratamento das células por 72 horas. Os valores obtidos são semelhantes ao observado para as células Jurkat tratadas com **DFS16** após 72 horas (CI_{50} : 1.370 nM).

Em um estudo publicado em 2012 por Liu e colaboradores, foi investigada a atividade citotóxica da benzenosulfonamida MPSP-001, um composto capaz de desestabilizar os microtúbulos, sobre as células K562, cuja CI_{50} (48 horas) foi de 6,9 μM . A sulfonamida **DFS16** foi mais citotóxica que a MPSP-001 para as células K562 quando tratadas por 48 horas (CI_{50} de 4,32 μM).

As diferenças da atividade citotóxica entre os compostos dos estudos estão relacionadas diretamente à estrutura da molécula, onde a variação no tamanho dos anéis aromáticos e a modificação de determinados substituintes são capazes de modificar a potência dos compostos.

Quanto à investigação da citotoxicidade induzida pela quinona **GE2**, é possível inferir que o composto possui alta atividade citotóxica, conforme pode ser observado na Tabela 2, que apresenta as seguintes variações de CI_{50} : 24 horas: $4,16 \pm 0,25 \mu\text{M}$ a $7,54 \pm 0,46 \mu\text{M}$; 48 horas: $1,50 \pm 0,50 \mu\text{M}$ a $5,11 \pm 0,36 \mu\text{M}$; e 72 horas: $0,55 \pm 0,14 \mu\text{M}$ a $2,65 \pm 0,30 \mu\text{M}$.

Não foram encontrados estudos dos últimos cinco anos relatando a atividade citotóxica de benzoquinonas sobre linhagens celulares neoplásicas. No entanto, conforme citado previamente, Efferth e colaboradores (1996) já verificaram a atividade citotóxica da primina (**GE2**) sobre células de LMA KG-1a, cujo CI_{50} foi de 0,443 μM . O valor de CI_{50} encontrado para a linhagem KG-1a foi inferior aos observados na

CI₅₀ para as células K562, linhagem de LMA utilizada no presente estudo. No entanto, quando verificada a metodologia do estudo de Efferth, é possível destacar que a CI₅₀ foi calculada após 10 dias de tratamento com a primina. Assim, como as condições dos experimentos apresentam diferenças, a comparação entre os estudos ficou prejudicada, porém os baixos valores de CI₅₀ para **GE2** em células de LMA (K562) no presente estudo (24 horas: 7,54 µM; 48 horas: 4,93 µM e 72 horas: 2,65 µM) corroboram os dados previamente apresentados.

Utilizando uma linhagem celular de leucemia promielocítica aguda (HL-60), um subtipo de LMA, Hoyt (2010) investigou o efeito citotóxico da cribrostatina 6 (uma quinona heterocíclica), e observou que, após 24 horas de tratamento, a mesma era citotóxica com CI₅₀ de 6 ± 5 µM, a qual é semelhante àquela observada para **GE2** nas células de neoplasias hematológicas (CI₅₀: $4,16 \pm 0,25$ a $7,54 \pm 0,46$ µM, Tabela 2). A desigualdade entre os valores de CI₅₀ para as diferentes linhagens celulares pode ser explicada pelas particularidades de cada subtipo de neoplasia hematológica.

Está claro na literatura que a diminuição da viabilidade celular em células neoplásicas é o resultado do tratamento com quimioterápicos ou radiação. No entanto, há várias formas de sinalização celular que podem ser influenciadas por compostos químicos, e, conseqüentemente induzir de morte celular, como por exemplo, a indução de danos no DNA que afetam a progressão do ciclo celular e frequentemente resultam em apoptose (KIM et al., 2004). Vários estudos têm relatado a interação de sulfonamidas com a dinâmica dos microtúbulos, impedindo a formação do fuso mitótico, o que resulta no bloqueio do ciclo celular (KIM et al., 2005; CHIOU et al., 2010; FORTIN et al., 2011; LIU, Z.-L. et al., 2012).

Apesar de Kim e colaboradores (2005) mostrarem que a quinolina-benzenosulfonamida é capaz de induzir um aumento de 37 % do número de células na fase G2/M do ciclo celular em células Jurkat e conseqüente bloqueio do ciclo celular, no presente estudo não foram observadas alterações significativas na progressão do ciclo celular das células Jurkat após tratamento com **DFS16**. Essa diferença nos resultados pode estar relacionada com o período de tratamento das células até a avaliação do ciclo celular, pois no trabalho de Kim e colaboradores, as células foram incubadas por 24 horas, e então analisadas, enquanto que nesse estudo, as células foram avaliadas após 12 horas de tratamento com **DFS16**. A escolha de realização do ensaio no tempo de 12 horas é justificada pelo aumento do número de células (30 %) na fase subG0/G1 (morte celular) após o tratamento com **DFS16**. Assim, se as condições do ensaio fossem

alteradas para 24 horas restaria um pequeno número de células ainda em ciclagem para serem avaliadas. Porém, um estudo de Turcotte e colaboradores (2012), que também avaliou a progressão do ciclo celular em células Jurkat após 24 horas de tratamento com benzenosulfonamidas, não verificou alteração significativa em relação ao grupo controle.

O presente estudo não observou mudanças estatísticas no número de células distribuídas nas fases do ciclo celular de células K562 após o tratamento com **DFS16**. Além disso, não foram encontrados trabalhos na literatura que relatassem a influência de sulfonamidas na progressão do ciclo celular de células K562 e MM.1S. No entanto, neste trabalho foi observado um aumento significativo de 10 % no número de células MM.1S na fase G2/M após o tratamento de 12 horas com **DFS16**.

Outros estudos utilizando células M21 (melanoma), HT-29 (câncer de cólon retal), PC3 (câncer de próstata) e HeLa (carcinoma cervical) também demonstraram bloqueio do ciclo celular na fase G2/M após tratamento com benzenosulfonamidas, e sugerem que esse efeito está relacionado com a desestabilização dos microtúbulos (KIM et al., 2005; CHIOU et al., 2010; FORTIN et al., 2011; LIU et al., 2012).

Apesar da diminuição do número de células na fase S do ciclo celular das células Jurkat após o tratamento com **GE2**, não foi observado o bloqueio em nenhuma das fases do ciclo celular. Também não foi observada alteração na progressão do ciclo celular após o tratamento de 12 horas com **GE2** nas células K562 e MM.1S. Esses dados corroboram o estudo de Efferth e colaboradores (1996) que não observou mudanças no comportamento do ciclo celular das células leucêmicas KG-1a após tratamento com a primina. Além disso, Hoyt (2010) não verificou influência nas fases do ciclo celular das células U-937 (linfoma), SK-MEL-5 (melanoma), MCF-7 (câncer de mama) e HeLa após o tratamento por 16 horas com a quinona heterocíclica cribrostatina 6. Dessa forma, os resultados sugerem que as quinonas não atuam sobre a progressão do ciclo celular.

A proliferação descontrolada é uma das principais características de uma célula neoplásica. Nesse contexto, a proteína nuclear Ki-67 é um marcador de células que estão em ciclagem, sejam elas células saudáveis ou tumorais (RAHMANZADEH et al., 2010; SHEDLOCK et al., 2010). Assim, de acordo com a literatura, a expressão de Ki-67 está associada com proliferação celular e pior prognóstico, principalmente em pacientes com linfoma difuso de grandes células B (GAUDIO et al., 2011).

Sendo assim, considerando a importância da proteína Ki-67 como um marcador de replicação celular, foi avaliado o efeito da sulfonamida

DFS16 e da quinona **GE2** sobre a expressão dessa proteína nas células K562, Jurkat e MM.1S. De acordo com a Figura 14, não houve alteração significativa na expressão de Ki-67 nas células K562 e Jurkat quando tratadas com **DFS16**; no entanto, houve diminuição de 16 % na expressão dessa proteína nas células Jurkat. Enquanto que quando as células K562 e Jurkat foram tratadas com **GE2** por 12 horas, a expressão de Ki-67 diminuiu 44 % e 7 %, respectivamente.

Não foram encontrados artigos demonstrando a influência de sulfonamidas ou quinonas sobre a expressão da proteína Ki-67. Porém, por ser uma proteína relacionada com a proliferação celular e progressão tumoral, a diminuição de sua expressão, quando induzida pelo tratamento com os compostos, demonstra ser um mecanismo importante associado à atividade citotóxica.

