

Daiane Mari Perondi

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE MORTE CELULAR
INDUZIDO POR TIOSSEMICARBAZONAS EM LINHAGENS
DE CÉLULAS DE LEUCEMIAS AGUDAS HUMANAS**

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: Profa. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva

Florianópolis
2018

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

Perondi, Daiane Mari
Investigação do mecanismo de morte celular
induzido por tiossemicarbazonas em linhagens de
células de leucemias agudas humanas / Daiane Mari
Perondi ; orientadora, Maria Cláudia Santos-Silva,
2018.
98 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Leucemias Agudas. 3.
Citotoxicidade. 4. Apoptose. 5. Tiossemicarbazonas.
I. Santos-Silva, Maria Cláudia. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Farmácia. III. Título.

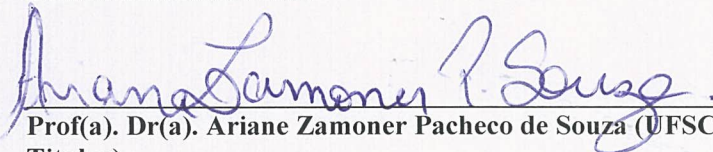
**“INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE MORTE
CELULAR INDUZIDO POR
TIOSSEMICARBAZONAS EM LINHAGENS DE
CÉLULAS DE LEUCEMIAS AGUDAS HUMANAS”**

POR

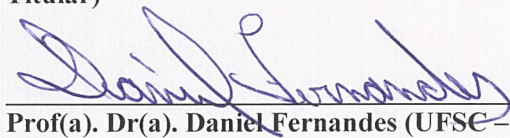
Daiane Mari Perondi

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

Banca Examinadora:



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



Prof(a). Dr(a). Daniel Fernandes (UFSC – Membro Titular)



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

**Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC**

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2018.

Dedico este trabalho aos meus pais que me mostraram que com amor, esperança e muita luta superamos as dificuldades e atingimos o objetivo.

AGRADECIMENTOS

Meu trabalho só foi possível pois teve o envolvimento de muitas pessoas indiretamente. Agradeço primeiramente a minha orientadora professora **María Cláudia Santos da Silva** por ter aberto as portas do seu laboratório sem nem me conhecer e por ter confiado no meu trabalho.

Agradeço aos meus pais **Sérgio** e **Marli** e a minha irmã **Taise** que me deram suporte financeiro e emocional para aguentar essa fase, sempre com muita paciência e carinho. Ao meu namorado **Mateus** que sempre esteve do meu lado. As minhas amigas que nem sempre estamos perto, mas mesmo assim sempre nos apoiando, citar nomes nessa parte me faria correr o risco de cometer alguma injustiça deixando alguém de fora.

Agradeço ao pessoal do **LOEH** que me acolheu e me ajudou, ensinando, apoiando, deixando a rotina diária mais leve e doce. As meninas **Stephany, Íris, Natália, Amanda V. J. e Amanda A., Bruna e Patrícia.**

Agradeço ao professor **Dr. Ricardo José Nunes** e sua doutoranda **Larissa Sens** que cederam os compostos para esse trabalho se tornar possível, **ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina** por ter apoiado este trabalho.

Espero que cada um que participou desta etapa possa compartilhar comigo o sentimento de dever cumprido e de que se não fosse por cada uma dessas pessoas este trabalho não seria possível. Obrigada de coração.

É preciso que eu suporte duas ou três larvas se
quiser conhecer as borboletas.
(O Pequeno Príncipe)

RESUMO

Câncer compreende um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos. De acordo com o tecido atingido pode ser dividido em dois grupos: tumores sólidos (carcinomas e sarcomas) e neoplasias do tecido hematopoiético e linfóide onde se encontram as leucemias. As leucemias constituem um grupo heterogêneo de neoplasias malignas caracterizadas pela proliferação desordenada de um clone de células hematopoiéticas anormais, com alterações na diferenciação, na maturação e na regulação da hematopoiese. A quimioterapia é o tratamento mais utilizado para leucemias, porém apresenta efeitos adversos severos, altas taxas de recidiva e resistência ao tratamento. Nesse contexto, um número crescente de trabalhos vem buscando substâncias biologicamente ativas de origem natural ou sintética que possam ser utilizadas como o princípio ativo de antineoplásicos com maior especificidade na indução de apoptose. Nessa linha as tiossemicarbazonas vem sendo descritas na literatura como promissores compostos antitumorais, pois sua síntese é versátil, de baixo custo e de alta quimiosseletividade, além disso já tem relatos de serem citotóxicas para outras células tumorais. Com esta perspectiva este estudo teve como objetivo a busca por novos compostos a partir de 33 tiossemicarbazonas sintéticas que apresentem atividades contra células leucêmicas, e avaliar o mecanismo de morte celular do composto mais ativo *in vitro*. Entre os compostos avaliados a tiossemicarbazona **LAP17**(*E*)-2-(4-metilbenzilideno)-*N*-(naftaleno-1-yl) hidrazinecarbotiamida apresentou resultados mais promissores e foi selecionada para estudos posteriores. Para os ensaios de citotoxicidade as células K562 e Jurkat foram incubadas com **LAP17** em concentrações crescentes por 24, 48 e 72 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT onde foi observado que o composto reduziu a viabilidade celular das duas linhagens testadas de uma maneira dependente da concentração e do tempo de incubação. Para avaliar se **LAP17** é seletivo para células leucêmicas foi analisado seu efeito sobre células mononucleadas de indivíduos saudáveis e com a finalidade de verificar se o composto possui atividade hemolítica foi realizado o teste de hemólise. **LAP17** não reduziu significativamente a viabilidade das células normais e também não apresentou atividade hemolítica significativa. A apoptose foi confirmada pela observação morfológica após coloração com brometo de etídio e laranja de acridina, pelo ensaio de fragmentação do DNA e por citometria de fluxo pelo método da Anexina-V. A investigação do efeito no ciclo celular analisada por

citometria de fluxo mostrou que **LAP17** causa um bloqueio na fase G2/M do ciclo nas células K562 e Jurkat. A fim de investigar os mecanismos pelos quais o composto causou morte celular foi avaliado o efeito do composto no potencial mitocondrial e na expressão das proteínas Bcl-2, Bax, FasR, AIF e caspase-3 por citometria de fluxo nas células K562 e Jurkat. Os resultados demonstraram que **LAP17** não causou alteração no potencial mitocondrial de nenhuma das linhagens testadas. O composto não causou alterações na proteína Bcl-2 nas células K562 e Jurkat e um aumento expressivo das proteínas Bax tanto na célula K562 quanto na célula Jurkat demonstrando assim o predomínio de Bax e sugerindo o envolvimento da ativação da via intrínseca da apoptose. Também foi observado um aumento de FasR indicando assim o envolvimento da via extrínseca. Além disso o mecanismo de ação de **LAP17** envolveu o aumento da expressão da caspase-3 e do fator indutor de apoptose. Assim o conjunto de resultados sugere que **LAP17** é um protótipo promissor para o estudo e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de neoplasias hematológicas.

Palavras-chave: Leucemias Agudas. Citotoxicidade. Apoptose. Tiosemicarbazonas.

ABSTRACT

TITLE: INVESTIGATION OF CELL DEATH MECHANISM INDUCED BY THIOSEMICARBAZONES IN HUMAN ACUTE LEUKEMIA CELL LINES

Cancer consist of a group of more than 100 diseases that have in common the uncontrolled growth of cells that invade tissues and organs. It can be classified according to the affected tissue into two groups: solid tumors (carcinomas and sarcomas) and neoplasms of hematopoietic and lymphoid tissue. The leukemias are a heterogeneous group of hematologic malignant neoplasms characterized by the irregular proliferation of an abnormal hematopoietic cells clone, promoting changes in the differentiation, maturation and regulation of hematopoiesis. Chemotherapy is the most commonly used treatment for leukemia, but it has severe adverse effects, high rates of relapse and resistance to treatment. In this context, an increasing number of studies have been seeking for natural or synthetic biologically active substances that may be used as active principle of antineoplastic agents with greater specificity in the induction of apoptosis. Thiosemicarbazones have been described in the literature as promising antitumor compounds because of their versatile synthesis, low cost and high chemo-selectivity, and also for having been reported to be cytotoxic to other tumor cells. Thus, this study aimed to find new compounds that exhibit activity against leukemic cells among 33 synthetic thiosemicarbazones, and to evaluate the mechanism of cell death of the most active compound in vitro. The thiosemicarbazone LAP17 (E)-2-(4-methylbenzylidene)-N-(naphthalen-1-yl)hydrazinecarbothioamide was found to be the most promising compound therefore it was selected for further studies. The K562 and Jurkat cells were incubated with increasing doses of LAP17 for 24, 48 and 72 hours for the cytotoxicity assays. Cell viability was determined by the MTT method where it was observed that the compound decreases cell viability in both cell lines in a concentration- and time-dependent manner. To evaluate if LAP17 is selective for leukemic cells its effect on mononuclear cells of healthy individuals was analyzed and in order to assess if the compound has hemolytic activity the hemolysis test was performed. LAP17 did not significantly reduce the viability of normal cells and also did not show significant hemolytic activity. Apoptosis was confirmed by morphological observation after staining the cells with acridine orange/ethidium bromide followed by DNA fragmentation assay and with Annexin V followed by flow cytometry analysis. The

investigation of the effect on cell cycle analyzed by flow cytometry showed that LAP17 causes a block in the G2/M phase of the cycle in both cell lines, K562 and Jurkat. The effect of LAP17 on mitochondrial potential and on the expression of Bcl-2, Bax, FasR, AIF and caspase-3 proteins was analyzed by flow cytometry in K562 and Jurkat cells to investigate the mechanisms by which the compound caused cell death. The results demonstrated that LAP17 did not cause alteration in the mitochondrial potential in any of the tested cell lines, K562 and Jurkat. The compound didn't cause any changes of Bcl-2 protein and to an expressive increase of Bax proteins in both cell lines, demonstrating predominance of Bax and suggesting the involvement of the activation of the intrinsic apoptotic pathway. It was also observed an increase in the expression of the protein FasR indicating the involvement of the extrinsic pathway as well. Moreover, the mechanism of action of LAP17 involves increased expression of caspase-3 and the apoptosis-inducing factor. Taken together, the results suggests that LAP17 is a promising prototype for the study and development of new drugs for the treatment of hematological malignancies.

Keywords: Acute Leukemias. Cytotoxicity. Apoptosis. Thiosemicarbazones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hematopoiese normal	28
Figura 2 - Diferença entre necrose e apoptose.	31
Figura 3 - Via intrínseca e Via extrínseca da apoptose	34
Figura 4 - Ciclo Celular e seus mecanismos de regulação	36
Figura 5 - Estrutura Química geral das Tiossemicarbazonas	37
Figura 6 - Delineamento de estudo.....	41
Figura 7 - Rota de síntese utilizada para obtenção das tiossemicarbazonas sintéticas.....	42
Figura 8 - Série LAP	43
Figura 9 - Série LS	44
Figura 10 - Avaliação da Citotoxicidade das séries LAP e LS nas células K562.....	54
Figura 11 - Curvas concentração e tempo resposta do efeito citotóxico das tiossemicarbazonas LAP3, LAP17 e LAP19 sobre as células K562 e Jurkat.....	55
Figura 12 - Efeito citotóxico da tiossemicarbazona LAP17 sobre células mononucleadas de indivíduos considerados saudáveis	57
Figura 13 - Efeito da Tiossemicarbazona LAP17 sobre Eritrócitos de Sangue Periférico	58
Figura 14 - Efeito da Tiossemicarbazona LAP17 na indução de apoptose em células de linhagens LA humana.....	59
Figura 15 - Efeito da Tiossemicarbazona LAP17 sobre a exposição dos resíduos de fosfatidiserina das duas linhagens celulares pelo método da Anexina-V conjugada a FITC	60
Figura 16 - Avaliação da indução da fragmentação do DNA nas células Jurkat (painel A) e K562 (painel B).	61
Figura 17 - Efeito da tiossemicarbazona LAP17 sobre o potencial mitocondrial das células K562 e Jurkat.....	62
Figura 18 - Efeito da tiossemicarbazona LAP17 sobre a expressão das proteínas Bcl-2 e Bax nas células K562 e Jurkat	63
Figura 19 - Efeito da Tiossemicarbazona LAP17 sobre a expressão da proteína FasR em células K562 e Jurkat	64
Figura 20 - Efeito da tiossemicarbazona LAP17 na expressão da proteína AIF em células K562 e Jurkat	65
Figura 21 - Efeito da tiossemicarbazona LAP17 na expressão da proteína caspase-3 em células K562 e Jurkat.....	66
Figura 22 - Esquema mecanismo de ação de LAP17	78

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo da taxa de hemólise.....	46
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de CI50 encontrados na linhagem K562 após a incubação com as Tiossemicarbonas LAP3, LAP17 e LAP19.....	55
Tabela 2 - Valores de CI50 encontrados na linhagem Jurkat após a incubação com as Tiossemicarbonas LAP3, LAP17 e LAP19.....	56
Tabela 3 - Razão entre a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e da proteína pró - apoptótica Bax nas células de LA tratadas com a tiossemicarbona LAP17.....	64
Tabela 4 - Efeito da Tiossemicarbona LAP17 (CI50) nas fases do ciclo celular das células K562 e Jurkat.....	67
Tabela 5 - Sumário de Resultados obtidos com a Tiossemicarbona LAP17.....	67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AIF – Fator indutor de apoptose
ANOVA – Análise de variâncias
BAX – Bcl-2 – *associated protein x* – proteína x associada a Bcl-2
Bcl-2 – B – *cell lymphoma –protein-2-* proteína 2 do linfoma de células B
BE/LA – Brometo de etídio/ Laranja de Acridina
Bid – BH3 – *interacting domain death agonist* – agonista de morte que interage com o domínio BH3
Caspase – *Cysteine – Dependent Aspartat – Specific Proteases* – Proteases aspartato específicas dependentes de cisteínas
CDK – *Cyclin dependente kinases* – cinases dependentes de ciclinas
CEPSH – Comitê de ética em pesquisa com seres humanos
CI₅₀ – Concentração inibitória 50%
CKI – *CDK inhibitors* – inibidores de CDK
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNase – Desoxirribonuclease
DO – Densidade óptica
EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético
EPM – Erro padrão da média
FasR – Receptor Fas
FITC – Isotiocianato de fluoresceínas
FSC – Forward scatter – padrão de dispersão frontal
G0 – Gap 0 – intervalo 0
G1 – Gap 1 – intervalo 1
G2 – Gap 2 – intervalo2
HEPES – Ácido N- (2-hidroxietyl)piperazina –N´-2 – etanossulfônico
IFM – Intensidade de fluorescência média
LA – Leucemia aguda
LLA – Leucemia linfoblástica aguda
LMA – Leucemia mielóide aguda
MTT -Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2, 5-difenil-2H-tetrazólio
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – Solução Tampão de Fosfato
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*
SBF – Soro bovino fetal
SP – Sangue periférico
TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TRAIL – Tumor necrosis factor-related apoptosis – inducing ligand –
ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1 LEUCEMIAS AGUDAS (LA)	27
2.2 TERAPIAS ANTILEUCÊMICAS.....	29
2.3 TIPOS DE MORTE CELULAR	30
2.4 APOPTOSE.....	31
2.4.1 Via Extrínseca da Apoptose.....	32
2.4.2 Via Intrínseca da Apoptose	32
2.5 CICLO CELULAR	34
2.6 TIOSSEMICARBAZONAS COMO NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS	36
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 CULTURA CELULAR.....	41
4.2 SÍNTESE QUÍMICA	42
4.3 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM AS TIOSSEMICARBAZONAS	44
4.4 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEADAS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS.....	45
4.5 TESTE DE HEMÓLISE	46
4.6 VIABILIDADE CELULAR (MÉTODO DO MTT).....	47
4.7 IDENTIFICAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR.....	47
4.7.1 Avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência com brometo de etídio e laranja de acridina.....	48
4.7.2 Avaliação da apoptose pelo método de fragmentação do DNA	48
4.7.3 Avaliação da apoptose pelo método de anexina V – FITC	49
4.8 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR	49
4.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL.....	50
4.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BAX, BCL- 2, FASR, AIF E CASPASE 3 POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	51
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5 RESULTADOS	53
5.1 EFEITO CITOTÓXICO DAS TIOSSEMICARBAZONAS DAS SÉRIES LS E LAP SOBRE CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562	53

5.2 EFEITO CITOTÓXICO DA TIOSSEMICARBAZONA LAP17 EM CÉLULAS MONONUCLEADAS DE INDIVÍDUOS CONSIDERADOS SAUDÁVEIS	56
5.3 EFEITO DA TIOSSEMICARBAZONA LAP17 SOBRE ERITRÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO	57
5.4 EFEITO DA TIOSSEMICARBAZONA LAP17 NA INDUÇÃO DE APOPTOSE DAS CÉLULAS LEUCÊMICAS K562 E JURKAT.....	58
5.5 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA TIOSSEMICARBAZONA LAP17 SOBRE O POTENCIAL MITOCONDRIAL DAS CÉLULAS K562 E JURKAT.....	61
5.6 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA TIOSSEMICARBAZONA LAP17 SOBRE AS PROTEÍNAS ANTIAPOPTÓTICA BCL-2 E PRÓ-APOPTÓTICA BAX	62
5.7 EFEITO DA TIOSSEMICARBAZONA LAP17 SOBRE O RECEPTOR FAZ.....	64
5.8 EFEITO DA TIOSSEMICARBAZONA LAP17 SOBRE O FATOR INDUTOR DE APOPTOSE (AIF).....	65
5.9 EFEITO DA TIOSSEMICARBAZONA LAP17 SOBRE A CASPASE-3.....	65
5.10 EFEITO DA TIOSSEMICARBAZONA LAP17 SOBRE AS FASES DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS K562 E JURKAT ..	66
5.11 SUMÁRIO DE RESULTADOS	67
6 DISCUSSÃO.....	69
7 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS.....	79
APÊNDICE 1 – Trabalhos Apresentados em Congressos.....	91
APÊNDICE 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	93

1 INTRODUÇÃO

O câncer é o resultado de alterações genéticas e epigenéticas nas células e abrange um conjunto de mais de 100 doenças, que apresentam em comum a proliferação desordenada das células, que podem invadir tecidos e órgãos (HANAHAN., et al 2011; FERNANDÉZ., et al 2016). A doença se caracteriza por uma homeostase perturbada, e como possuem alta capacidade de multiplicação celular, essas tendem a ser incontroláveis e invasivas. O desenvolvimento do câncer é de etiologia multifatorial, onde vários fatores podem estar envolvidos, como genéticos, ambientais e de modos de vida (BERRIDGE et al., 2010; SIVEEN et al., 2014).

De acordo com o tecido atingido, o câncer pode ser dividido em dois grupos: tumores sólidos (carcinomas e sarcomas) e em neoplasias do tecido hematopoiético e linfoide (VARDIMAN, 2010; SWERDLOW et al., 2016). Os tumores malignos sólidos se caracterizam pela formação de massas celulares neoplásicas em tecidos previamente íntegros, já as neoplasias originadas na medula óssea e no sistema linfático são denominadas neoplasias hematológicas. Nesse grupo encontram-se as leucemias, as quais são subdivididas de acordo com as características clínicas e biológicas da doença (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015).

Estimativas de acordo com dados do GLOBOCAN de 2012 indicam que em 2030 irá surgir 21,4 milhões de novos casos de câncer e 13,2 milhões de mortes de câncer no mundo. Em 2012 a doença foi responsável por 8 milhões de óbitos, mais de 60% dos casos acontecem na África, Ásia e Américas Central e do Sul (FERLAY et al., 2015). No Brasil as estimativas para o ano de 2018 apontam a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer, destes 10.800 serão leucemias. Em Santa Catarina nos anos de 2017/2018 é esperado cerca de 480 novos casos de leucemia, onde 20 seriam na cidade de Florianópolis (INCA, 2018).

Levando em consideração estes dados o câncer constitui um problema de saúde pública para os países desenvolvidos e para aqueles em desenvolvimento. Além disso, como é de responsabilidade do Sistema Único de Saúde (SUS) prestar assistência oncológica para a população brasileira desde 1990, o crescimento do número de casos a cada ano, representa ônus para o sistema público brasileiro, e medidas de prevenção e a investigação de novos alvos de tratamento devem ser consideradas (CARVALHO, et al, 2013).

Um dos maiores problemas da doença é o tratamento, pois muitos pacientes ainda sofrem com complicações relacionadas a quimioterapia,

como toxicidade sistêmica elevada e resistência a múltiplos fármacos (CABRERA., et al, 2015). Por isso, a morbidade associada aos quimioterápicos ainda é um obstáculo significativo, pois a maioria dos fármacos não é alvo específico (RUMJANEK., et al, 2013; SEVAL., et al, 2015).

Nesse contexto, um número crescente de pesquisadores e indústrias farmacêuticas vem buscando substâncias biologicamente ativas de origem natural ou sintética que possam se tornar antineoplásicos que tenham uma maior especificidade na indução de morte celular não imunogênicas em células tumorais, com efeitos adversos mínimos para o paciente e que sejam de fácil administração (KOSIOR et al., 2011).

Nessa linha de investigação, as tiossemicarbazonas surgem como uma opção de compostos sintéticos para serem analisados como compostos citotóxicos. Esta classe apresenta uma grande variedade estrutural podendo resultar em diferentes propriedades biológicas.

Dessa forma, este estudo buscou investigar novos compostos pertencentes a classe química das tiossemicarbazonas com atividade citotóxica contra células de linhagem de leucemias agudas, com o objetivo de buscar um composto que induza a morte celular por apoptose e que não apresente citotoxicidade para as células normais, bem como os mecanismos de morte celular envolvidos, e, com isso, contribuir com a investigação de novos quimioterápicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Na revisão apresentada será abordado temas como leucemias agudas, tratamentos para os diferentes tipos de leucemias, mecanismos e descrição dos tipos de morte celular, ciclo celular e informações sobre a classe de compostos sintéticos tiossemicarbazonas como possível alternativa terapêutica para as neoplasias hematológicas estudadas.

2.1 LEUCEMIAS AGUDAS (LA)

As leucemias agudas constituem um grupo heterogêneo de neoplasias malignas caracterizadas pela proliferação anormal de um clone de células hematopoiéticas anormais, com alterações na diferenciação, na maturação e na regulação da hematopoiese (SWERDLOW et al., 2016; CRUZ et al., 2017).

A transformação leucêmica pode ocorrer em diferentes fases da diferenciação de precursores linfoides ou mieloides, o que a caracteriza como uma doença heterogênea, sob o aspecto biológico e morfológico (BAIN, 2010). Dessa forma, as leucemias podem ser divididas em linfoides e mieloides, e em agudas e crônicas, de acordo com a linhagem e estágio de maturação dos precursores afetados (PUI, 2009; SWERDLOW et al., 2016).

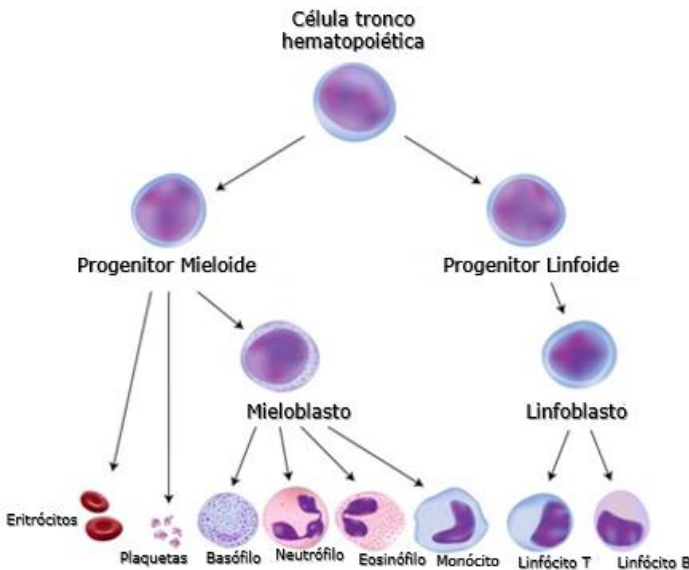
A leucemia mieloide aguda (LMA) ocorre quando o clone leucêmico tem origem nos precursores hematopoiéticos comprometidos com a linhagem mieloide, já na leucemia linfoblástica aguda (LLA) há comprometimento dos progenitores linfoides B, T ou *Natural Killers* (NK) (Figura 1) (BAIN, 2010; SWEDRLOW et al., 2016). A proliferação descontrolada das células leucêmicas impede a proliferação normal das células sanguíneas normais, como os leucócitos, os eritrócitos e as plaquetas, o que leva os indivíduos portadores dessas neoplasias apresentarem anemias, desordens hemorrágicas, e estarem mais sujeitos a infecções (ZAGO, 2005; SWERDLOW et al., 2016).

A LMA acomete principalmente adultos (80% dos casos), e o seu desenvolvimento está relacionado a vários fatores de risco, como a idade, antecedente de doença hematológica (síndromes mielodisplásicas, neoplasia mieloproliferativa), alterações genéticas, exposição ambiental ou ocupacional a agentes químicos, físicos e vírus. Os sintomas são inespecíficos como fraqueza devido a anemia, sinais de sangramento pela trombocitopenia e febre pela neutropenia (SWERDLOW et al., 2016). Da mesma forma que a LMA, a LLA pode ocorrer em adultos e crianças, mas a maior incidência é observada em crianças abaixo de 5 anos, dentre as

quais, 95% atingem a remissão completa. Nos adultos o prognóstico é diferente, apesar de 60-80% dos casos atinjam a remissão completa, apenas 35-40% apresentam uma sobrevida prolongada livre de doença (IACOBUCCI et al., 2012). Semelhantes a LMA, os pacientes portadores de LLA apresentam sintomas como febre (devido a neutropenia), fraqueza, cansaço, dispneia aos esforços (devido a anemia) e sangramentos na mucosa e petéquias (devido a trombocitopenia) (PUI et al., 2012).

Segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) publicado em 2001, (com atualização em 2008 e 2016), o diagnóstico das LAs é dado pela avaliação conjunta das características clínicas e laboratoriais apresentadas pelo indivíduo no momento do diagnóstico (SWERDLOW et al., 2016). E, é baseado nesses critérios que é determinado o tratamento mais adequado para cada subtipo de LA. Como citado anteriormente, as leucemias agudas compreendem um grupo de doenças heterogêneas entre si, por isso, o tratamento é diferente entre os subtipos determinados pela OMS.

Figura 1 - Hematopoiese normal



De acordo com a linhagem e o estágio de maturação a classificação das leucemias se dá em agudas ou crônicas e em mielóide ou linfóides.

Fonte: Adaptado de DE FARIA, 2008

2.2 TERAPIAS ANTILEUCÊMICAS

O tratamento das leucemias tem como objetivo destruir as células leucêmicas e permitir que a medula óssea se regenere e volte a produzir células hematopoiéticas normais (SAULTZ et al., 2016). As diferentes terapias como radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, transplante de medula óssea ou a combinação dessas são escolhidas de acordo com o subtipo da leucemia aguda e diferentes fatores prognósticos como idade, alterações genéticas entre outras (BURNETT, 2012; CORNELL et al., 2012). O transplante de medula óssea têm sido o tratamento mais eficaz para leucemia, porém ele não é indicado para todos os pacientes, e, frequentemente, está associado a várias complicações (BRISOT; MOHTY, 2015; CASSIER et al., 2017), por isso, o tratamento quimioterápico ainda é o mais utilizado na prática clínica.