As células MM.1S quando tratadas com **GE2** exibiram um aumento de 28 % na expressão de Ki-67, porém isso não parece influenciar na atividade citotóxica do composto, visto que as mesmas células, quando tratadas com o mesmo composto, induzem um aumento de 48,64 % no número de células em subG0/G1 (morte celular) no ciclo celular. A expressão aumentada de Ki-67 parece ser uma tentativa da maquinaria celular em resistir à sinalização de morte celular induzida pelo composto.

Conforme citado previamente, a indução de dano celular e o bloqueio do ciclo celular são mecanismos desejados por compostos quimioterápicos, pois caso a célula não consiga realizar reparo nesses danos, é iniciada a sinalização para que a célula seja destruída. A morte da célula pode ocorrer por diversos mecanismos e isso dependerá de vias específicas de ativação (KAUFMANN; EARNSHAW, 2000; MAKIN; HICKMAN, 2000). A ativação de vias que resultem na apoptose, morte celular programada tipo I, é um dos objetivos na busca de novos quimioterápicos. A preferência pela indução desse tipo de morte celular é justificada pela sua baixa capacidade imunogênica quando comparada à necrose, conseqüentemente com menos efeitos adversos durante o tratamento (KOFF; RAMACHANDIRAN; BERNAL-MIZRACHI, 2015).

Assim, o presente estudo realizou três diferentes metodologias para verificar se a citotoxicidade estimulada pelo tratamento com **DFS16** e **GE2** ocorreu pela ativação da apoptose. A primeira metodologia foi a observação morfológica das células pela dupla coloração com BE/LA após tratamento com os compostos. A utilização desse método é bastante difundida entre os trabalhos na literatura e permite identificar as células

viáveis, as células em apoptose inicial, em apoptose tardia e em necrose (BABYKUTTY et al., 2009; MACHADO et al., 2013; MAIORAL et al., 2013; LIU, K. et al., 2015; LOCH-NECKEL et al., 2015; MENON; GOPALAKRISHNAN, 2015). As três linhagens celulares (K562, Jurkat e MM.1S), após o tratamento por 12 horas com **DFS16** ou **GE2**, apresentaram características morfológicas que sugerem envolvimento da apoptose na morte celular, como: depósito de grânulos no citoplasma, condensação da cromatina, perda da integridade da membrana plasmática e a formação de corpos apoptóticos. As células K562 apresentaram maior quantidade de células em apoptose inicial após o tratamento com ambos os compostos, quando comparada às outras linhagens celulares. Isso pode ser explicado pelo fato de ser uma célula com características de resistência a tratamento, conforme citado anteriormente. As células Jurkat e MM.1S apresentaram predominância de células em apoptose tardia, o que foi mais evidente com as células de MM.

Essas observações foram confirmadas pelo segundo método de avaliação da indução de apoptose, a marcação dos resíduos de fosfatidilserina pela Anexina-V. A fosfatidilserina é um fosfolípídio que normalmente está localizado na camada interna da membrana plasmática das células, e quando ocorre a ativação das vias de apoptose, esses resíduos de fosfatidilserina são expostos na membrana externa da célula, sinalizando que essa célula pode ser fagocitada (BORISENKO et al., 2003). Assim, como na avaliação morfológica após coloração com BE/LA, o tratamento das três linhagens celulares avaliadas com os compostos **DFS16** e **GE2** apresentaram aumento significativo de células com marcação positiva para Anexina-V, ou características de apoptose.

Uma das consequências da cascata de sinalização da apoptose é a degradação do DNA celular em fragmentos de 180 a 185 pares de bases de comprimento (MATASSOV et al., 2004). Dessa forma, a terceira metodologia de avaliação da apoptose como mecanismo induzido pelos compostos **DFS16** e **GE2** foi a observação do separação do DNA em gel de agarose após o tratamento das células por 24 horas. Como podem ser observados na Figura 17, ambos os compostos provocaram o “padrão em escada” característico de apoptose nas três linhagens celulares avaliadas após o tratamento.

Considerando os resultados das três metodologias citadas, é possível sugerir que a sulfonamida **DFS16** e a quinona **GE2** induzem a apoptose nas células K562, Jurkat e MM.1S. Esses dados corroboram os encontrados na literatura, que mostram a indução de morte celular por apoptose em células neoplásicas após tratamento com essas classes de

moléculas (BAIGI et al., 2008; HOYT, 2010; LIU et al., 2012; CHIOU et al., 2010).

A apoptose pode ser desencadeada por diferentes vias de sinalização. Nesse estudo foram realizados ensaios que permitem avaliar o envolvimento da via extrínseca (via dos receptores de morte presentes na membrana plasmática) ou via intrínseca (via mitocondrial em resposta a estímulos internos) (KOOFF et al., 2015). Quando um sinal externo estimula mecanismos que interferem na homeostase celular, tais como dano do DNA ou privação de fatores de crescimento, há uma sinalização para o início da apoptose por via intrínseca, a qual é regulada por membros da família Bcl-2, presentes na mitocôndria (DANIAL; GIMENEZ-CASSINA; TONDERA, 2010).

Durante a sinalização de apoptose por via intrínseca, a inibição de Bcl-2 e a abertura facilitada por Bax de poros de permeabilidade transitória na membrana da mitocôndria resultam na diminuição do potencial de membrana da mitocôndria (DALLAPORTA et al., 1999). Assim, com o objetivo de se investigar se a apoptose estimulada pelos compostos **DFS16** e **GE2** é ativada por via intrínseca, avaliou-se o efeito do tratamento com os compostos sobre o potencial mitocondrial e a expressão das proteínas Bcl-2 e Bax nas células K562, Jurkat e MM.1S.

Conforme pode ser visto na Figura 18 os compostos **DFS16** e **GE2** reduziram o potencial de membrana da mitocôndria nas linhagens celulares de neoplasias hematológicas avaliadas. Ambos os compostos demonstraram melhor atividade sobre o potencial mitocondrial nas células Jurkat e MM.1S. A perturbação do potencial de membrana mitocondrial também pode estar relacionada com características particulares da célula estudada.

Quando avaliadas as proteínas envolvidas com a ativação da via intrínseca da apoptose, foi possível observar que **DFS16** só é capaz de diminuir a expressão de Bcl-2 nas células MM.1S, enquanto que o **GE2**, diminuiu a expressão de Bcl-2 nas células K562 e aumenta a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 em MM.1S. Apesar de o **GE2** aumentar a expressão de Bcl-2 nas células MM.1S, ele também é capaz de aumentar os valores da proteína pró-apoptótica Bax. Dessa forma, como o controle da via é baseado no equilíbrio de ambas as proteínas, por mais que ocorra um aumento de Bcl-2, a elevação de Bax prevalece, resultando no sinal pró-apoptótico (PERLMAN et al., 1999). O composto **GE2** também é capaz de elevar a quantidade de Bax nas células Jurkat e K562, invertendo a proporção Bcl-2/Bax e favorecendo o sinal pró-apoptótico.

A sulfonamida **DFS16** também é capaz de fazer com que predomine o sinal pró-apoptótico de Bax no tratamento de células K562 e Jurkat. Entretanto, mesmo que **DFS16** diminua a quantidade de Bcl-2, conforme mostrado anteriormente, este composto não é capaz de elevar os valores de Bax no tratamento das células MM.1S em 12 horas. Talvez fosse necessária a reavaliação dessa via em um tempo superior nessa linhagem celular, para detectar se o sinal apoptótico na via intrínseca, com inversão da razão Bcl-2 e Bax, ocorre dependente do tempo. Não foram encontrados estudos que avaliassem o efeito de sulfonamidas ou quinonas sobre as proteínas da via intrínseca.

A outra via envolvida na apoptose estudada nesse trabalho foi a via extrínseca, a qual é ativada por receptores presentes na membrana plasmática, tais como Fas e TRAIL. Esses receptores são capazes de desencadear uma cascata de sinalização intracelular, através da clivagem da pró-caspase-8 e -10, para promoverem a formação do complexo indutor de morte (DISC) no citoplasma e consequente ativação da caspase-3, da via comum da apoptose (FULDA; DEBATIN, 2006; KOOF et al., 2015). Dessa forma, com o intuito de investigar se essa via é estimulada nas células de neoplasias hematológicas tratadas com **DFS16** e **GE2**, foi avaliada a expressão do receptor Fas. O composto **DFS16** aumentou a expressão do receptor Fas nas células K562 e Jurkat, no entanto, não apresentou diferença significativa na expressão da proteína nas células MM.1S. Já a quinona **GE2** promoveu um grande aumento na expressão de FasR em todas as linhagens celulares avaliadas.