Em geral os protocolos de tratamento das LA envolvem a combinação de diferentes fármacos citotóxicos administrados de forma sistêmica. Essa combinação se baseia no potencial sinérgico dos fármacos utilizados ou aditivo de dois ou mais compostos, o que permite a utilização de dosagens menores do que aquelas consideradas efetivas para cada um deles utilizados isoladamente. Essa medida, diminui as reações adversas associadas aos quimioterápicos e a resistência ao tratamento (FUSO et al., 2016).

Em linhas gerais, o tratamento quimioterápico consiste de duas fases: a fase de indução que tem por objetivo alcançar a remissão completa e a consolidação onde o objetivo é manter a remissão e eliminar elementos celulares malignos residuais que possam levar o paciente à recidiva. A fase de indução consiste em uma terapia intensa, que visa alcançar a remissão hematológica completa, ou seja, menos de 5% de células blásticas na medula óssea e ausência de células leucêmicas com fenótipo semelhante ao observado no momento do diagnóstico, avaliadas por citometria de fluxo (GRIMWADE et al., 2014; JACQUES et al., 2015). O risco de recaída é mais elevado nos primeiros dois anos, uma recaída tardia é considerada incomum (CORNEL et al., 2012; LARSON, 2017). Estratégias pós remissão incluem quimioterapia convencional e transplante autólogo ou alogênico de células-tronco hematopoiéticas (CRUZ et al., 2006; SAUTZ et al., 2016).

Os avanços na compreensão das alterações genéticas e moleculares subjacentes as patogêneses das LAs proporcionaram um maior entendimento da biologia dessas doenças, isso gera informações úteis que predizem a probabilidade de qualquer paciente alcançar e manter a remissão após a quimioterapia convencional, o que leva ao

desenvolvimento de abordagens de tratamento estratificado de acordo com risco prognóstico (GRIMWADE et al., 2009).

Apesar dos grandes avanços no desenvolvimento de novos quimioterápicos, da utilização de protocolos de tratamentos baseados na estratificação de riscos, a eficácia da resposta ao tratamento farmacológico ainda é limitada por três fatores principais: (i) pelas características farmacocinéticas do fármaco em relação ao alcance da célula alvo em concentrações adequadas; (ii) pelos efeitos adversos que causam nos tecidos e células normais; e (iii) pela resistência dos tumores a agentes citotóxicos administrados, sendo o último a principal causa de insucesso do tratamento (TSURUO et al., 2003; FILIPITS, 2004). Além disso, a morbidade associada ao tratamento quimioterápico e a resistência dos pacientes em relação ao tratamento ainda é um obstáculo a ser vencido na quimioterapia (VASEKAR et al., 2015).

Por isso, a busca por novos fármacos citotóxicos com maior especificidade para as células tumorais e com menos efeitos adversos para o paciente tem sido um objetivo crescente de pesquisadores e companhias farmacêuticas nessa área. Assim, muitos compostos naturais ou sintéticos bioativos têm sido estudados como protótipos de quimioterápicos, entre eles a tiossemicarbazonas.

2.3 TIPOS DE MORTE CELULAR

Dentre os diversos tipos de morte celular programada, a apoptose é a mais bem estudada (LI; DEWSON, 2015), porém outras são descritas na literatura, como autofagia (KULKARNI et al., 2015), necrose (KARCH; MOLKENTIN, 2015), mitose catastrófica, necroptose e netose (ZHAO et al., 2015) e a anoikis (TAN et al., 2015).

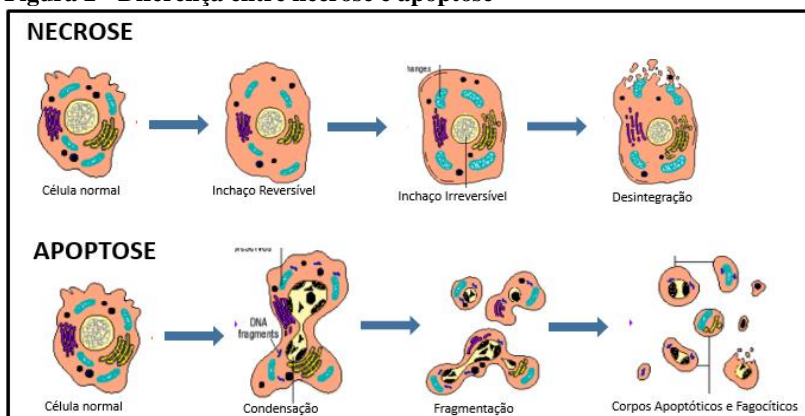
A principal característica da morte celular programada é eliminar as células de um tecido maduro ou em formação de uma forma controlada. A presença de uma desordem em algum dos processos de sobrevivência ou na morte celular acarreta em consequências patológicas que podem levar a distúrbios embrionários, doenças neurodegenerativas e o desenvolvimento de neoplasias (FULDA, 2009).

A necrose é um tipo de morte celular não programada e não sujeita a regulações celulares, e está relacionada a agressões severas, o que leva a queda acentuada de ATP e/ou lesão da membrana. As mudanças morfológicas observadas diferem da apoptose, e incluem aumento do volume celular, formação de vacúolos citoplasmáticos, desorganização do citoplasma, desnaturação de proteínas citoplasmáticas, distensão do retículo endoplasmático, inchaço das mitocôndrias, agregação da

cromatina, dissolução dos ribossomos e perda de integridade da membrana celular (ELMORE, 2007; RASTOGI et al., 2009). As diferenças morfológicas entre necrose e apoptose podem ser observadas na Figura 2.

Estudar sobre como as vias apoptóticas estão alteradas no câncer é fundamental para o entendimento da progressão dessa doença, assim como para o desenvolvimento de novas terapias antitumorais que possam ser mais efetivas, e com menos reações adversas para o paciente (HUNTER et al., 2007).

Figura 2 - Diferença entre necrose e apoptose



Fonte: Adaptado de Rastogi e Sinha, 2009

2.4 APOPTOSE

O termo apoptose foi utilizado pela primeira vez em 1972 para descrever uma forma completamente distinta de morte celular. A apoptose é definida por características morfológicas (arredondamento da célula, redução do volume celular, fragmentação nuclear, exposição à fosfatidilserina, perda de potencial de membrana mitocondrial) e ativação de caspases. Este tipo de morte gera pouca reação inflamatória, devido ao fato de as células apoptóticas não liberarem o conteúdo celular para o tecido circundante pois são digeridas rapidamente impedindo a liberação das citocinas inflamatórias (ELMORE, 2007; ZHANG et al., 2017).

Um dos primeiros marcadores da apoptose é a externalização da fosfatidilserina na membrana celular (RYSVY et al., 2014). As primeiras alterações visíveis da apoptose são o encolhimento da célula e condensação do núcleo de da cromatina (picnose), nesse primeiro estágio

as células parecem com uma massa oval ou arredondada, com citoplasma denso e núcleo compacto, podem apresentar aumento da granulidade citoplasmática, no segundo estágio ocorre a formação de invaginações e pregas na membrana plasmática denominadas blébs. Outra característica importante da apoptose é a fragmentação do DNA que acontece pela ação de endonucleases ativas, que produz fragmentos em tamanhos variáveis, sempre múltiplos de 200 pares de base (RUBIN et al., 2010; TOWER, 2015).

A regulação da apoptose envolve duas vias principais, a via extrínseca iniciada pelos receptores de necrose tumoral (TNF) e a via intrínseca ou mitocondrial controlada pela família Bcl-2 (FULDA, 2015; CASSIER et al., 2017).

2.4.1 Via Extrínseca da Apoptose

A via extrínseca se inicia por sinais extracelulares onde o ligante se liga a membrana plasmática. Os receptores de morte presentes na membrana citoplasmática apresentam domínio citoplasmático fundamentais para propagar sinais apoptóticos e são membros da família do receptor TNF (Fator de Necrose Tumoral), entre eles TNF – R1, FaS, AP01, CD95, receptor de morte 3 ou DH3, TRAIL-R1 (Receptor 1 do ligante relacionado ao TNF e indutor de apoptose), TRAIL-R2 (Receptor 2 do ligante relacionado ao TNF e indutor da apoptose e DR6 (receptores de morte 6) (MITA., et al., 2006; FULDA, 2015).

Estimulados pela ligação ao ligante, os domínios de morte (DD) são recrutados pelos seus receptores, como o FADD (domínio de morte associado ao Fas) e o TRADD (domínio de morte associado ao fator de necrose tumoral), que em conjunto com as caspases iniciadoras -8 e -10 formam o complexo DISC (complexo sinalizador indutor de apoptose), que resulta na auto clivagem e ativação dessas duas caspases, que ativam as caspases efetoras -3, -6 e -7, que, por sua vez, clivam substratos celulares o que leva a apoptose. A caspase -8 pode induzir a clivagem da proteína BID (proteína agonista do domínio de morte), o que aumenta a permeabilidade da mitocôndria e a liberação de proteínas pró-apoptóticas (ELMORE, 2007; KUROKAWA., et al, 2009; KOFF., et al, 2015).

2.4.2 Via Intrínseca da Apoptose

A via intrínseca é ativada através da mitocôndria, onde os estímulos apoptóticos desencadeiam a liberação de proteínas, e, consequentemente, a liberação para o citosol de fatores como citocromo

c, proteínas Smac/diablo e o fator indutor de apoptose (AIF) (FULDA, 2015). O AIF atua de um modo independente de caspase. Uma vez liberado no citoplasma, se transloca para o núcleo e causa fragmentação de DNA (RASTOGUI e SINHA, 2009; SEVRIOUKOVA, 2011).

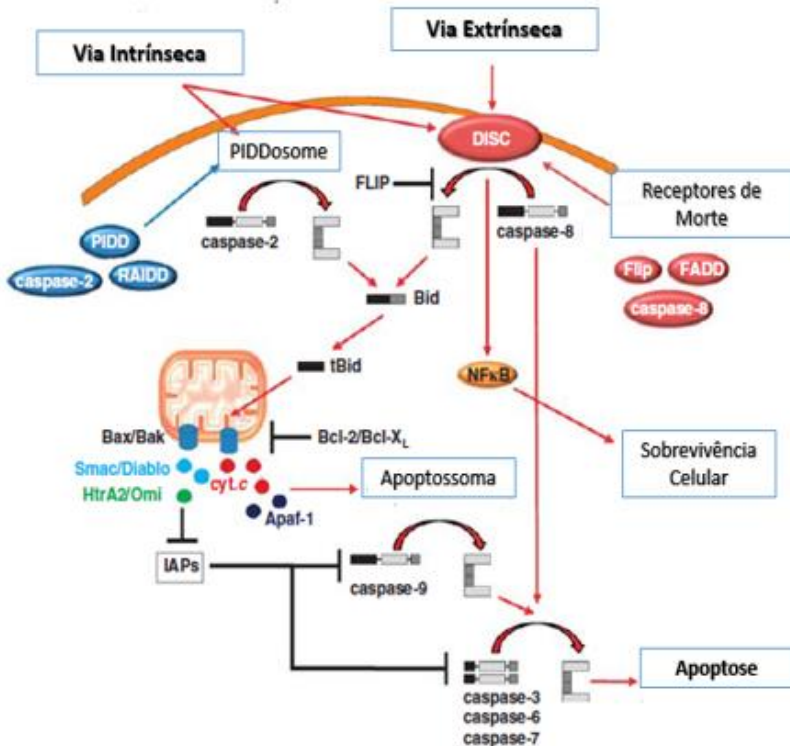
Ausência de fatores de crescimento, hormônios e citocinas, radiação, toxinas, hipóxia, hipertermia, infecção viral, radicais livres, danos ao DNA são estímulos que podem levar à ativação da via intrínseca da apoptose (ELMORE, 2007; FRENZEL et al., 2009). Perda de potencial mitocondrial, liberação de proteínas da mitocôndria e permeabilidade da membrana mitocondrial alterada são mecanismos que sofrem uma regulação por membros da família das proteínas Bcl-2 (ROLAND et al., 2010).

A família Bcl-2 é constituída por proteínas com efeito antiapoptótico, entre elas: Bcl-2 e Bcl-XL. Essas proteínas protegem a célula contra a apoptose e as proteínas pró-apoptóticas, como a Bax, Bid, Noxa e Bak, que são proteínas responsáveis por desencadear a apoptose (Figura 3). Diante de um sinal estimulador membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 se translocam para a membrana mitocondrial externa. A oligomerização dessa proteína induz a célula a apoptose por dois mecanismos distintos: formação direta dos poros protéicos na membrana mitocondrial e ligação via domínio BH3 às proteínas Bcl-2 e Bcl-XL antagonizando-as (CASSIER et al., 2017). A super expressão de Bcl-2 é vista como um fator de mau prognóstico em pacientes com leucemias agudas (SUAREZ et al., 2001; FRENZEL et al., 2009).

As caspases executoras (-3, -6 e -7), têm como alvo final a clivagem de proteínas cinases, proteínas do citoesqueleto e proteínas relacionadas ao reparo do DNA (Figura 3). Entre os substratos clivados se encontram a PARP (Polimerase Poli-ADP-Ribose). A clivagem da PARP pelas caspases interfere no reparo do DNA, que pode ser um importante indicador de apoptose (PERES e CURI, 2005; OLSSON et al., 2011). Tanto a via intrínseca quanto a via extrínseca convergem para a ativação da caspase -3, desencadeando uma série de alterações morfológicas, que caracterizam a apoptose (WYLLIE, 2010; FULDA, 2015).

Nesse contexto, estudar os mecanismos indutores de apoptose é um processo imprescindível para a busca de novas terapias antitumorais.

Figura 3 - Via intrínseca e Via extrínseca da apoptose



Estímulos externos iniciam a via intrínseca, resultando na despolarização da membrana mitocondrial externa e na liberação de fatores como citocromo c, essa etapa é regulada pela família de proteínas Bcl-2. A via extrínseca se dá pela ligação dos receptores de morte, que resultam na ativação da caspase -3 e levam a célula a apoptose. Proteínas como AIF, IAPs, Smac/diablo também participam da cascata da apoptose.

Fonte: Adaptado de OLSSON e ZHYVOTOVSKY, 2011

2.5 CICLO CELULAR

O ciclo celular mostra a progressão de uma célula, além de possuir um papel fundamental na replicação do DNA e na segregação dos cromossomos homólogos para as células – filhas, originadas durante a divisão celular (BRADFORD et al., 2010; TARN et al., 2011). Conhecer o ciclo celular e seus mecanismos de regulação é fundamental para compreender a leucemogênese (ABBAS et al., 2009).

O ciclo celular eucariótico consiste nas seguintes fases sequenciais: G₁ (Gap 1), Síntese (S), G₂ (Gap 2) e fase M. A fase G₁ é o intervalo entre a mitose que originou a célula e a fase S, a fase S é a fase de síntese do DNA e a fase G₂ é o intervalo entre a fase S e a mitose que dará origem a duas células-filhas, durante essa fase a célula está se preparando para a divisão mitótica em duas células-filhas, e a fase M é a fase de mitose (**Figura 4**). A transição de uma fase do ciclo celular para outra ocorre de modo ordenado, a qual é controlada por diferentes proteínas celulares. A classe de proteínas que controla essa progressão é composta por enzimas cinases dependentes de ciclinas, denominadas CDK's, as quais são ativadas em pontos específicos do ciclo celular (SCHWARTS e SHAH, 2005; MALUMBRE et al., 2009).

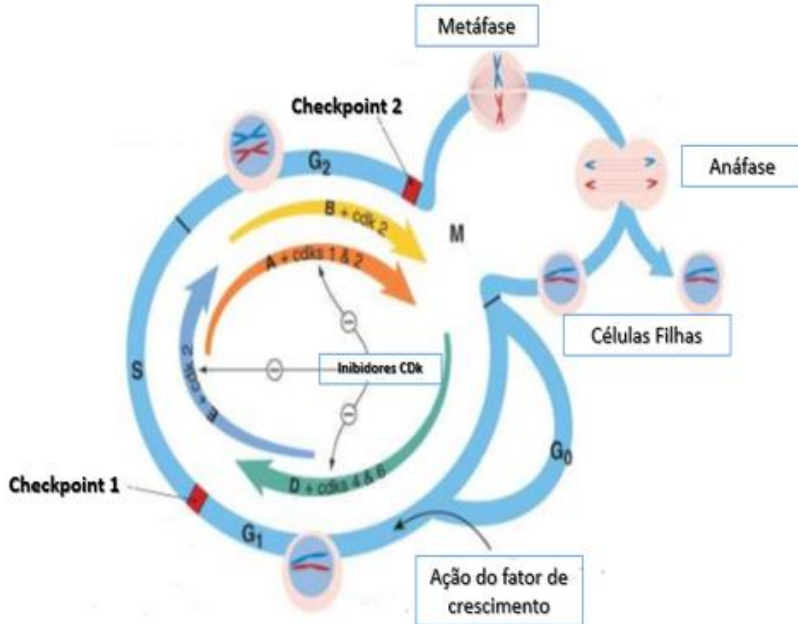
Na presença de um fator estimulante de dano celular, os inibidores de CDK's impedem que essas proteínas se liguem às suas respectivas ciclinas até o total reparo do DNA. A proteína p53 (proteína supressora de tumor) atua no checkpoint 1 (**Figura 4**) a proteína p21 age em diversas vias supressoras do tumor levando à parada do ciclo celular, afim de corrigir um dano genômico (ABBAS; DUTA, 2009; BONELLI et al., 2014). A proteína p53 também pode levar a célula a um processo de apoptose, assim a supressão ou mutação dessa proteína pode contribuir para o desenvolvimento de processos neoplásicos (HUNTER et al., 2007).

Perturbações nos checkpoints entre as fases do ciclo celular podem levar ao comprometimento da integridade do genoma e ao desenvolvimento de neoplasias e diminuição significativa da eficácia das terapias antitumorais (ALBERTS et al., 2004).

As células que se encontram em estado de quiescência, fora do ciclo celular se encontram na fase G₀, onde se encontram metabolicamente ativas, mas sem entrar em divisão (KUMAR et al., 2010). As células tumorais não finalizam o ciclo de replicação celular de forma normal, ou seja não retornam a fase G₀, passam diretamente para a fase G₁ levando a proliferação celular descontrolada (ALMEIDA et al., 2005). O ponto de checagem G₂/M é responsável pelo bloqueio da mitose na presença de danos ao DNA, a expressão alterada de proteínas envolvidas neste ponto de checagem está associada à catástrofe mitótica que leva a deficiências no ponto de checagem do ciclo celular (LÖBRICH et al., 2007).

Estudar as perturbações nos pontos de checagem do ciclo celular que comprometem a integridade do genoma pode ser importante para melhorar a eficácia dos antitumorais (KASTAN et al., 2004).

Figura 4 - Ciclo Celular e seus mecanismos de regulação



Fonte: Adaptado de RANG et al. (2003)

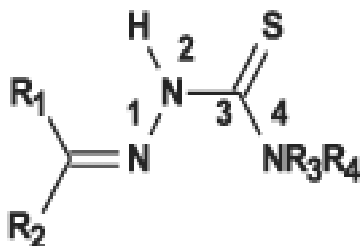
2.6 TIOSSEMICARBAZONAS COMO NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS

Durante muito tempo a pesquisa de novos fármacos se concentrou em compostos orgânicos e produtos naturais, a avaliação do perfil farmacológico de produtos sintéticos teve início no ano de 1965 com a descoberta da atividade antitumoral da cisplatina, quimioterápico utilizado na clínica até hoje (ROSENBERG et al., 1965), assim começou o interesse por se estudar novas moléculas sintéticas.

Nesse contexto, buscar novos alvos terapêuticos capazes de levar a célula tumoral a morte por apoptose ou então conseguir o bloqueio do ciclo celular envolve o estudo de diversos compostos naturais ou sintéticos e vem-se fazendo cada vez mais necessário, levando em consideração o pouco avanço no tratamento de algumas doenças (KADOWAKI; KITAWAKI, 2011).

Assim podemos citar as tiossemicarbazonas que são compostos orgânicos que podem ser considerados bases de Schiff, cuja estrutura geral e sua numeração pode ser observadas na **Figura 5**.

Figura 5 - Estrutura Química geral das Tiossemicarbazonas



R₁, R₂, R₃ e R₄ = H, Alquil e aril

Fonte: DE AQUINO., et al, 2009

Sua síntese é relatada na literatura, cuja reação é reconhecida por sua versatilidade, baixo custo, alta quimiosseletividade e por geralmente apresentar bons rendimentos (BENBROOK et al., 1997; DU et al., 2002). O mecanismo de reação da formação das tiossemicarbazonas assemelha-se ao de formação de iminas, todas as etapas dessa reação são reversíveis, geralmente sua formação se dá em um pH entre 4 e 5 (TENORIO et al., 2005; OLIVEIRA, 2015).

Alguns trabalhos demonstram a atividade biológica desse composto, como atividade antiviral (TEITZ et al., 1994), antitumoral (DE OLIVEIRA et al., 2015; FEUN et al., 2002; LEHMKE et al., 1977; SERDA et al., 2012), antibacteriana (DE AQUINO et al., 2008), antiparasitária (BHARTI et al., 2002; DE MELOS et al., 2015; ESPÍNDOLA et al., 2015).

Esta classe de compostos orgânicos também é conhecida por apresentar propriedades para a formação de complexos organometálicos. Os complexos metálicos das tiossemicarbazonas apresentam diversas propriedades farmacológicas incluindo atividades antitumorais (STEFANI et al., 2015). Em algumas circunstâncias a atividade biológica aumenta com a complexação de metais como o ferro (BISCEGLIE et al., 2015; FERRAZ et al., 2009).

Estudos mostraram que as tiossemicarbazonas podem inibir a enzima ribonucleotídeo redutase, que está envolvida na síntese do DNA e na divisão celular. Por isso, a inibição dessa enzima pelas

tiossemicarbazonas é de grande interesse para o desenvolvimento de agentes antitumorais, (FINCH et al., 2000; LESSA et al., 2010).

Considerando as propriedades biológicas das tiossemicarbazonas, e o interesse pela pesquisa de novos alvos terapêuticos capazes de levar a célula tumoral a morte por apoptose, neste trabalho foi investigado o efeito citotóxico da tiossemicarbazonas sobre células de linhagens de LA.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito citotóxico de 33 tiossemicarbazonas sintéticas sobre células de linhagem de leucemia mieloide aguda humana (K562) e de leucemia linfóide aguda humana (Jurkat), e avaliar o mecanismo de morte celular do composto mais ativo *in vitro*.

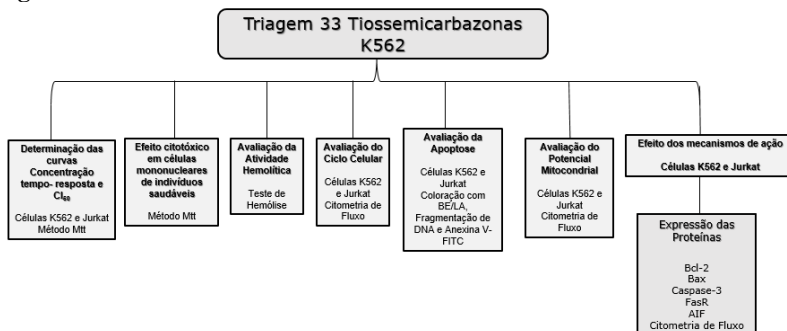
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito citotóxico de duas séries de tiossemicarbazonas sintéticas, uma com 16 compostos e outra com 17 compostos sobre as células de linhagem de leucemia mieloide aguda humana K562;
- Selecionar os compostos com maior atividade citotóxica e determinar suas respostas em relação a concentração e ao tempo de incubação, bem como calcular sua CI_{50} em células de linhagem de leucemia linfóide aguda Jurkat e leucemia mieloide aguda K562 de origem humana;
- Avaliar a seletividade da tiossemicarbazona LAP17 em relação as células mononucleares de indivíduos saudáveis;
- Avaliar o potencial de hemólise da tiossemicarbazona LAP17;
- Investigar o tipo de morte celular induzido pela tiossemicarbazona LAP17;
- Analisar o efeito da tiossemicarbazona LAP17 sobre o ciclo celular das células Jurkat e K562;
- Avaliar o efeito da tiossemicarbazona LAP17 sobre o potencial mitocondrial das linhagens K562 e Jurkat;
- Investigar se o efeito citotóxico da tiossemicarbazona LAP17 sobre as células de linhagem de leucemias agudas Jurkat e K562 envolve os seguintes fatores reguladores de apoptose: caspase -3, proteína antiapoptótica Bcl-2, proteína apoptótica Bax, fator indutor de apoptose (IAF) e receptor FasR.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção aborda os procedimentos, as técnicas e os reagentes utilizados para a obtenção deste trabalho, conforme apresentado na Figura 6.

Figura 6 - Delineamento de estudo



Fonte: A autora

4.1 CULTURA CELULAR

Foram utilizadas duas linhagens de leucemias agudas humanas: LMA secundária a LMC (K562) e LLA-T (Jurkat). As linhagens K562 e Jurkat foram cedidas pelo Prof. Dr. Alberto Orfao do *Cientro de Investigación del Cancer* da Universidade de Salamanca.

A linhagem celular K562 estabeleceu-se de uma efusão pleural de um paciente de 53 anos com leucemia mielóide crônica em crise blástica (KOEFLER et al., 1980). A linhagem Jurkat foi estabelecida do sangue periférico de um paciente de 14 anos em sua primeira recidiva de LLA de células T (SCHNEIDER et al., 1977).

A células foram mantidas em garrafas plásticas para cultura celular contendo meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (K562 e Jurkat), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 10 mM de tampão de ácido N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (Hepes), Ph 7.2, e mantidas em estufa úmida a 37 °C, com 5% CO₂.

Os meios de cultura, a penicilina, a estreptomicina, o tampão HEPES e o SBF foram adquiridos da Gibco®, *Invitrogen Corporation*, Brasil.

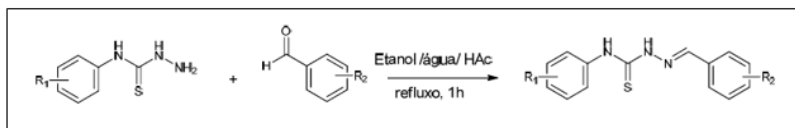
As células foram semeadas a uma densidade de $1,0 \times 10^6$ células/garrafa e repicadas a cada 48 a 72h em fluxo laminar. No início de cada experimento a suspensão celular foi centrifugada a 1500 RPMi por dez minutos em temperatura ambiente (20° a 25°C). Descartou-se o sobrenadante, o sedimento celular foi ressuspensionado em 1ml de meio de cultura RPMI. As células viáveis foram avaliadas pelo método de exclusão com o corante azul de *trypan* (0,5%). Foi utilizado para experimentos apenas as amostras com viabilidade superior a 90%. A quantidade de células viáveis adicionadas às placas de cultura variou conforme o protocolo experimental, mantendo a relação de 1×10^5 células/poço para o tempo de tratamento de 24 h, 5×10^4 células/poço para 48 h e $2,5 \times 10^4$ células/poço para 72 h e 200 μl de meio de cultura.

Todos os procedimentos de preparação de amostras foram realizados em condições estéreis.

4.2 SÍNTESE QUÍMICA

As tiossemicarbazonas da série LAP e da série LS são inéditas e foram sintetizadas de acordo com a metodologia descrita na literatura (DE AQUINO et al., 2008) pela doutoranda Larissa Sens sob a orientação do professor Dr. Ricardo José Nunes do Laboratório Estrutura e Atividade do Departamento de Química da UFSC, conforme Figura 7.