Estudos da literatura que investigaram a atividade antiproliferativa de compostos em células neoplásicas e que avaliaram a expressão do receptor Fas, demonstram que o aumento de sua expressão pode estar diretamente relacionado com a ativação da via extrínseca (KUO et al., 2005; HWANG-BO; PARK; CHUNG, 2015; PEI et al., 2015; WANG et al., 2015).

A ativação de ambas as vias, intrínseca e extrínseca convergem para a via comum de ativação das caspases efetoras, dentre elas caspase-3, -6 e -7 (COHEN, 1997; BRETNALL et al., 2013).

A quinona **GE2** aumentou significativamente a expressão da caspase-3 nas três linhagens celulares avaliadas. Esse resultado corrobora os encontrados previamente, onde o composto **GE2** é capaz de ativar tanto a via intrínseca quanto a via extrínseca da apoptose nas células K562, Jurkat e MM.1S. Assim, com estas vias ativadas, consequentemente há uma maior expressão da caspase-3 efetora.

A mesma observação foi encontrada para as células K562 tratadas com a sulfonamida **DFS16**. No entanto, apesar de o tratamento com **DFS16** nas células Jurkat parecer ativar tanto a via intrínseca quanto a via extrínseca da apoptose, não houve alteração significativa na quantidade de caspase-3.

Já o tratamento das células MM.1S com **DFS16** por 12 horas diminui os valores de caspase-3. Uma possibilidade que justifique essa redução é que o anticorpo utilizado nesse estudo para marcação de caspase-3, é um clone capaz de detectar todas as isoformas de caspase-3, tanto na forma de zimogênio (pró-caspase-3), quanto na forma ativa de caspase-3. Assim, essa diminuição pode estar associada com o consumo dessa proteína durante a cascata de sinalização da apoptose.

Outras proteínas também podem estar envolvidas com a cascata de sinalização da apoptose, como é o caso do fator indutor da apoptose. Esse fator é liberado da mitocôndria diante de um sinal de morte celular, migrando diretamente ao núcleo e induzindo a condensação e fragmentação do DNA, independente da ativação de caspases (NORBERG; ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY, 2010). O composto **GE2** é capaz de aumentar a expressão do AIF nas três linhagens celulares estudadas, enquanto que o composto **DFS16** somente eleva a expressão de AIF no tratamento das células Jurkat.

A apoptose pode também estar relacionada com proteínas capazes de inibir a atividade das caspases efetoras -3, -7, da caspase iniciadora -9 e modularem o fator de transcrição NF- κ B (GYRD-HANSEN; MEIER, 2010). O tratamento das células K562 e Jurkat com a sulfonamida **DFS16** resultou no aumento da expressão de survivina. No entanto, em conjunto com os demais resultados, os altos valores de survivina não impediram a indução de morte celular por esse composto. Porém, parece ser um mecanismo de resposta da célula para tentar manter sua sobrevivência.

O mesmo foi observado no tratamento das células Jurkat com a quinona **GE2**. Todavia, quando **GE2** foi incubado com K562, este otimizou a resposta de sinalização de apoptose, pois diminuiu a expressão de survivina.

Em relação ao grupo de resultados obtidos no tratamento das células MM.1S com a sulfonamida **DFS16** foi possível observar resultados discordantes dos encontrados nas demais células. Assim, o composto **DFS16** quando incubado com as células MM.1S, parece utilizar outras vias para indução da apoptose, visto que provoca bloqueio do ciclo celular em G2/M, apresenta características de apoptose perante coloração com BE/LA, exhibe células positivas para a marcação com

Anexina V, demonstra padrão em escada na fragmentação de DNA. No entanto, não ativa a via intrínseca através de Bcl-2 e Bax, assim como não altera a expressão do receptor Fas da via extrínseca, nem induz o aumento da expressão da capase-3.

Uma possível via ativada pelo **DFS16** nas células MM.1S é uma morte celular independente de caspases, como por exemplo, a vida da endonuclease G, que fica localizada na mitocôndria. Quando a célula recebe um sinal de morte, a endonuclease G é liberada da mitocôndria, provocando alteração no potencial mitocondrial, estimulando a externalização de resíduos de fosfatidilserina e migrando para o núcleo provocando fragmentação de DNA (VAN LOO et al., 2001; BROKER et al., 2005; BUTTNER et al., 2007; LIANG et al., 2015).

Considerando-se os resultados promissores dos compostos **DFS16** e **GE2** na atividade citotóxica *in vitro* sobre linhagens de neoplasias hematológicas, em uma segunda etapa, avaliou-se o efeito desses compostos frente a células não neoplásicas, tais como fibroblasto murino (L-929) e células mononucleadas de SP de humanos.

A escolha da utilização da linhagem celular L-929 ocorreu com o propósito de se testar os compostos em células que mimetizem o microambiente medular, o qual possui em sua composição fibroblastos. Os resultados encontrados demonstram que os compostos **DFS16** e **GE2** também apresentam citotoxicidade para células não neoplásicas, em concentrações superiores as observadas para as células neoplásicas. Assim as CI_{50} encontradas nos tratamentos de 24 e 48 horas são estatisticamente superiores às encontradas para o tratamento das células neoplásicas. Além disso, o cálculo do índice de seletividade mostrou que o composto **GE2** possui excelente seletividade para células neoplásicas avaliadas, assim como o composto **DFS16** também apresenta alta seletividade para as células de leucemia linfoblástica aguda (Jurkat) e mieloma múltiplo (MM.1S), quando comparadas as células não neoplásicas.

Além disso, a investigação da citotoxicidade dos compostos **DFS16** e **GE2** sobre as células mononucleadas de indivíduos saudáveis mostraram redução da viabilidade celular estatisticamente. No entanto, estes compostos apresentaram comportamento similar a um fármaco já utilizado para o tratamento de neoplasias, o paclitaxel, o que sugere não inviabilizar **DFS16** e **GE2** como potenciais agentes quimioterápicos.

Por fim, foi avaliado o efeito dos compostos sobre eritrócitos saudáveis, para verificar se a utilização por via sistêmica poderia ser comprometida, visto que um quimioterápico, por mais potente que seja,

mas que induza hemólise, tem seu uso terapêutico invalidado (MOCAN, 2010). Ambos os compostos não causaram hemólise significativa, mesmo em concentrações três vezes superior à maior CI_{50} obtida para as células neoplásicas.

O conjunto de resultados desse trabalho sugere que os compostos **DFS16** e **GE2** são promissoras moléculas para o estudo e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de neoplasias hematológicas.

7. CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo permitem concluir que:

- Dentre as 26 sulfonamidas avaliadas na triagem, as que demonstraram maior atividade citotóxica foram **DFS8**, **DFS12**, **DFS15**, **DFS16** e **Gli5** para a linhagem celular K562; **DFS12**, **DFS15**, **DFS16** e **Gli5** para a linhagem celular Jurkat e **DFS8**, **DFS15**, **DFS16** e **Gli5** para a linhagem celular MM.1S.

- Ao realizar as curvas de concentração-resposta, a sulfonamida **DFS16** foi a que apresentou melhor atividade em 24 horas nas três linhagens celulares avaliadas.

- A sulfonamida **DFS16** causa redução da viabilidade celular nas células K562, Jurkat e MM.1S de forma dependente da concentração e do tempo de incubação.

- O composto **DFS16** induz morte celular por apoptose nas células K562, Jurkat e MM.1S.

- A sulfonamida **DFS16** causou um bloqueio do ciclo celular na fase G2/M nas células MM.1S.

- A sulfonamida **DFS16** diminuiu 16 % a expressão da proteína de proliferação celular Ki-67 nas células Jurkat.

- O composto **DFS16** reduziu o potencial de membrana da mitocôndria nas linhagens celulares de neoplasias hematológicas avaliadas.

- A razão Bcl-2/Bax foi invertida após o tratamento com o composto **DFS16** em todas as linhagens celulares estudadas, exceto nas células MM.1S. A inversão da razão Bcl-2/Bax sugere o envolvimento da via intrínseca na sinalização da apoptose.

- O composto **DFS16** aumentou a expressão do receptor Fas nas células K562 e Jurkat.

- A sulfonamida **DFS16** elevou a expressão de caspase-3 somente nas células K562.

- As células MM.1S tratadas com a sulfonamida **DFS16** parecem sofrer apoptose ativada por outra via de sinalização, que não a intrínseca ou a extrínseca.

- O composto **DFS16** somente eleva a expressão de AIF em células Jurkat.