Figura 7 - Rota de síntese utilizada para obtenção das tiossemicarbazonas sintéticas

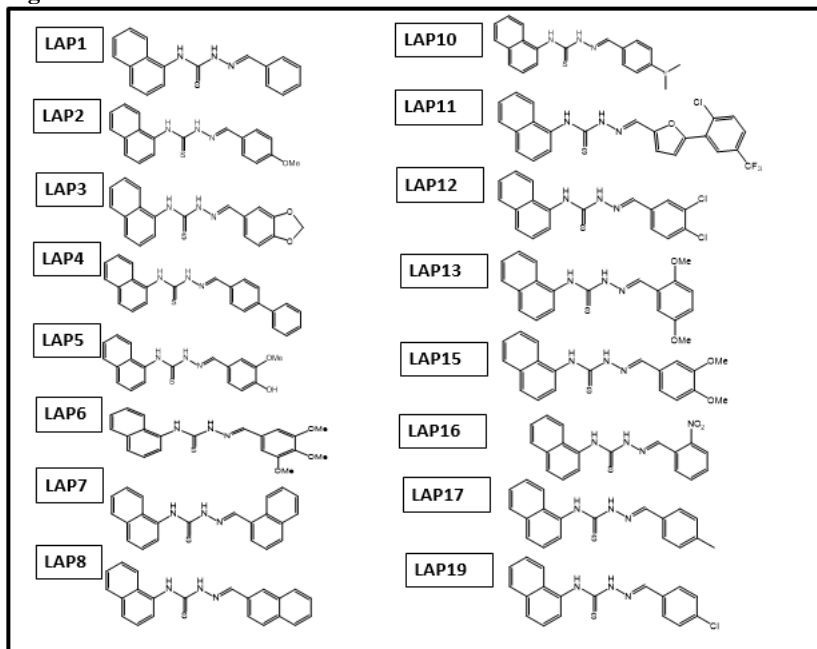


Rota de síntese para obtenção das tiossemicarbazonas sintéticas, Ph entre 4 e 5, todas as reações são reversíveis.

Fonte: DE AQUINO et al., 2008.

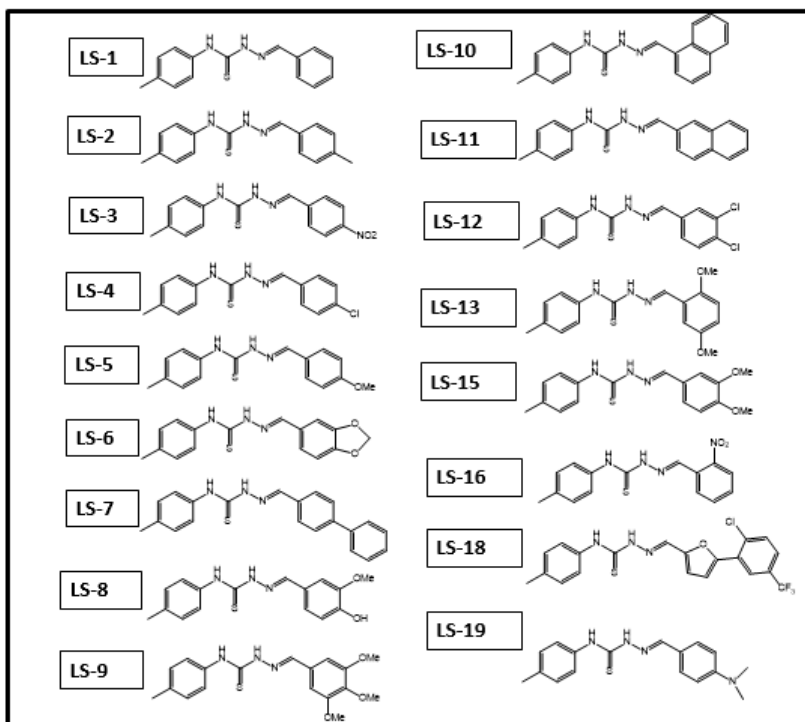
Nas figuras abaixo podemos observar a estrutura das Tiossemicarbazonas sintetizadas da série LAP (Figura 8) e série LS (Figura 9).

Figura 8 - Série LAP



Fonte: A autora

Figura 9 - Série LS



Fonte: A autora

4.3 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM AS TIOSSEMICARBAZONAS

As tiossemicarbazonas foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 10 mM e armazenadas a 4 °C. Nos experimentos foram utilizadas soluções preparadas a partir dessa solução estoque e diluídas em meio de cultura. A concentração das tiossemicarbazonas avaliadas variou entre 1 e 100 μ M, não ultrapassando a concentração de 2% (v/v) para o veículo. O tratamento foi realizado pela adição das tiossemicarbazonas sintéticas às células K562 e Jurkat em um volume máximo de 10% do volume da suspensão celular adicionada ao poço da placa de cultura. As células foram mantidas em estufa úmida a 37 °C, com 5% CO₂, por períodos que variaram conforme o protocolo experimental. Foram utilizados dois controles, um de células sem

tratamento e outro acrescido do solvente (DMSO) ao meio de cultura na maior concentração utilizada no experimento.

Inicialmente foi realizado uma triagem apenas com a célula K562 por ser considerada um modelo de célula de leucemia aguda resistente obtida através da amostra de um paciente com LMA secundária a uma LMC cujo prognóstico é desfavorável, com o objetivo de avaliar o efeito citotóxico das 33 tiossemicarbazonas sintéticas. Das mais citotóxicas, foi realizada curvas concentração-resposta em 24, 48 e 72 horas com concentrações crescentes (5, 10, 25, 50 e 100 μM). Os três compostos que demonstraram maior redução na viabilidade celular da célula K562 foram selecionados para a determinação das curvas concentração e tempo-resposta para a outra linhagem celular, a Jurkat. Para isso, as células foram incubadas com as tiossemicarbazonas selecionadas (LAP3, LAP17 e LAP19) em concentrações crescentes (5, 10, 25, 50 e 100 μM), em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂. Após 24, 48 e 72 horas de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo método do brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio (MTT), adquirido da Sigma-Aldrich®, EUA, a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro a 540nm. A CI₅₀ foi obtida a partir de uma curva concentração-resposta em 24, 48 e 72 h, utilizando o *software* GraphPad Prism 5.

4.4 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEADAS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

As amostras de SP foram coletadas de cinco indivíduos saudáveis e não fumantes que assinaram o TCLE presente no projeto de pesquisa aprovado pelo CEPESH – UFSC sob parecer n° 746.486/2014. Na coleta foi utilizado anticoagulante etilenodiamino tetra-acético (EDTA) por punção venosa e as amostras foram processadas em até 30 minutos após a coleta. Para a obtenção das células mononucleadas, as amostras sanguíneas foram diluídas em tampão fosfato (PBS) em uma proporção de 1 ml de amostra para 0,5ml de PBS.

Após a diluição cada amostra foi colocada sobre 4 ml de Ficcol-Hypaque (densidade 1,077 g/m³ Sigma-Aldrich, EUA) e centrifugada a 300 x g por 30 minutos. A interfase contendo as células mononucleadas foi transferida para um cubo cônico de 15 ml, depois foram ressuspensas em 10 ml de tampão PBS e centrifugadas. Ao fim da última lavagem, as células foram ressuspensas em 1ml de meio RPMI 1640, e o número de células viáveis foi avaliado pelo método do Azul de Trypan (0,5%). A cada poço da placa de cultura celular foram adicionadas 5,0 x10⁴

células/poço Em seguida as células foram incubadas com a CI_{50} da tiossemicarbazona LAP17. Após 24 horas de incubação a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Os resultados foram comparados com Taxol que é um quimioterápico utilizado na clínica.

4.5 TESTE DE HEMÓLISE

Este teste foi utilizado para avaliar se a tiossemicarbazona LAP17 era capaz de induzir ruptura na membrana dos eritrócitos e, consequentemente hemólise e extravasamento do conteúdo celular.

No ensaio foi utilizado amostras de SP de quatro indivíduos saudáveis, não fumantes e voluntários, coletadas por punção venosa em tubo com anticoagulante, citrato de sódio e processadas em até 3 horas. Todos os indivíduos assinaram o TCLE presente no projeto de pesquisa aprovado pelo CEPESH – UFSC sob parecer n° 746.486/2014.

Isolou-se os eritrócitos do restante do conteúdo sanguíneo (plasma e leucócitos) por centrifugação, os quais foram lavados com salina (cloreto de sódio 0,9%) e descartou-se o sobrenadante. Diluiu-se o sedimento de eritrócitos com a finalidade de obter a dispersão estoque com um valor de absorbância entre 1,8 e 2,2 lida em um espectrofotômetro a 540 nm. A partir da dispersão do estoque de eritrócitos foi montado o ensaio: controle negativo ou 0% de hemólise (50 µl de dispersão de eritrócitos adicionando 950 µl de salina), controle positivo ou 100% de lise celular (50 µl de dispersão de eritrócitos adicionando 950 µl de água destilada) e as amostras testes (50 µl de dispersão de eritrócitos com 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 a 540 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. A taxa de hemólise foi calculada 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 1 - 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: A Autora

4.6 VIABILIDADE CELULAR (MÉTODO DO MTT)

O efeito citotóxico das tiossemicarbazonas sobre viabilidade das células de linhagem K562 e Jurkat e sobre as células mononucleares de sangue periférico de indivíduos saudáveis foi avaliado pelo ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio (MTT), o qual consiste em um ensaio colorimétrico baseado na redução do MTT ao seu derivado formazan de cor roxa, pelo metabolismo mitocondrial (MOSMANN., 1983). Sendo assim o ensaio funciona como um indicador de função mitocondrial, logo também da viabilidade celular.

Após o período de incubação de cada experimento, removeu-se o sobrenadante e foi adicionado novo meio de cultura contendo 10% (v/v) de solução de MTT (5mg/ ml em PBS) (Sigma - Aldrich ®, EUA) as células foram novamente incubadas por um período de 3h à 37 °C. Após 3 horas de incubação a 37 °C as placas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Os precipitados formados em cada poço foram dissolvidos em 100 µL de solução de álcool isopropílico/ HCl 0,04N e as placas foram novamente centrifugadas para a remoção dos restos celulares. O sobrenadante foi transferido para outra placa onde foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro Microwell Systems (*Organom Teknika Belgium*) no comprimento de onda de 540 nm. A densidade óptica do grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como 100% de células viáveis. A concentração inibitória 50% (CI₅₀) foi obtida a partir das curvas concentração e tempo - resposta, utilizando o software GraphPad Prism 5, somente para os compostos mais citotóxicos na triagem inicial em células K562.

4.7 IDENTIFICAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR

A tiossemicarbazona LAP17 apresentou uma maior citotoxicidade e uma menor CI₅₀, assim foi o composto escolhido para realizar a identificação do tipo de morte celular pelos seguintes métodos: investigação da morfologia celular por coloração com brometo de etídio e laranja de acridina (BE/LA) em microscopia de fluorescência, ensaio de fragmentação de DNA por eletroforese em gel de agarose e a avaliação dos resíduos de fosfatidiserina pelo método de Anexina V ligado a FITC por citometria de fluxo.

4.7.1 Avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência com brometo de etídio e laranja de acridina

Com a finalidade de avaliar a morfologia das células apoptóticas por microscopia de fluorescência foram utilizados os corantes fluorescentes laranja de acridina e brometo de etídio. Este ensaio é baseado na diferença de permeabilidade da membrana plasmática das células aos corantes BE/LA. O LA é um corante permeável à membrana citoplasmática intacta que interage com o DNA emitindo fluorescência verde às células quando observadas em microscópio de fluorescência. Já o BE é permeável a membrana somente quando a integridade da mesma está alterada, conferindo fluorescência laranja ao núcleo das células ao se intercalar com o DNA. Desta forma é possível diferenciar células viáveis, células em apoptose inicial ou tardia e células necróticas pela observação do aspecto morfológico do núcleo e pela condensação da cromatina. 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, já as células necróticas apresentam fluorescência laranja uniforme (RENVOIZE et al., 1998; KOSMIDER et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2004).

Para os ensaios, as células K562 e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/poço) foram tratadas com a tiossemicarbazona LAP17 na CI_{50} de 24 h. Após 12 horas de incubação, as células foram lavadas com PBS e o sedimento celular foi ressuspendido em uma solução constituída de brometo de etídio ($5 \mu\text{g/ml}$) e laranja de acridina ($10 \mu\text{g/ml}$) na proporção 1:1. Em seguida, $25 \mu\text{L}$ da suspensão celular foi transferida para uma lâmina de vidro e recoberta com lamínula, e as células foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-FLA), utilizando uma objetiva 40x. Os campos representativos foram fotografados com câmera fotográfica (Olympus BX 40, Japão).

4.7.2 Avaliação da apoptose pelo método de fragmentação do DNA

Neste ensaio as células K562 e Jurkat foram plaqueadas na concentração de $6,0 \times 10^6$ células por poço e tratadas com a tiossemicarbazona LAP17 em seguida incubadas durante 24 horas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO_2 . Após esse período, as células foram

lavadas duas vezes com tampão PBS e a extração do DNA foi realizada segundo as instruções do fabricante do kit (QIAGEN®). Após a centrifugação de 10.000 x g/ 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para um microtubo livre de RNase e DNase e o DNA das amostras foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (1 µg/mL). Por fim, foram visualizados e fotografados sob iluminação ultravioleta UV de foto documentação de géis (DOC-PRINT® Biosystems).

4.7.3 Avaliação da apoptose pelo método de anexina V – FITC

Para confirmação da morte das células K562 e Jurkat por apoptose foi avaliada a expressão dos resíduos de fosfatidiserina. Este ensaio é baseado na ligação da anexina V à proteína de membrana fosfatidiserina. A anexina V liga-se especificamente aos resíduos de fosfatidiserina e quando conjugada ao fluorocromo FITC, permite identificar e quantificar as células que expõem esses resíduos por citometria de fluxo (ENGELAND et al., 1998).