- O tratamento das células K562 e Jurkat com a sulfonamida **DFS16** resultou no aumento da expressão de survivina.

- Os resultados encontrados demonstram que o composto **DFS16** também apresenta citotoxicidade contra células não neoplásicas L-929, porém em concentrações superiores as observadas nas células neoplásicas.

- O índice de seletividade mostrou que o composto **DFS16** apresenta alta seletividade para as células Jurkat e MM.1S e moderada seletividade para as células K562, quando comparadas as células não neoplásicas.

- O composto **DFS16** reduziu a viabilidade celular das células mononucleadas de indivíduos saudáveis, no entanto, esse comportamento também foi observado para um fármaco já utilizado para o tratamento de neoplasias.

- A sulfonamida DFS16 não causou hemólise significativa, mesmo em concentrações três vezes superior à maior CI_{50} encontrada nas células neoplásicas.

Os dados observados nesse estudo permitem sugerir que a sulfonamida **DFS16** possui atividade citotóxica sobre células de LMA (K562) e LLA (Jurkat), através da indução de apoptose pelas vias intrínseca e extrínseca, com envolvimento do potencial de membrana da mitocôndria.

Na LLA, a diminuição da proteína de proliferação celular Ki-67 e o aumento do fator indutor de apoptose também parecem estar relacionados com o mecanismo induzido pelo tratamento com **DFS16**. As células de MM (MM.1S) sofrem apoptose após o tratamento com a sulfonamida **DFS16**, porém a ativação da morte celular acontece por uma via não estudada neste trabalho e com o envolvimento do bloqueio na progressão do ciclo celular na fase G2/M.

Além disso, foi possível constatar que:

- A quinona **GE2** causa redução da viabilidade celular nas células K562, Jurkat e MM.1S de forma dependente da concentração e do tempo de incubação.

- O composto **GE2** induz morte celular por apoptose nas células K562, Jurkat e MM.1S.

- A quinona **GE2** não provocou alteração significativa na progressão do ciclo celular das células K562, Jurkat e MM.1S.

- A quinona **GE2** também diminuiu os valores de Ki-67 nas células K562 e Jurkat.

- O composto **GE2** reduziu o potencial de membrana da mitocôndria nas linhagens celulares de neoplasias hematológicas avaliadas.

- A razão Bcl-2/Bax foi invertida após o tratamento com o composto **GE2** em todas as linhagens celulares estudadas e essa inversão sugere o envolvimento da via intrínseca na sinalização da apoptose.

- O composto **GE2** promoveu um grande aumento na expressão de FasR em todas as linhagens celulares avaliadas.

- A quinona **GE2** aumentou significativamente a expressão da caspase-3 nas três linhagens celulares avaliadas.

- O composto **GE2** é capaz de aumentar a expressão do AIF nas três linhagens celulares estudados.

- O tratamento das células Jurkat com a quinona **GE2**, resultou no aumento da expressão de survivina. Todavia, quando **GE2** foi incubado com K562, houve diminuição da expressão de survivina.

- Os resultados encontrados demonstram que o composto **GE2** também apresenta citotoxicidade contra células não neoplásicas L-929, porém somente em altas concentrações.

- O índice de seletividade mostrou que o composto **GE2** apresenta excelente seletividade para células neoplásicas.

- O composto **GE2** reduziu a viabilidade celular das células mononucleadas de indivíduos saudáveis, no entanto, esse comportamento também foi observado para um fármaco já utilizado para o tratamento de neoplasias.

- A quinona **GE2** não causou uma hemólise significativa, mesmo em concentração três vezes superior à maior CI_{50} encontrada nas células neoplásicas.

Em síntese, a quinona **GE2** parece induzir apoptose pela ativação das vias intrínseca e extrínseca, nas LMA (K562), LLA (Jurkat) e MM (MM.1S), além de diminuir a proteína de proliferação celular Ki-67.

REFERÊNCIAS

ABBAS, T.; DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 6, p. 400-14, 2009.

ABRAHAM, R. T.; WEISS, A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 4, p. 301-308, 2004.

ADAMS, J. M.; CORY, S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 5, p. 488-96, 2007.

ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, n. 9, p. 1324-37, 2007.

ALBAKR, R. B.; KHOJAH, O. T. Incidence Trend of The Leukemia Reported Cases in The Kingdom of Saudi Arabia, Observational Descriptive Statistic From Saudi Cancer Registry. **International Journal of Biomedical Research**, v. 5, n. 8, p. 522, 2014.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1133

ALMEIDA, V. L. D. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

ANDERSON, K. C.; CARRASCO, R. D. Pathogenesis of myeloma. **Annu Rev Pathol**, v. 6, p. 249-74, 2011.

ANJOS, A. R. D.; ALVARES-SILVA, M.; BORELLI, P. Matriz Extracelular e Leucemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, p. 404-412, 2000.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1305-8, 1998.

AWANG, N. et al. In vitro Cytotoxic Activity of New Triphenyltin (IV) Alkyl-isopropyl-di-thiocarbamate Compounds on Human Acute T-Lymphoblastic Cell Line. **J App Pharm Sci**, v. 5, n. 4, p. 007-011, 2015.

BABYKUTTY, S. et al. Apoptosis Induction of Centella Asiatica on Human Breast Cancer Cells. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 6, n. 1, p. 9-16, 2009.

BAIGI, M. G. et al. Apoptosis/necrosis switch in two different cancer cell lines: influence of benzoquinone- and hydrogen peroxide-induced oxidative stress intensity, and glutathione. **Toxicol In Vitro**, v. 22, n. 6, p. 1547-54, 2008.

BAIN, B. J. **Células Sangüíneas - Um Guia Prático**. 4 Porto Alegre: Artmed, 2007.

BASSAN, R.; HOELZER, D. Modern Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, 2011.

BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Metabolic flexibility and cell hierarchy in metastatic cancer. **Mitochondrion**, v. 10, n. 6, p. 584-8, 2010.

BONELLI, P. et al. CDK/CCN and CDKI Alterations for Cancer Prognosis and Therapeutic Predictivity. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 15, 2014.

BORISENKO, G. G. et al. Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis of apoptotic Jurkat cells--existence of a threshold. **Arch Biochem Biophys**, v. 413, n. 1, p. 41-52, 2003.

BOSE, P.; GRANT, S. Rational Combinations of Targeted Agents in AML. **Journal of Clinical Medicine**, v. 4, n. 4, p. 634, 2015.

BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scand J Clin Lab Invest Suppl**, v. 97, p. 77-89, 1968.

BRENTNALL, M. et al. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. **BMC Cell Biol**, v. 14, p. 32, 2013.

BROKER, L. E.; KRUYT, F. A.; GIACCONE, G. Cell death independent of caspases: a review. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 9, p. 3155-62, 2005.

BRONDANI, D. J. et al. Synthesis and antitumour activity of the Primin (2-methoxy-6-n-pentyl-1,4-benzoquinone) and analogues. **Med Chem**, v. 3, n. 4, p. 369-72, 2007.

BURGER, A. M.; FIEBIG, H.-H. Preclinical Screening for New Anticancer Agents. In: FIGG, W. D. e MCLEOD, H. L. (Ed.). **Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and**

Pharmacodynamics. Totowa, NJ: Humana Press, 2004. p.29-44. ISBN 978-1-59259-734-5.

BUTTNER, S. et al. Endonuclease G regulates budding yeast life and death. **Mol Cell**, v. 25, n. 2, p. 233-46, 2007.

CASINI, A. et al. Sulfonamides and sulfonylated derivatives as anticancer agents. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 2, n. 1, p. 55-75, 2002.

CHIOU, C.-T. et al. Synthesis of Anti-Microtubule N-(2-Arylindol-7-yl)benzenesulfonamide Derivatives and Their Antitumor Mechanisms. **ChemMedChem**, v. 5, n. 9, p. 1489-1497, 2010.

COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochem J**, v. 326 (Pt 1), p. 1-16, 1997.

COHLY, H. H. et al. Effect of light irradiation and sex hormones on jurkat T cells: 17beta-estradiol but not testosterone enhances UVA-induced cytotoxicity in Jurkat lymphocytes. **Int J Environ Res Public Health**, v. 2, n. 1, p. 156-63, 2005.

COSENTINO, K.; GARCÍA-SÁEZ, A. J. Mitochondrial alterations in apoptosis. **Chem Phys Lipids**, v. 181, p. 62-75, 2014.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. **J Nat Prod**, v. 77, n. 3, p. 703-23, 2014.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-95, 2013.

DAHAM, S. S. et al. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11808-29, 2015.