As células K562 e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/poço) foram tratadas com a tiossemicarbazona LAP17 na sua CI_{50} de 24 horas e incubadas por 12 horas. Em seguida foram lavadas com PBS e adicionou-se ao sobrenadante 100 µl de tampão de Anexina V na diluição 1:10 e 5 µl de anexina V-FITC conforme recomendação do fabricante. Como controle negativo foram utilizadas células sem tratamento para definição de uma quantificação basal de marcação com anexina V, também foi utilizado um tubo controle com o veículo de dissolução DMSO. O citômetro de fluxo utilizado para as análises foi o BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson®) e os resultados foram analisados no *software Infinicyt* (Cytognos®) versão 1.7. Adquiriu-se 10.000 eventos e retirou-se os dupletes com *Forward Scatter* (FSC) High e FSC área das células.

4.8 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

Para avaliar os efeitos da tiossemicarbazona LAP17 sobre as fases do ciclo celular das células K562 e Jurkat foi utilizado o PI/RNASE *solution kit* (Immunostep®), seu princípio consiste na coloração dos ácidos nucleicos pelo iodeto de propídio (PI) após a digestão do RNA. Dependendo da fase do ciclo celular, o PI emite diferentes intensidades de fluorescência, que são captadas pelos detectores fotomultiplicadores do citômetro de fluxo por variações no conteúdo do DNA celular,

quantificando assim a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular (POZAROWSKI; DARZYNKIEWICZ, 2004).

As células K562 e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/poço) foram tratadas com a tiossemicarbazona LAP17 nas suas CI_{50} de 24 horas e incubadas durante 12 horas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO_2 . Passado o período de incubação lavou-se as células duas vezes com PBS. A marcação celular foi realizada conforme recomendação do fabricante do kit. Fixou-se as células com etanol 70% e em seguida foram incubadas durante 30 minutos a uma temperatura de -4°C . Logo após lavou-se as células duas vezes com PBS contendo 2% de albumina bovina e centrifugadas a $200 \times g$ durante dez minutos. Ao final foi adicionado ao sedimento celular a solução de PI contendo RNase. A suspensão foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente antes de ser adquirida no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson®) e em seguida foram analisadas no *software Infinicyt* (Cytognos®) versão 1.7. Foram adquiridos 20.000 eventos com gate no canal PE (510 -595 nm). Como controle negativo foi utilizado células sem tratamento para caracterização dos parâmetros analisado no citômetro de fluxo e também foi utilizado um tubo controle com o veículo de dissolução DMSO.

4.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL

Para avaliar os efeitos da tiossemicarbazona LAP17 sobre o potencial mitocondrial das células K562 e Jurkat foi utilizado o *kit Mito View 633* (Biotium®). De acordo com o fabricante este kit é composto por um corante mitocondrial fluorescente que emite luz no comprimento de onda correspondente à cor vermelha (648nm). Ao colocar este corante em contato com a solução de células este se difunde através da membrana plasmática e se acumula na mitocôndria em concentrações nanomolares. As mitocôndrias com potencial fisiológico intacto são coradas com o Mito View 633 e fluorescem devido ao acúmulo do corante no ambiente lipídico das mitocôndrias. Quando algum fator externo causa a diminuição do potencial mitocondrial as mitocôndrias perdem essa fluorescência.

As células K562 e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/poço) foram tratadas com a tiossemicarbazona LAP17 nas suas CI_{50} de 24 horas e incubadas durante 12 horas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO_2 . Passado o período de incubação foram lavadas com PBS e centrifugadas a $200 \times g$ durante dez minutos, foi descartado o sobrenadante. Sobre o sedimento celular adicionou-se a solução de Mito View 633 diluído em 1:10.000 de acordo com as instruções do fabricante. Após a adição do corante,

incubou-se as células por 30 minutos a temperatura ambiente (20 a 25° C) e ao abrigo da luz. Ao final da incubação 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 (Becton Dickinson®) e em seguida foram analisadas no *software Infinicyt* (Cytognos®) versão 1.7. Cada experimento foi adquirido em 10.000 eventos e os dupletes foram retirados utilizando-se as características de FSC *High* e *Side Scatter* (SSC) área das células. Como controle negativo foram utilizadas células sem tratamento para caracterização dos parâmetros analisado no citômetro de fluxo, também foi utilizado um tubo controle com o veículo de dissolução DMSO.

4.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BAX, BCL-2, FASR, AIF E CASPASE 3 POR CITOMETRIA DE FLUXO

As células K65 e Jurkat (1×10^6 células/poço) foram tratadas com a tiossemicarbazona LAP17 nas suas CI_{50} de 24 horas e incubadas durante 12 horas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Passado o período de incubação, as células foram lavadas com PBS e submetidas à centrifugação a 200 x g durante dez minutos, e foi adicionado ao sedimento celular 200 µl do reagente BD *Fix/Perm* para permeabilização das células (exceto FasR). Após 20 minutos de incubação a 8°C, foi submetido as amostras a novas centrifugações, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento celular com 100 µl de tampão de lavagem *Fix/Perm*. Em seguida foi adicionado 5 µl do anticorpo monoclonal anti-Bcl-2 conjugado ao FITC da *Dako – Agilent Technologies*, 5 µl do anticorpo monoclonal Caspase- 3 da *Santa Cruz Biotechnology* conjugado ao FITC, 5 µl do anticorpo monoclonal anti-BAX conjugado ao PerCP, 5µ do anticorpo monoclonal anti-FasR conjugado ao PE, e 5 µl do anticorpo AIF ambos conjugados ao FITC e todos os três da *Santa Cruz Biotechnology*. Ao fim as células foram lavadas e suspensas em PBS para aquisição no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson®) e em seguida foram analisadas no *software Infinicyt* (Cytognos®) versão 1.7. Cada experimento foi adquirido em 10.000 eventos e os dubletes foram retirados utilizando-se as características de FSC *High* e SSC área das células. Como controle negativo foi utilizado células sem tratamento para caracterização dos parâmetros analisado no citômetro de fluxo, também foi utilizado um tubo controle com o veículo de dissolução DMSO.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados encontrados foram apresentados por média \pm erro padrão da média (EPM). Cada experimento foi realizado no mínimo em triplicata. Para avaliação da citotoxicidade em células de leucemias agudas foi utilizado a análise de variância de uma via (ANOVA *one way*) e de duas vias (ANOVA *two way*) seguidas de Bonferroni. A análise da viabilidade celular em células mononucleadas, a avaliação da exposição da fosfatidilserina, a alteração do potencial mitocondrial, a avaliação da expressão de proteínas envolvidas na apoptose e ciclo celular foram realizadas através do teste t-Student comparado cada ponto com o grupo controle. Em todas as análises foi adotado um nível de significância mínimo de 5% ($p < 0,05$). A realização do tratamento estatístico foi utilizado o software GraphPad Prism 5.

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 DAS TIOSSEMICARBAZONAS DAS SÉRIES LS E LAP SOBRE CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562

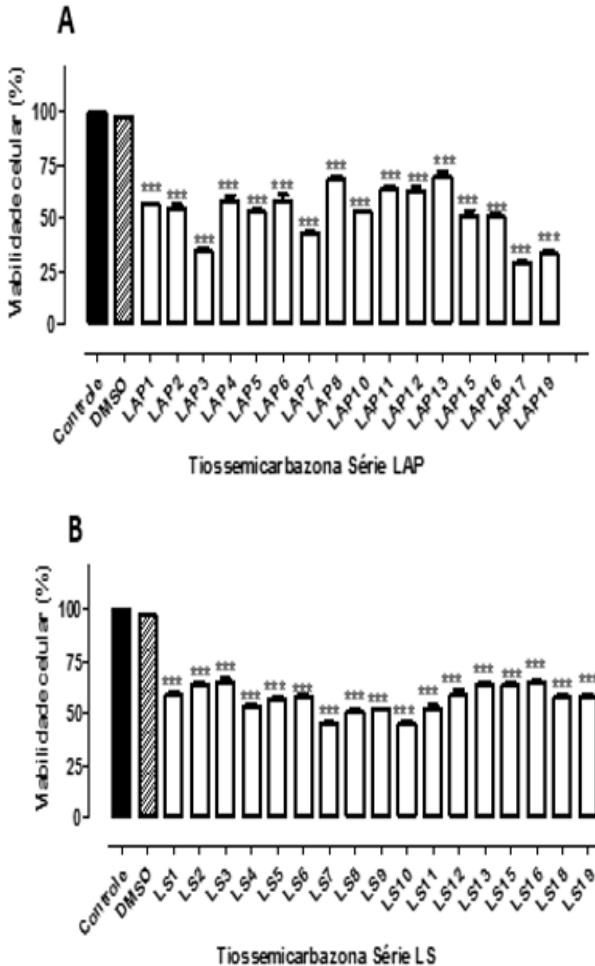
Com o objetivo de selecionar a tiossemicarbazona com maior efeito citotóxico dentre as séries LAP e LS, inicialmente, foi realizado uma triagem com 33 tiossemicarbazonas sintéticas sobre as células K562. O efeito citotóxico foi avaliado pelo método do MTT, após 24 horas de incubação com os compostos na concentração de 100 μ M. A viabilidade celular obtida após a incubação com cada composto foi comparada com o grupo controle (células não tratadas).

Como pode ser observado na **Figura 10** os compostos da série LAP (painel A) apresentaram maior citotoxicidade para a célula K562 quando comparados com a série LS (painel B). Nessa figura também é possível observar que entre as tiossemicarbazonas aquelas que causaram maior citotoxicidade para as células K562 foram a LAP3, LAP17 e LAP19, com viabilidade celular de $34.15 \pm 2.1 \mu\text{M}$, $28.72 \pm 2.4 \mu\text{M}$ e $33.19 \pm 2.5 \mu\text{M}$, respectivamente. Como as tiossemicarbazonas sintéticas foram diluídas em DMSO 2%, o efeito citotóxico desse veículo também foi avaliado sobre as células K562, e, como pode ser observado na **Figura 10**, ele não causou redução significativa da viabilidade celular quando comparado ao controle.

Como as tiossemicarbazonas LAP3, LAP17 e LAP19 foram aquelas que apresentaram maior citotoxicidade, elas foram selecionadas para avaliação do efeito citotóxico sobre as células K562 e Jurkat em diferentes concentrações (5, 10, 25, 50 e 100 μ M) e tempos (24h, 48h e 72h). Como pode ser observado na **Figura 11**, as três tiossemicarbazonas causaram citotoxicidade para ambas as linhagens dependente da concentração e do tempo. Os valores de CI₅₀ foram calculados para os três compostos como demonstra a **Figura 10**. Dentre as três tiossemicarbazonas analisadas, a LAP 17 foi aquela que apresentou maior diminuição da viabilidade celular para as duas células estudadas (CI₅₀ de $34,66 \pm 1,5 \mu\text{M}$ e $25,27 \pm 1,4 \mu\text{M}$ no tempo de 24 horas para as células K562 e Jurkat, respectivamente). Sendo assim, a tiossemicarbazona

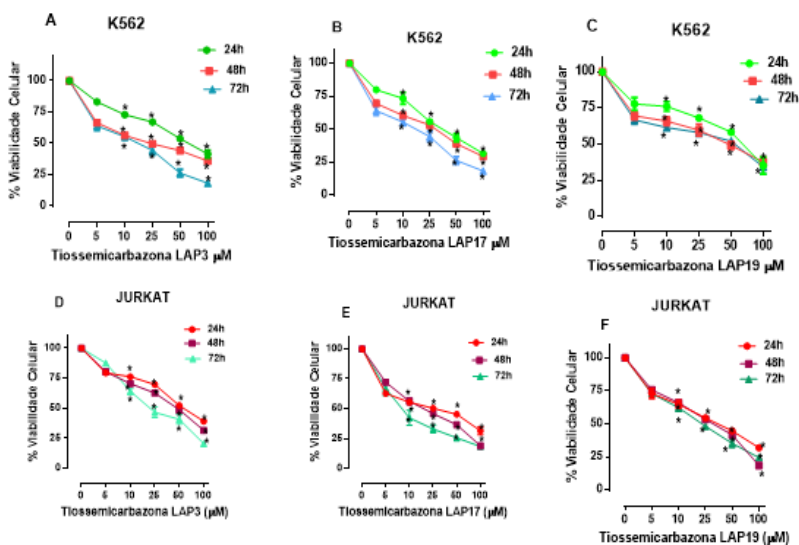
LAP17 foi a escolhida para dar continuidade aos ensaios na sequencia deste estudo.

Figura 10 - Avaliação da Citotoxicidade das séries LAP e LS nas células K562



As células K562 foram incubadas (1×10^5 células/poço) com as tiossemicarbazonas sintéticas: Série LAP (Painel A) Série LS (Painel B) na concentração de $100 \mu\text{M}$ por 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Os resultados expressam a média \pm EPM de experimentos realizados em triplicata. A diferença estatística em relação ao grupo controle $p \leq 0,05$. Teste ANOVA one-way seguido de teste post-hoc de Bonferroni.

Figura 11 - Curvas concentração e tempo resposta do efeito citotóxico das tiossemicarbazonas LAP3, LAP17 e LAP19 sobre as células K562 e Jurkat



As células K562 (Painel A, B e C) e Jurkat (Painel D, E, F) foram incubadas com os compostos LAP3, LAP17 e LAP 19 respectivamente (1×10^5 células/poço 24 horas, 5×10^4 células/poço 48 horas e $2,5 \times 10^4$ células/poço 72 horas). A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (células não tratadas) foi considerada 100%. Cada ponto do gráfico representa média \pm EPM de três experimentos independentes. * Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$, Anova two-way seguida de post-hoc de Bonferroni.

Tabela 1 - Valores de CI50 encontrados na linhagem K562 após a incubação com as Tiossemicarbazonas LAP3, LAP17 e LAP19

Tiossemicarbazona	24 horas	48 horas	72 horas
LAP3	53.56 \pm 1.04 μ M	26.40 \pm 1.4 μ M	14.88 \pm 1.1 μ M
LAP17	34.66 \pm 1.5 μ M	25.45 \pm 1.5 μ M	14.88 \pm 1.2 μ M
LAP19	54.74 \pm 1.6 μ M	39.31 \pm 1.7 μ M	36.38 \pm 1.2 μ M

Tabela 2 - Valores de CI50 encontrados na linhagem Jurkat após a incubação com as Tiossemicarbazonas LAP3, LAP17 e LAP19

Tiossemicarbazona	24 horas	48 horas	72 horas
LAP3	53.84±1,81 µM	40.05±1,40 µM	23.67±0,70 µM
LAP17	25.27±1,40 µM	18.60±1,10 µM	9.09±0,89 µM
LAP19	31.06±1,60 µM	25.82±1,15 µM	21.87±1,14 µM

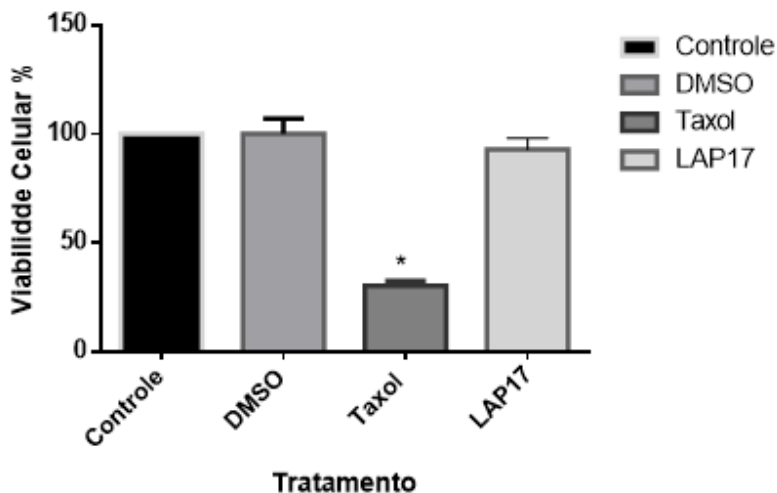
Os valores de CI50 foram obtidos a partir da regressão não linear das curvas concentração e tempo resposta e calculadas através do software GraphPad Prism 5.

5.2 EFEITO CITOTÓXICO DA TIOSSEMICARBAZONA LAP17 EM CÉLULAS MONONUCLEADAS DE INDIVÍDUOS CONSIDERADOS SAUDÁVEIS

Para que um novo composto seja promissor para o tratamento das leucemias agudas é importante que ele seja seletivo para as células tumorais e que não afetem as células normais. Esse aspecto é importante, pois a citotoxicidade provocada em células normais é a causa de vários efeitos adversos indesejados os pacientes (HOIJAT-FARSANGI, 2015; SURYADEVARA et al., 2015). Assim, com a finalidade de investigar o possível efeito citotóxico da tiossemicarbazona LAP17 sobre células normais, o composto foi incubado sobre células mononucleadas de indivíduos considerados saudáveis com a CI₅₀ de 24 horas observadas nas células de linhagem de LA humana.

Como podemos observar na **Figura 13**, a tiossemicarbazona LAP17 não provocou redução significativa da viabilidade das células mononucleadas (95,28 ± 3.5% de células vivas após 24 horas de tratamento). Como controle positivo foi utilizado o Taxol (10 µM), quimioterápico utilizado na prática clínica, o qual reduziu significativamente a viabilidade celular para 25,32 ± 4.6%. O veículo DMSO 2% apresentou viabilidade de 99,22 ± 3.5%, ou seja, não interfere na viabilidade das células.

Figura 12 - Efeito citotóxico da tiossemicarbazona LAP17 sobre células mononucleadas de indivíduos considerados saudáveis

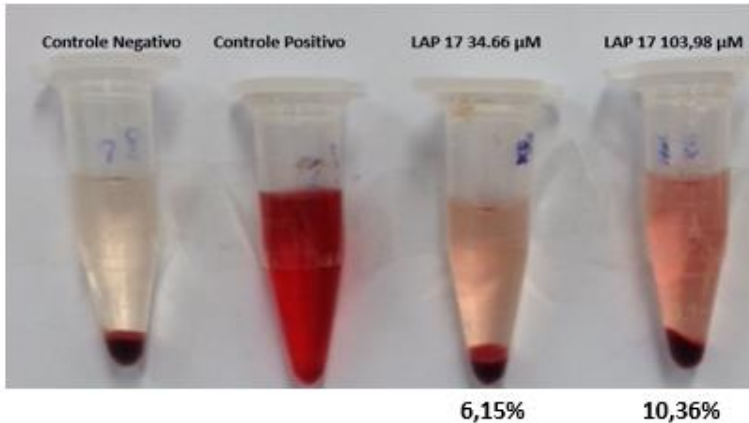


As células mononucleadas ($1,0 \times 10^4$ células/poço) foram incubadas com a tiossemicarbazona LAP17 na concentração de $34,66 \mu\text{M}$ por 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (células sem tratamento) foi definida como 100% de viabilidade celular. Foi utilizado como controle um grupo tratado como Taxol na concentração de $10 \mu\text{M}$ e um grupo tratado com DMSO na concentração utilizada para dissolver o composto. * Diferença significativa em relação ao grupo controle $p < 0,05$ teste t de Student.

5.3 EFEITO DA TIOSSEMICARBAZONA LAP17 SOBRE ERITRÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO

O teste de hemólise foi realizado para avaliar se o composto pode ser utilizado por uma via sistêmica, que é a via mais comumente usada em tratamento quimioterápico. Para isso, foi utilizado o sangue venoso de cinco indivíduos saudáveis para o preparo da solução de hemácias. Como pode ser observado na **Figura 13** a tiossemicarbazona LAP17 nas concentrações de IC_{50} e o triplo da IC_{50} em 24 horas não causou hemólise significativa ($p \leq 0,05$ Teste t Student) com uma taxa de hemólise de 6,15% ($1 \times \text{IC}_{50}$) e 10,36% ($3 \times \text{IC}_{50}$). Como controle negativo foi utilizado solução salina e para controle positivo foi utilizado água destilada.

Figura 13 - Efeito da Tiossemicarbazona LAP17 sobre Eritrócitos de Sangue Periférico



As amostras de sangue venoso foram coletadas em tubo contendo citrato de sódio e a solução de hemácias foi preparada conforme o protocolo experimental.

5.4 EFEITO DA TIOSSEMICARBAZONA LAP17 NA INDUÇÃO DE APOPTOSE DAS CÉLULAS LEUCÊMICAS K562 E JURKAT

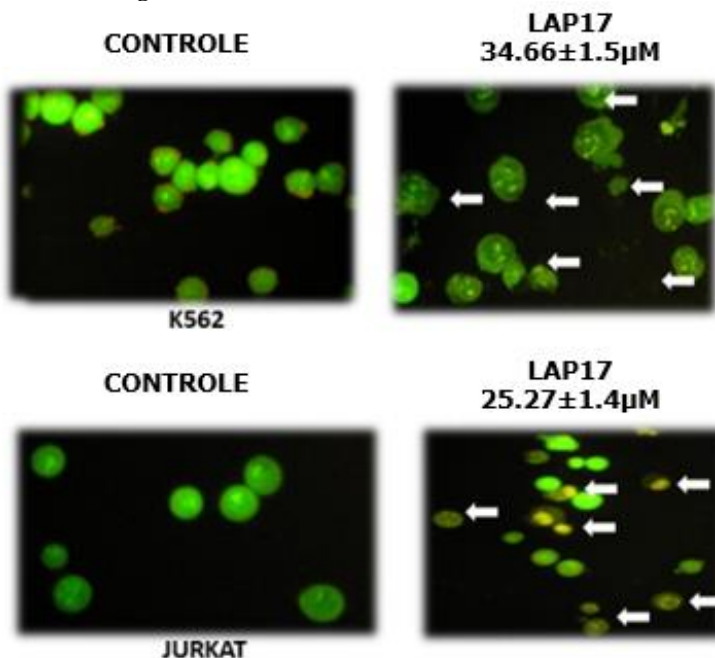
Após confirmar que a tiossemicarbazona LAP17 não é citotóxica para células mononucleares e nem apresenta alta taxa hemolítica, o próximo passo do estudo foi investigar o tipo de morte celular provocado pelo composto estudado até então.

A morte celular pode ocorrer por diversos mecanismos que envolvem diversas vias de sinalização (KAUFMAN et al., 2000; FULDA, 2015). Para avaliar se a tiossemicarbazona LAP17 causou morte celular por necrose ou apoptose, primeiramente foi analisado a morfologia das células por microscopia de fluorescência com brometo de etídio e laranja de acridina.

Como pode ser observado na **Figura 14**, após 12 horas de tratamento com a LAP17 na concentração da IC_{50} de 24 horas, as linhagens celulares Jurkat e K562 mostram um aumento do número de células com características morfológicas de células em apoptose quando comparado ao grupo controle (coloração verde uniforme). As células K562 após tratamento com LAP17 apresentaram características de apoptose inicial, membrana plasmática íntegra, condensação da cromatina e formação de blébs, já as células Jurkat após o tratamento mostraram características típicas de apoptose tardia com formação de corpos apoptóticos e perda de integridade da membrana.

A apoptose induzida pelo composto foi confirmada e quantificada pela externalização da fosfatidiserina, a qual foi detectada pelo método da anexina V conjugada a FITC. Como pode ser observado na **Figura 15**, LAP17 após 12 horas de incubação com as linhagens celulares de LA, nas suas respectivas IC_{50} de 24 horas), causou aumento significativo da expressão dos resíduos de fosfatidiserina na membrana das células, o que indica morte celular por apoptose.

Figura 14 - Efeito da Tiossemicarbazona LAP17 na indução de apoptose em células de linhagens LA humana

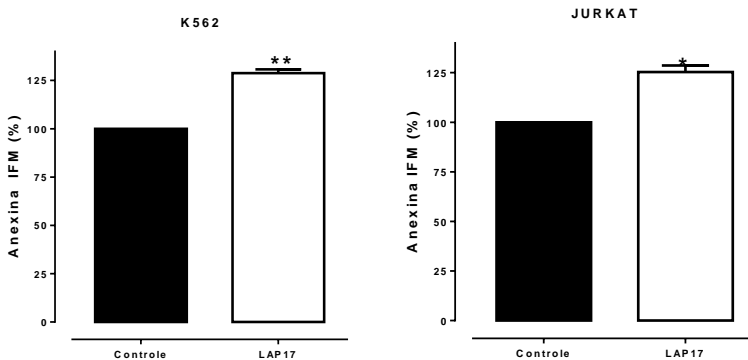


As células (1×10^6 células/poço) foram incubadas com a tiossemicarbazona LAP17 nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas por 12 horas e depois foram coradas com uma solução 1:1 de BE/LA. Os grupos controle são as células sem tratamento. As células foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX41) na magnitude de 40 x e campos representativos foram fotografados com câmera digital (Olympus BX40, Japão). Setas indicam células em apoptose. As imagens são representativas de pelo menos dois experimentos independentes.

Na **Figura 15** podemos observar que a LAP17 aumentou significativamente a exposição dos resíduos de fosfatidiserina nas células

de linhagem de LA, quando comparado ao grupo controle. Nas células K562, o composto induziu um aumento na exposição dos resíduos de fosfatidiserina de $28,78 \pm 1.9\%$ em relação ao grupo controle, enquanto que nas células Jurkat o aumento foi de $25,29 \pm 3.3\%$. Foram realizadas análises com o veículo de dissolução DMSO 2%, porém não apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo controle.

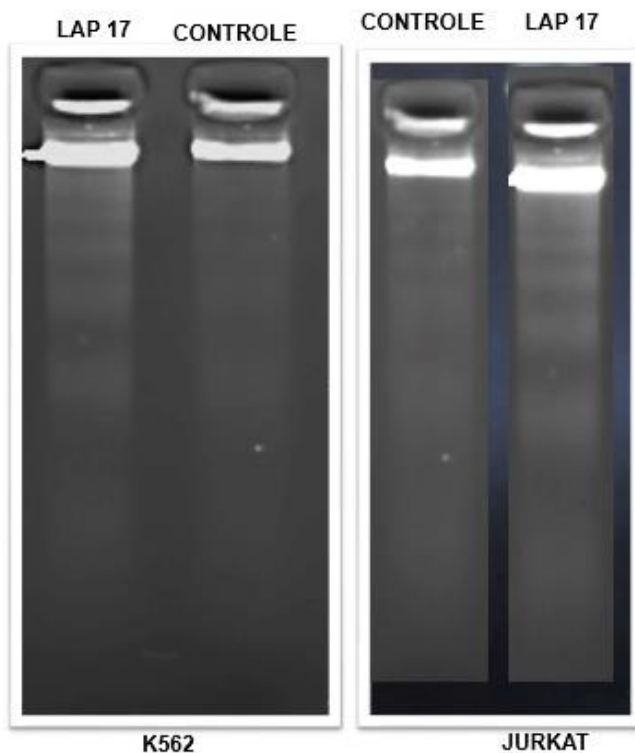
Figura 15 - Efeito da Tiossemicarbazona LAP17 sobre a exposição dos resíduos de fosfatidiserina das duas linhagens celulares pelo método da Anexina-V conjugada a FITC



As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço), foram incubadas por 12 horas com o composto LAP17 nas suas respectivas IC50 de 24 horas, como grupo controle foi utilizado células sem tratamento. A intensidade de fluorescência média foi determinada por citometria de fluxo após marcação com 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 TM 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.

A morte celular por apoptose foi confirmada com uma terceira metodologia, o ensaio de fragmentação do DNA. Como mostra a **Figura 16**, LAP17 causou o padrão de fragmentação “em escada”, característico de apoptose, o que foi diferente do controle (células sem tratamento).