DALLAPORTA, B. et al. Plasma membrane potential in thymocyte apoptosis. **J Immunol**, v. 162, n. 11, p. 6534-42, 1999.

DANIAL, N. N.; GIMENEZ-CASSINA, A.; TONDERA, D. Homeostatic functions of BCL-2 proteins beyond apoptosis. **Adv Exp Med Biol**, v. 687, p. 1-32, 2010.

DEL POETA, G. et al. Deregulation of the mitochondrial apoptotic machinery and development of molecular targeted drugs in acute myeloid leukemia. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 8, n. 3, p. 207-22, 2008.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. **Microbial biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 687-699, 2011.

DENNY, W. A. Chapter 11 - The contribution of synthetic organic chemistry to anticancer drug development A2 - Kerr, Bruce C. Baguley David J. In: (Ed.). **Anticancer Drug Development**. San Diego: Academic Press, 2002. p.187-202. ISBN 978-0-12-072651-6.

DODDAREDDY, M. R. et al. Structure based design of heat shock protein 90 inhibitors acting as anticancer agents. **Bioorg Med Chem**, v. 19, n. 5, p. 1714-20, 2011.

DÖHNER, H.; WEISDORF, D. J.; BLOOMFIELD, C. D. Acute Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 12, p. 1136-1152, 2015.

EFFERTH, T. et al. Detection of apoptosis in KG-1a leukemic cells treated with investigational drugs. **Arzneimittelforschung**, v. 46, n. 2, p. 196-200, 1996.

EVANS, H. M.; SCHULEMANN, W. THE ACTION OF VITAL STAINS BELONGING TO THE BENZIDINE GROUP. **Science**, v. 39, n. 1004, p. 443-454, 1914.

FALKENBERG, M. B. **Chinone und andere Inhaltsstoffe aus Eugenia hiemalis Cambessèdes und Paramyrciaria glazioviana (Kiaerskou) Sobral (Myrtaceae)**. 1996. 84 (Doutorado). Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Universität Bonn, Bonn.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, 2015.

FERREIRA, F. P. S. et al. Eugenia calycina Cambess extracts and their fractions: Their antimicrobial activity and the identification of major polar compounds using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal**, v. 99, p. 89-96, 2014.

FERRO, D. P. et al. Fractal characteristics of May-Grunwald-Giemsa stained chromatin are independent prognostic factors for survival in multiple myeloma. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20706, 2011.

FESIK, S. W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 11, p. 876-85, 2005.

FLORA do Brasil 2020 em construção. S.l., 2016. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 20 Mai. 2016.

FOO, J.; MICHOR, F. Evolution of acquired resistance to anti-cancer therapy. **Journal of Theoretical Biology**, v. 355, p. 10-20, 2014.

FORTIN, S. et al. Substituted phenyl 4-(2-oxoimidazolidin-1-yl)benzenesulfonamides as antimetabolites. Antiproliferative, antiangiogenic and antitumoral activity, and quantitative structure-activity relationships. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 5327-5342, 2011.

FRESKOS, J. N. et al. (Hydroxyethyl) sulfonamide HIV-1 Protease inhibitors: Identification of the 2-methylbenzoyl moiety at P-2. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, n. 4, p. 445-450, 1996.

FUKUOKA, K. et al. Mechanisms of action of the novel sulfonamide anticancer agent E7070 on cell cycle progression in human non-small cell lung cancer cells. **Invest New Drugs**, v. 19, n. 3, p. 219-27, 2001.

FULDA, S. Cell death in hematological tumors. **Apoptosis**, v. 14, n. 4, p. 409-23, 2009.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4798-811, 2006.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 1, p. 107-20, 2012.

GAUDIO, F. et al. High Ki67 index and bulky disease remain significant adverse prognostic factors in patients with diffuse large B cell lymphoma before and after the introduction of rituximab. **Acta Haematol**, v. 126, n. 1, p. 44-51, 2011.

GENSLER, W. J.; DHEER, S. K. Reaction pathway for the formation of 3,3-diphenyl-1-benzenesulfonamidopropane in the aluminum chloride catalyzed reaction of 1-benzenesulfonyl-2-(bromomethyl)ethylenimine and benzene. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 46, n. 20, p. 4051-4057, 1981.

GENSLER, W. J.; ROCKETT, J. C. Friedel-Crafts Reaction of 1-Benzenesulfonyl-2-bromomethylethyleneimine and Benzene. **Journal of the American Chemical Society**, v. 77, n. 12, p. 3262-3264, 1955.

GHOBRIAL, I. M.; WITZIG, T. E.; ADJEI, A. A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA Cancer J Clin**, v. 55, n. 3, p. 178-94, 2005.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversity and Conservation of Plants in Brazil
Biodiversidad y Conservación de Plantas en Brasil.
Conservation Biology, v. 19, n. 3, p. 632-639, 2005.

GLAUER, J. et al. A novel selective small-molecule PI3K inhibitor is effective against human multiple myeloma in vitro and in vivo. **Blood Cancer J**, v. 3, p. e141, 2013.

GOLDMAN-LEIKIN, R. E. et al. Characterization of a novel myeloma cell line, MM.1. **J Lab Clin Med**, v. 113, n. 3, p. 335-45, 1989.

GREENSTEIN, S. et al. Characterization of the MM.1 human multiple myeloma (MM) cell lines: a model system to elucidate the characteristics, behavior, and signaling of steroid-sensitive and -resistant MM cells. **Exp Hematol**, v. 31, n. 4, p. 271-82, 2003.

GUENEBEAUD, C. et al. The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. **Mol Cell**, v. 40, n. 6, p. 863-76, 2010.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. D. M.; MENDONÇA, G. A. E. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 8, 2005.

GYRD-HANSEN, M.; MEIER, P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- κ B, inflammation and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 8, p. 561-574, 2010.

HOJJAT-FARSANGI, M. Novel and emerging targeted-based cancer therapy agents and methods. **Tumour Biol**, v. 36, n. 2, p. 543-56, 2015.

HOUSMAN, G. et al. Drug resistance in cancer: an overview. **Cancers (Basel)**, v. 6, n. 3, p. 1769-92, 2014.

HOYT, M. T. **THE ANTICANCER MODE OF ACTION OF THE QUINONE NATURAL PRODUCT CRIBROSTATIN 6** 2010. 137 (Doutorado). Doctor of Philosophy in Chemistry, University of Illinois, Urbana.

HU, L. et al. Synthesis and structure-activity relationships of carbazole sulfonamides as a novel class of antimitotic agents

against solid tumors. **J Med Chem**, v. 49, n. 21, p. 6273-82, 2006.

HU, L. et al. Novel pyridinyl and pyrimidinylcarbazole sulfonamides as antiproliferative agents. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 17, n. 5, p. 1193-6, 2007.

HUNGRIA, V. T. et al. Confirmation of the utility of the International Staging System and identification of a unique pattern of disease in Brazilian patients with multiple myeloma. **Haematologica**, v. 93, n. 5, p. 791-2, 2008.

HUNTER, A. M.; LACASSE, E. C.; KORNELUK, R. G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. **Apoptosis**, v. 12, n. 9, p. 1543-68, 2007.

HWANG-BO, J.; PARK, J.-H.; CHUNG, I. S. Tumstatin induces apoptosis mediated by Fas signaling pathway in oral squamous cell carcinoma SCC-VII cells. **Oncol Lett**, v. 10, n. 2, p. 1016-1022, 2015.

INCA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. SAÚDE, C. D. P. E. V. M. D. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva: 122 p. 2015.

KADIA, T. M. et al. New drugs in acute myeloid leukemia. **Ann Oncol**, 2016.

KAUFMANN, S. H.; EARNSHAW, W. C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. **Exp Cell Res**, v. 256, n. 1, p. 42-9, 2000.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-57, 1972.

- KHAZIR, J. et al. Anticancer agents from diverse natural sources. **Nat Prod Commun**, v. 9, n. 11, p. 1655-69, 2014.
- KIM, Y.-H. et al. G2 arrest and apoptosis by 2-amino-N-quinoline-8-yl-benzenesulfonamide (QBS), a novel cytotoxic compound. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 9, p. 1333-1341, 2005.
- KLASTERSKY, J. et al. Supportive/palliative care in cancer patients: quo vadis? **Support Care Cancer**, v. 24, n. 4, p. 1883-8, 2016.
- KOEFFLER, H. P.; GOLDE, D. W. Human myeloid leukemia cell lines: a review. **Blood**, v. 56, n. 3, p. 344-350, 1980.
- KOFF, J. L.; RAMACHANDIRAN, S.; BERNAL-MIZRACHI, L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 2, p. 2942-55, 2015.
- KOOPMAN, G. et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, v. 84, n. 5, p. 1415-20, 1994.
- KOSMIDER, B. et al. Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. **Mutat Res**, v. 563, n. 1, p. 61-70, 2004.
- KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.
- KUO, P. L. et al. The antiproliferative activity of prodelphinidin B-2 3'-O-gallate from green tea leaf is through

cell cycle arrest and Fas-mediated apoptotic pathway in A549 cells. **Food Chem Toxicol**, v. 43, n. 2, p. 315-23, 2005.

LI, M. X.; DEWSON, G. Mitochondria and apoptosis: emerging concepts. **F1000Prime Reports**, v. 7, p. 42, 2015.

LIANG, X. et al. Characterization of endonuclease G and mitochondria-sarcoplasmic reticulum-related proteins during cardiac hypertrophy. **Pharmazie**, v. 70, n. 9, p. 586-92, 2015.

LIN, P. Plasma cell myeloma. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 23, n. 4, p. 709-27, 2009.

LINARDI, C. D. C. G. **Anormalidades citogenéticas e sua relação com a proliferação e a apoptose celular em portadores e mieloma múltiplo**. 2010. 201 (Doutorado). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LIU, K. et al. Dual AO/EB Staining to Detect Apoptosis in Osteosarcoma Cells Compared with Flow Cytometry. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 21, p. 15-20, 2015.

LIU, Z.-L. et al. A novel sulfonamide agent, MPSP-001, exhibits potent activity against human cancer cells in vitro through disruption of microtubule. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 2, p. 261-270, 2012.

LOCH-NECKEL, G. et al. Orally Administered Chitosan-Coated Polycaprolactone Nanoparticles Containing Curcumin Attenuate Metastatic Melanoma in the Lungs. **J Pharm Sci**, v. 104, n. 10, p. 3524-34, 2015.

LOUIS, K. S.; SIEGEL, A. C. Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. In: STODDART, J. M. (Ed.). **Mammalian Cell Viability**:

Methods and Protocols. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. p.7-12. ISBN 978-1-61779-108-6.

LOZZIO, C. B.; LOZZIO, B. B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. **Blood**, v. 45, n. 3, p. 321-334, 1975.

LUDWIG, H. et al. International Myeloma Working Group recommendations for global myeloma care. **Leukemia**, v. 28, n. 5, p. 981-92, 2014.

MACHADO, K. E. et al. Apoptotic Events Induced by Maleimides on Human Acute Leukemia Cell Lines. **Chemical Research in Toxicology**, v. 26, n. 12, p. 1904-1916, 2013.

MACHANA, S. et al. Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line. **Chin Med**, v. 6, n. 1, p. 39, 2011.

MAGINA, M. D. A. et al. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. **Química Nova**, v. 35, p. 1184-1188, 2012.

MAHINDRA, A. et al. Latest advances and current challenges in the treatment of multiple myeloma. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 9, n. 3, p. 135-43, 2012.

MAIORAL, M. F. **Investigação dos eventos apoptóticos induzidos por chalconas sintéticas derivadas de 1-naftaldeído e 2-naftaldeído sobre linhagens de células de leucemias agudas humanas.** 2013. 144 p. (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MAIORAL, M. F. et al. Apoptotic events induced by synthetic naphthylchalcones in human acute leukemia cell lines.

Biochimie, v. 95, n. 4, p. 866-74, 2013.

MAKIN, G.; HICKMAN, J. A. Apoptosis and cancer chemotherapy. **Cell Tissue Res**, v. 301, n. 1, p. 143-52, 2000.

MASCARELLO, A. **Busca racional por moléculas bioativas em modelos de diabetes, leucemia e tuberculose**. 2012. 205 p. (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MATASSOV, D. et al. Measurement of apoptosis by DNA fragmentation. **Methods Mol Biol**, v. 282, p. 1-17, 2004.

MELO, A. M. et al. [First observations on the topical use of Primin, Plumbagin and Maytenin in patients with skin cancer]. **Rev Inst Antibiot (Recife)**, v. 14, n. 1-2, p. 9-16, 1974.

MENON, D. B.; GOPALAKRISHNAN, V. K. Terpenoids Isolated From the Shoot of *Plectranthus hadiensis* Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Cells Via the Mitochondria-Dependent Pathway. **Nutrition and Cancer**, v. 67, n. 4, p. 697-705, 2015.

MICHEAU, O. et al. Sensitization of Cancer Cells Treated With Cytotoxic Drugs to Fas-Mediated Cytotoxicity. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 11, p. 783-789, 1997.

MILLE, F. et al. The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 6, p. 739-46, 2009.

MOCAN, T. Hemolysis as expression of nanoparticles-induced cytotoxicity in red blood cells. **Biotechnology, molecular biology and nanomedicine**, v. 1, n. 1, p. 6, 2010.

MOLINARI, M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. **Cell Prolif**, v. 33, n. 5, p. 261-74, 2000.

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

NAGATA, S. Apoptotic DNA fragmentation. **Exp Cell Res**, v. 256, n. 1, p. 12-8, 2000.

NASCIMENTO, C. R. M. D. **Obtenção de derivados da primina: avaliação do perfil de atividade biológica**. 2004. 100 p (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. What Is Cancer? **About Cancer**, S.l., 2015. Disponível em: < <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer> >. Acesso em: 21 nov. 2015.

NDOZANGUE-TOURIGUINE, O.; HAMELIN, J.; BREARD, J. Cytoskeleton and apoptosis. **Biochem Pharmacol**, v. 76, n. 1, p. 11-8, 2008.

NERI, P.; BAHLLIS, N. J. Targeting of adhesion molecules as a therapeutic strategy in multiple myeloma. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 12, n. 7, p. 776-96, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod**, v. 75, n. 3, p. 311-35, 2012.

_____. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod**, 2016.

NOBILI, S. et al. Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacol Res**, v. 59, n. 6, p. 365-78, 2009.

NORBERG, E.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). **Biochem Biophys Res Commun**, v. 396, n. 1, p. 95-100, 2010.

OTTOSON, N. C. et al. Cutting edge: T cell migration regulated by CXCR4 chemokine receptor signaling to ZAP-70 tyrosine kinase. **J Immunol**, v. 167, n. 4, p. 1857-61, 2001.

PALUMBO, A.; ANDERSON, K. Multiple myeloma. **N Engl J Med**, v. 364, n. 11, p. 1046-60, 2011.

PARASCA, O. M. et al. Importance of sulfonamide moiety in current and future therapy. **Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi**, v. 117, n. 2, p. 558-64, 2013.

PATHMANATHAN, N.; BALLEINE, R. L. Ki67 and proliferation in breast cancer. **J Clin Pathol**, v. 66, n. 6, p. 512-6, 2013.

PEI, Q. et al. Gemcitabine sensitizes pancreatic cancer cells to the CTLs antitumor response induced by BCG-stimulated dendritic cells via a Fas-dependent pathway. **Pancreatology**, v. 15, n. 3, p. 233-9, 2015.

PERLMAN, H. et al. An elevated bax/bcl-2 ratio corresponds with the onset of prostate epithelial cell apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 6, n. 1, p. 48-54, 1999.

PETER, M. E.; KRAMMER, P. H. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. **Curr Opin Immunol**, v. 10, n. 5, p. 545-51, 1998.

PETERS, C.; BROWN, S. Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. **Biosci Rep**, v. 35, n. 4, 2015.

PHILCHENKOV, A. Caspases: potential targets for regulating cell death. **J Cell Mol Med**, v. 8, n. 4, p. 432-44, 2004.

PORTER, A. G.; DHAKSHINAMOORTHY, S. Apoptosis initiated by dependence receptors: a new paradigm for cell death? **Bioessays**, v. 26, n. 6, p. 656-64, 2004.

POZAROWSKI, P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. **Methods Mol Biol**, v. 281, p. 301-11, 2004.

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

PUI, C.-H. Acute Lymphoblastic Leukemia: Introduction. **Seminars in hematology**, v. 46, n. 1, p. 1-2, 2009.

PUI, C.-H.; EVANS, W. E. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 2, p. 166-178, 2006.

RAHMANZADEH, R. et al. Ki-67 as a molecular target for therapy in an in vitro three-dimensional model for ovarian cancer. **Cancer Res**, v. 70, n. 22, p. 9234-42, 2010.

RAJKUMAR, S. V. Treatment of multiple myeloma. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 8, n. 8, p. 479-91, 2011.

RAMOS, N. et al. Current Approaches in the Treatment of Relapsed and Refractory Acute Myeloid Leukemia. **Journal of Clinical Medicine**, v. 4, n. 4, p. 665, 2015.

RANG, H. P. et al. **Pharmacology**. Churchill-Livingstone, 2003.

RENVOIZE, C. et al. Apoptosis: identification of dying cells. **Cell Biol Toxicol**, v. 14, n. 2, p. 111-20, 1998.

ROSE-INMAN, H.; KUEHL, D. Acute leukemia. **Emerg Med Clin North Am**, v. 32, n. 3, p. 579-96, 2014.

SANFORD, K. K.; EARLE, W. R.; LIKELY, G. D. The Growth in Vitro of Single Isolated Tissue Cells. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 9, n. 3, p. 229-246, 1948.

SAULTZ, J. N.; GARZON, R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. **J Clin Med**, v. 5, n. 3, 2016.

SCHNEIDER, U.; SCHWENK, H.-U.; BORNKAMM, G. Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. **International Journal of Cancer**, v. 19, n. 5, p. 621-626, 1977.

SCHULZE-BERGGAMEN, H.; KRAMMER, P. H. Apoptosis in cancer--implications for therapy. **Semin Oncol**, v. 31, n. 1, p. 90-119, 2004.

SCOZZAFAVA, A. et al. Anticancer and antiviral sulfonamides. **Curr Med Chem**, v. 10, n. 11, p. 925-53, 2003.

SHEDLOCK, D. J. et al. Ki-67 staining for determination of rhesus macaque T cell proliferative responses ex vivo. **Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 77, n. 3, p. 275-284, 2010.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 1, p. 5-29, 2015.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA Cancer J Clin**, v. 65, n. 1, p. 5-29, 2015.

SILVA, I. T. D. **AVALIAÇÃO DA AÇÃO CITOTÓXICA E ANTITUMORAL DE CUCURBITACINAS NATURAIS E DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS**. 2013. 229 (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SILVA, M. N. D.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. D. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na b-lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, p. 407-416, 2003.

SIVEEN, K. S. et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors. **Biochim Biophys Acta**, v. 1845, n. 2, p. 136-54, 2014.

SLOVAK, M. L. Multiple myeloma: current perspectives. **Clin Lab Med**, v. 31, n. 4, p. 699-724, x, 2011.

SONG, M. et al. Mitochondrial fission and fusion factors reciprocally orchestrate mitophagic culling in mouse hearts and cultured fibroblasts. **Cell Metab**, v. 21, n. 2, p. 273-85, 2015.

SUDHAKAR, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. **Journal of cancer science & therapy**, v. 1, n. 2, p. 1-4, 2009.

SULIMAN, A. et al. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. **Oncogene**, v. 20, n. 17, p. 2122-33, 2001.

SUPURAN, C. T. et al. Carbonic anhydrase inhibitors: sulfonamides as antitumor agents? **Bioorg Med Chem**, v. 9, n. 3, p. 703-14, 2001.

SUPURAN, C. T.; CASINI, A.; SCOZZAFAVA, A. Protease inhibitors of the sulfonamide type: anticancer, antiinflammatory, and antiviral agents. **Med Res Rev**, v. 23, n. 5, p. 535-58, 2003.

SUPURAN, C. T.; CONROY, C. W.; MAREN, T. H. Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and inhibitory properties of 1,3,4-thiadiazole-2,5-bissulfonamide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 11, p. 843-846, 1996.

SWERDOLW, S. H. et al. **WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. 4. Lyon: IARC, 2008. 439

TAKAHASHI, A. et al. High-LET radiation enhanced apoptosis but not necrosis regardless of p53 status. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 60, n. 2, p. 591-7, 2004.

TESTA, U.; RICCIONI, R. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 92, n. 1, p. 81-94, 2007.

URRUTICOECHEA, A. et al. Recent advances in cancer therapy: an overview. **Curr Pharm Des**, v. 16, n. 1, p. 3-10, 2010.

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

VAN LOO, G. et al. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. **Cell Death Differ**, v. 8, n. 12, p. 1136-42, 2001.

VARDIMAN, J. W. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. **Chem Biol Interact**, v. 184, n. 1-2, p. 16-20, 2010.

VASEKAR, M. et al. Novel Immunotherapies for Hematological Malignancies. **Curr Mol Pharmacol**, 2015.

WANG, J.-J. et al. Lipid nanoparticles with different oil/fatty ester ratios as carriers of buprenorphine and its prodrugs for injection. **Eur J Pharm Sci**, v. 38, n. 2, p. 138-46, 2009.

WANG, Y. et al. Novel mechanism of harmaline on inducing G2/M cell cycle arrest and apoptosis by up-regulating Fas/FasL in SGC-7901 cells. **Sci Rep**, v. 5, p. 18613, 2015.

WOUTERS, J. et al. Isosterism among analogues of torasemide: conformational, electronic and lipophilic properties. **Eur J Med Chem**, v. 35, n. 10, p. 923-9, 2000.

WYLLIE, A. H. "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. **Mol Neurobiol**, v. 42, n. 1, p. 4-9, 2010.

YANG, J. et al. Prognostic significance of MCM2, Ki-67 and gelsolin in non-small cell lung cancer. **BMC Cancer**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2006.

YANG, J. et al. Prognostic significance of gelsolin expression level and variability in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 46, 2004.

ZATELLI, G. A. **INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E BIOLÓGICA DE *Eugenia hiemalis* Cambessèdes (MYRTACEAE)** 2015. 219 (Mestrado). PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA Florianópolis.

ZHANG, M. et al. Wogonin induces apoptosis in RPMI 8226, a human myeloma cell line, by downregulating phospho-Akt and overexpressing Bax. **Life Sci**, v. 92, n. 1, p. 55-62, 2013.

ZHOU, T. et al. Silver-Catalyzed Long-Distance Aryl Migration from Carbon Center to Nitrogen Center. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 46, p. 14586-14589, 2015.

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
 Centro de Ciências da Saúde
 Departamento de Análises Clínicas
 Campus Universitário - Florianópolis, SC, 88049-000, Brasil
 Tel: (048) 3721 8146 Fax: (048) 3721 9542

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Análise da expressão de proteínas em células sanguíneas de indivíduos adultos saudáveis para auxílio no diagnóstico de hemopatias

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) Senhor(a) entenda por que esta pesquisa será feita. Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir para que a decisão sobre a sua participação possa ser uma decisão bem informada. Este termo de consentimento livre e esclarecido cumpre as exigências contidas nos itens IV. 3 da Resolução CNS nº466/12.

QUAL OBJETIVO E JUSTIFICATIVA DESTE ESTUDO?

O diagnóstico de doenças hematológicas é realizado com o auxílio da citometria de fluxo que utiliza anticorpos monoclonais para identificar antígenos expressos no citoplasma e membrana celular. O exame tem início com um painel de antígenos, o qual é decidido com base na suspeita clínica e morfológica, visando identificar e caracterizar a linhagem celular afetada, fundamentando o corpo clínico em tomada de decisões conforme a enfermidade encontrada.

Dentre as doenças possíveis de serem diagnosticadas pela citometria de fluxo, pode ser citada a HPN que resulta de uma mutação somática adquirida no gene PIG-A localizado no braço curto do cromossomo X (Xp22.1), relacionado à biossíntese de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), um fosfolípide acrescentado a determinadas proteínas logo após a sua tradução, para fixá-las à parte externa da membrana celular, como uma âncora de proteínas de superfície. Devido à ausência desta âncora nas células defeituosas, as proteínas que dela dependem para sua expressão (por exemplo, CD55 e CD59, nas hemácias) não aparecem na membrana da célula, impossibilitando que a célula desempenhe suas funções normalmente, gerando consequências ao organismo.

Conforme a importância supracitada da citometria de fluxo no diagnóstico das doenças hematológicas, se faz necessário a criação de imagens de referência, baseadas em indivíduos saudáveis, para orientar a análise da expressão dos antígenos celulares e possibilitar a distinção de um indivíduo doente de um indivíduo saudável pela equipe profissional do setor de Oncohematologia.

QUAIS OS PROCEDIMENTOS DESTE ESTUDO?

Após o consentimento, serão coletadas amostras de sangue total, em tubos de coleta com anticoagulante EDTA dos doadores de sangue do Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário (HU-UFSC). Estas amostras serão encaminhadas ao laboratório de Oncohematologia, onde serão processadas conforme protocolo de rotina do laboratório, utilizando-se a marcação dos antígenos celulares com o uso de anticorpos monoclonais ligados à fluorocromos. Posteriormente, a amostra será adquirida em citômetro FACSCanto II (BD Biosciences) e analisada no software Infinicyt (Cytognos). Os resultados gerados servirão como referência de indivíduos saudáveis, para a distinção da expressão de marcadores celulares com indivíduos doentes que são atendidos pelo Serviço de Análises Clínicas do HU-UFSC.

EU TENHO QUE PARTICIPAR? QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS ESPERADOS COM A PESQUISA?

Cabe ao senhor(a) decidir se irá ou não participar. Isso não irá afetar de maneira nenhuma, o padrão de cuidados que o(a) senhor(a) irá receber. Mesmo que o(a) senhor(a) não se beneficie diretamente dos resultados da pesquisa informamos que estes resultados poderão contribuir futuramente para melhorar o diagnóstico laboratorial de inúmeros pacientes. Espera-se, com esta pesquisa, implementar uma metodologia diagnóstica que seja prática, rápida, sensível, eficaz e que auxilie na correta identificação das células afetadas nestas doenças (principalmente nos casos de hemopatias). O senhor (a) poderá solicitar a desistência da pesquisa a qualquer momento, fazendo-a junto aos pesquisadores listados no final deste documento.

EXISTEM RISCOS OU DESCONFORTOS ASSOCIADOS COM A PARTICIPAÇÃO?

Não, pois não haverá duas coletas, aproveitaremos o mesmo sangue colhido para os exames laboratoriais realizados na amostra para a doação de sangue, desta forma não há nenhum desconforto adicional.

O QUE ACONTECERÁ COM AS INFORMAÇÕES DESTA PESQUISA E COMO OS MEUS DADOS PESSOAIS SERÃO UTILIZADOS?

Informamos que seus dados serão mantidos sob sigilo absoluto e privado. A divulgação dos resultados visará apenas mostrar os possíveis benefícios obtidos na pesquisa em questão e as informações divulgadas no meio científico serão anônimas e em conjunto com as informações de todos os participantes da pesquisa. O(a) Senhor(a) poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma, através dos contatos informados no final deste documento.

O QUE ACONTECERÁ COM AS AMOSTRAS DE SANGUE CEDIDAS PARA ESTA PESQUISA?

As amostras de sangue cedidas pelo senhor(a), assim que analisadas serão dispensadas em descarte apropriado, posteriormente serão processadas, para destruir qualquer resquício que poderia ter sobrado da amostra de sangue. Após esse processamento, o resíduo gerado será recolhido pela empresa Proactiva e será descartado em aterro de material hospitalar.

QUE CUSTOS TEREI SE PARTICIPAR?

Por ser voluntário e sem interesse financeiro, o(a) Senhor(a) não terá nenhum gasto extra e também não terá direito a nenhuma remuneração.

EU POSSUO ALGUM DIREITO À INDENIZAÇÃO?

Por ser uma pesquisa de caráter voluntária e que não será realizado nenhum método adicional ao já realizado no processo de doação de sangue, o Senhor (a) não terá direito a nenhuma indenização.

QUEM REALIZARÁ ESTE ESTUDO?

Este estudo será realizado no *Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias*, situado no Hospital Universitário (HU-UFSC) e os pesquisadores envolvidos são as alunas do curso de pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC): Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira, Mariana Franzoni Maioral, Giovanna Steffenello Durigon, Lorena Santos Bubniak, Manoela Lira Reis, Pâmela Cristina Gaspar, Vanessa Mengatto, os alunos do curso de graduação em Farmácia-Bioquímica na mesma universidade: Alisson Bigolin, Suelen Mazzucco e Kauê Taneli Gonçalves, a médica hematologista Dr^ª Joanita Angela Gonzaga Del Moral, a professora Dr^ª Ana Carolina Rabelo de Moraes, as bioquímicas Chandra Chiappin Cardoso e Iris Mattos Santos, sob a orientação da professora Dr^ª Maria Cláudia Santos da Silva.

COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES?

Em caso de qualquer dano relacionado ao estudo, ou sempre que o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor entre em contato com:

Coordenadora do Projeto: Maria Cláudia Santos da Silva Fone: (048) 3721-8146

E-mail: maclau@ccs.ufsc.br

Laboratórios de Oncologia Experimental e Hemopatias e de Oncohematologia/DACL/HU

Departamento de Análises Clínicas

Centro de Ciências da Saúde

Universidade Federal de Santa Catarina

Campus Universitário

88040-900/Florianópolis, SC, Brasil

Pesquisadores: Álisson Bigolin Fone: (048) 3721-8146
 E-mail: ali_bigolin@grad.ufsc.br
 Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira Fone: (048) 3721-8146
 E-mail: renatarudolf@gmail.com

Comitê de Ética em Pesquisa (Local):

Endereço:	Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima		
Bairro:	Trindade	CEP:	88.040-900
UF:	SC	Município:	FLORIANÓPOLIS
Telefone:	(48)3721-9206	Fax:	(48)3721-9696
		E-mail:	cep@reitoria.ufsc.br

Declarações

Eu, _____
 recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre minha participação nesta pesquisa.
 Tive a oportunidade de discuti-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu voluntariamente concordo em participar deste estudo.
 Ao assinar este termo de consentimento, estou de pleno acordo com os dados a serem coletados, podendo os mesmos serem utilizados conforme descrito neste termo de consentimento. Entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

 Assinatura do Participante

Eu, _____ expliquei
 e apliquei este termo de consentimento ao participante da pesquisa e me dispôs a sanar qualquer dúvida sobre o estudo. Ao assinar este termo de consentimento, declaro, juntamente com minha equipe de pesquisa, o cumprimento da Resolução CNS nº466/12.

 Assinatura do colaborador

Florianópolis-SC, ____ de _____ de 20 ____

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da expressão de marcadores celulares em indivíduos adultos saudáveis para auxílio no diagnóstico de hemopatias

Pesquisador: Maria Cláudia Santos da Silva

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 22406413.5.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 746.486

Data da Relatoria: 11/08/2014

Apresentação do Projeto:

"Análise da expressão de marcadores celulares em indivíduos adultos saudáveis para auxílio no diagnóstico de hemopatias". Projeto que visa criar um banco de imagens de referência com fins de comparação diagnóstica em doenças hematológicas, a partir de indivíduos considerados saudáveis, a fim de estudar as doenças possíveis de serem diagnosticadas pela citometria de fluxo que resulta de uma mutação somática adquirida no gene PIG-A localizado no braço curto do cromossomo X (Xp22.1), relacionado à biossíntese de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), um fosfolípide acrescentado a determinadas proteínas logo após a sua tradução, para fixá-las à parte externa da membrana celular, como uma âncora de proteínas de superfície.

Objetivo da Pesquisa:

Criação de um banco de imagens de referência com fins de comparação diagnóstica em doenças hematológicas, a partir de indivíduos considerados saudáveis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores não existem riscos, pois não haverá duas coletas, será aproveitado o mesmo sangue colhido para os exames laboratoriais realizados na amostra para a doação de sangue, desta forma não há nenhum desconforto adicional.

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900
UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 Fax: (48)3721-9696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 746.486

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata o presente de um projeto de pesquisa coordenado pela Pro^{fa}. Dr^a. Maria Cláudia Santos da Silva do Departamento de Análises Clínicas da UFSC e tem como objetivo criar um banco de imagens de referência com fins de comparação diagnóstica em doenças hematológicas, a partir de indivíduos considerados realizarem a coleta da amostra de sangue periférico, os doadores serão examinados e entrevistados por um profissional da saúde. No exame físico, os doadores serão avaliados quanto à temperatura corporal, o peso, a altura, a pressão arterial, o pulso e a quantificação de hemoglobina capilar. A entrevista será realizada de acordo com os parâmetros para a seleção dos doadores estabelecidos pelo Ministério da Saúde pela Portaria MS nº 1.353 de 13 de junho de 2011 e pela Resolução RDC nº 57 de 16 de dezembro de 2010. O projeto se encontra devidamente instruído, documentação completa e TCLE adequado aos participantes, estando portanto de acordo com a Resolução CNS nº466/12 e normas complementares. Assim, recomendamos a sua aprovação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentação completa.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram detectadas pendências ou inadequações neste projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900
UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 Fax: (48)3721-9696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 746.486

FLORIANOPOLIS, 11 de Agosto de 2014

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-900
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-9696 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br