Figura 16 - Avaliação da indução da fragmentação do DNA nas células Jurkat (painel A) e K562 (painel B)



As células (6×10^6 células/poço) foram incubadas com a tiossemicarbazona LAP17 nas suas respectivas IC_{50} por 24 horas. Os grupos controles caracterizam as células sem tratamento. Após a incubação, a extração do DNA foi realizada com solução de guanidina 5 M. O DNA das amostras foi separado por eletroforese em gel de agarose 2,5% e corados com brometo de etídio ($1 \mu\text{g/ml}$). Os géis foram visualizados e fotografados sob iluminação ultravioleta de foto documentação de géis (DOC-PRINT Byosistemas).

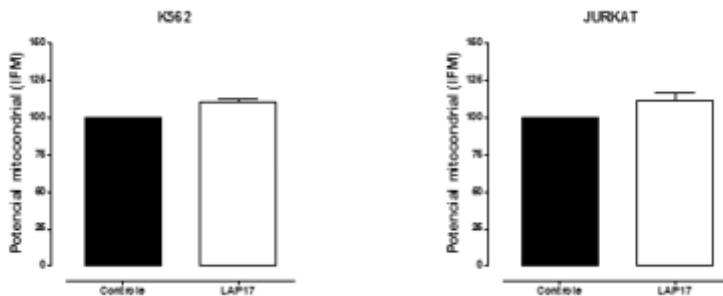
5.5 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA TIOSSEMICARBAZONA LAP17 SOBRE O POTENCIAL MITOCONDRIAL DAS CÉLULAS K562 E JURKAT

Para avaliar se a morte celular causada por LAP17 envolvia a via intrínseca da apoptose, foi analisado o envolvimento do potencial

mitocondrial das células K562 e Jurkat após 12 horas de tratamento com suas respectivas IC_{50} de 24 horas.

Como é possível observar na **Figura 17**, LAP 17 não causou alterações no potencial mitocondrial em nenhuma das duas linhagens estudadas.

Figura 17 - Efeito da tiossemicarbazona LAP17 sobre o potencial mitocondrial das células K562 e Jurkat



As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço), foram incubadas por 12 horas e tratadas com LAP17 nas suas respectivas IC_{50} de 24 horas. Como grupo controle foi utilizado células sem tratamento. A determinação do percentual de células com o potencial mitocondrial intacto foi determinada por citometria de fluxo após utilização do kit Mito View 633. Os resultados apresentam a média \pm EPM de pelo menos três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto TM 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.

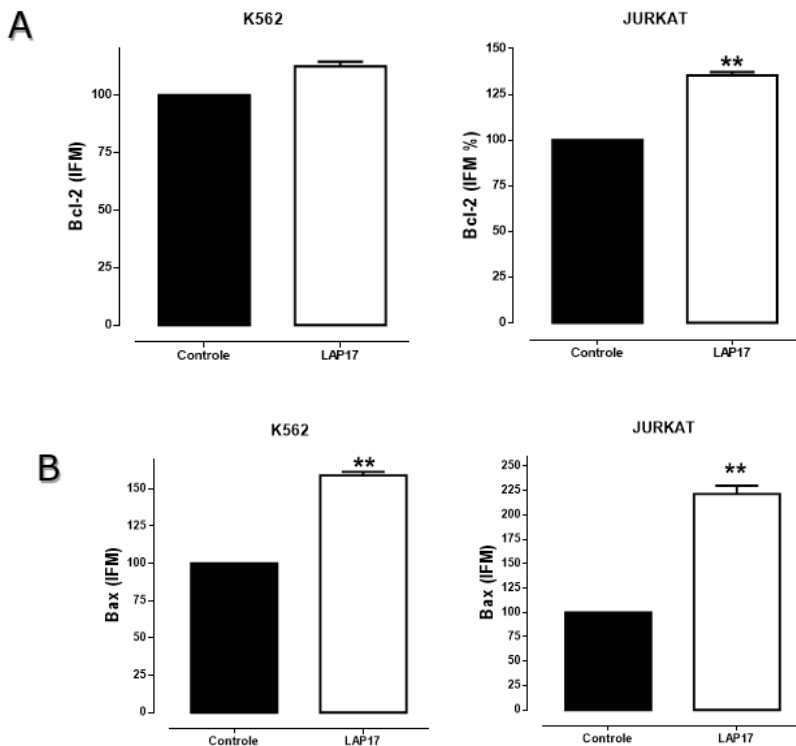
5.6 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA TIOSSEMICARBAZONA LAP17 SOBRE AS PROTEÍNAS ANTIAPOPTÓTICA BCL-2 E PRÓ-APOPTÓTICA BAX

Como é possível observar na **Figura 18**, (Painel A) a tiossemicarbazona LAP17 aumentou a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 nas células K562 e Jurkat após 12 horas de tratamento. Nessa Figura, também é possível observar que a expressão da proteína pró-apoptótica Bax está aumentada em ambas as linhagens ($58,96 \pm 2,5\%$ para a célula K562 e $121,5 \pm 5\%$ para a célula Jurkat em comparação com o controle), após 12 horas de tratamento (Painel B).

Ao analisar a razão entre a proteína antiapoptótica Bcl-2 e a proteína pró - apoptótica Bax (**Tabela 3**) pode-se observar o predomínio

da expressão da proteína Bax em relação à proteína Bcl-2 em ambas as linhagens estudadas (razão Bcl-2/Bax).

Figura 18 - Efeito da tiossemicarbazona LAP17 sobre a expressão das proteínas Bcl-2 e Bax nas células K562 e Jurkat



As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço), foram incubadas por 12 horas e tratadas com LAP17 nas suas respectivas IC₅₀ 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. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto TM 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.

Tabela 3 - Razão entre a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e da proteína pró - apoptótica Bax nas células de LA tratadas com a tiossemicarbazona LAP17

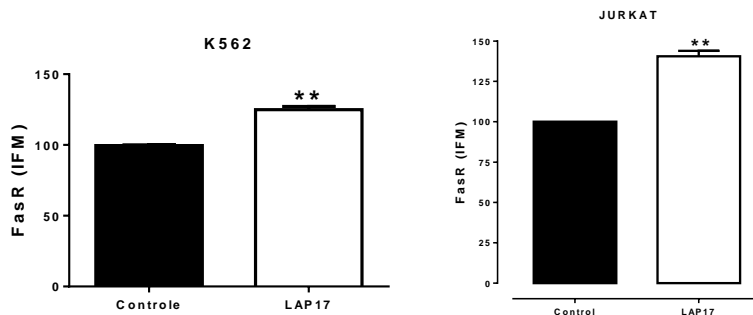
<i>Composto</i>	<i>Células</i>	<i>Bcl-2</i> (IFM)	<i>Bax</i> (IFM)	<i>Razão Bcl-2/Bax</i>
<i>LAP17</i>	K562	112.56%	158.96%	0,70%
	Jurkat	135.50%	221.50%	0,61%

IFM: Intensidade de Fluorescência Média

5.7 EFEITO DA TIOSSEMICARBAZONA LAP17 SOBRE O RECEPTOR FAZ

Como é possível observar na **Figura 19**, a tiossemicarbazona LAP17 aumentou a expressão de FasR nas células K562 e Jurkat após 12 horas de tratamento em $24,98 \pm 2.15\%$ e $40,54 \pm 3.37\%$ quando comparados com o controle.

Figura 19 - Efeito da Tiossemicarbazona LAP17 sobre a expressão da proteína FasR em células K562 e Jurkat

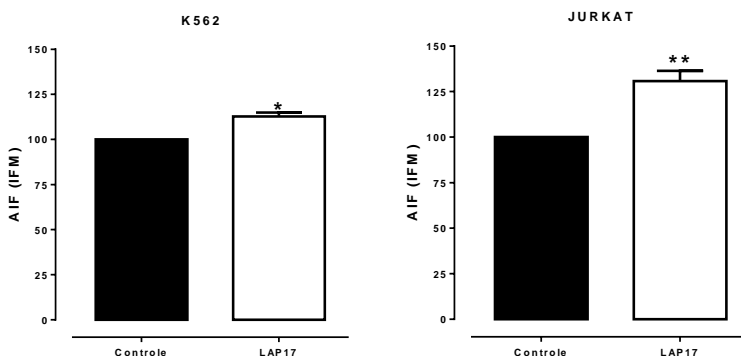


As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço), foram incubadas por 12 horas e tratadas com LAP17 nas suas respectivas IC50 de 24 horas. A determinação da intensidade de fluorescência média foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti - FasR. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos três experimentos independentes e os histogramas das células tratadas com o composto é uma figura representativa de três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto TM 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.

5.8 EFEITO DA TIOSSEMICARBAZONA LAP17 SOBRE O FATOR INDUTOR DE APOPTOSE (AIF)

Como é possível observar na Figura 20, LAP17 aumentou significativamente a expressão do AIF tanto em K562 como em Jurkat, com percentuais de aumento de 12% e 30% respectivamente em relação ao controle.

Figura 20 - Efeito da tiossemicarbazona LAP17 na expressão da proteína AIF em células K562 e Jurkat

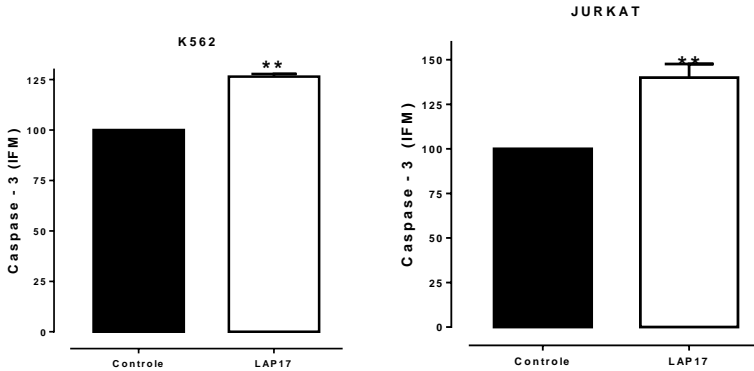


As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço), foram incubadas por 12 horas e tratadas com LAP17 nas suas respectivas IC₅₀ de 24 horas. A determinação da intensidade de fluorescência média foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti - AIF. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto TM 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

5.9 EFEITO DA TIOSSEMICARBAZONA LAP17 SOBRE A CASPASE-3

Como é possível observar na Figura 21, o tratamento com LAP17 aumentou significativamente a expressão de caspase-3 em 26% e 39,94% nas células K562 e Jurkat respectivamente quando comparado com o controle.

Figura 21 - Efeito da tiossemicarbazona LAP17 na expressão da proteína caspase-3 em células K562 e Jurkat



As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço), foram incubadas por 12 horas e tratadas com LAP17 nas suas respectivas IC_{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 TM 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.

5.10 EFEITO DA TIOSSEMICARBAZONA LAP17 SOBRE AS FASES DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS K562 E JURKAT

O efeito da Tiossemicarbazona LAP17 na progressão do ciclo celular das células K562 e Jurkat foi avaliado após 12 horas de incubação nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas. Em comparação com o grupo controle ambas as linhagens apresentaram um aumento significativo na proporção de células na fase sub G0/G1, o que sugere um aumento da morte celular sugestivo de apoptose. LAP17 causou bloqueio do ciclo celular na fase G2/M nas células K562 e Jurkat como é possível observar na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Efeito da Tiossemicarbazona LAP17 (CI50) nas fases do ciclo celular das células K562 e Jurkat

Célula		GO/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	Sub GO/G1(%) Apoptose (%)
K562	Controle	49.02 ± 1.09	20.99 ± 0.39	29.99 ± 0.71	18.47 ± 1.35
	LAP17	36.48 ± 3.4*	10.43 ± 1.18	53.12 ± 2.24*	32.48 ± 1.8*
Jurkat	Controle	61.23 ± 3.57	17.01 ± 2.61	21.75 ± 0.96	18.79 ± 1.17
	LAP17	33.34 ± 0.18*	10.29 ± 1.31	56.31 ± 1.54*	62.13 ± 5.87*

* Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$, ANOVA one-way seguida de teste post hoc de Bonferroni.

5.11 SUMÁRIO DE RESULTADOS

Para compreensão geral deste estudo, a **Tabela 5** apresenta um sumário dos resultados obtidos.

Tabela 5 - Sumário de Resultados obtidos com a Tiossemicarbazona LAP17

Linhagem Celular	K562	JURKAT
CI50 (μ M) 24 horas	34.66	25.27
Externalização dos resíduos de fosfatidiserina	↑ 28,78%	↑ 25,29%
Morfologia Celular em BE/LA	Apoptose Inicial	Apoptose Tardia
Fragmentação de DNA	SIM	SIM
Potencial Mitocodrial	Não interfere no potencial mitocondrial	Não interfere no potencial mitocondrial
Expressão de Bcl-2	↑ 12,56%	↑ 35,50%
Expressão de Bax	↑ 58,96%	↑ 121,5%
Expressão de FasR	↑ 24.98%	↑ 40,54%
Expressão de AIF	↑ 12.77%	↑ 30,74%
Expressão de Caspase - 3	↑ 26.47%	↑ 39.94%
Bloqueio do Ciclo Celular	Fase G2/M	Fase G2/M

6 DISCUSSÃO

De acordo com a OMS o câncer é uma das principais causas de morte no mundo. No Brasil o número de mortes aumentou 31% desde o ano 2000, e chegou a 223,4 mil pessoas por ano no final de 2015 (INCA, 2015). O câncer se tornou um grande problema de saúde pública em todo o mundo, devido a sua incidência e prevalência o que mostra a necessidade de medidas para a prevenção da doença, bem como a busca de novas alternativas de tratamento (SIQUEIRA et al., 2007; SIEGEL., et al, 2017).

Conforme já citado anteriormente, dentre os novos casos de câncer previstos para 2017, se encontram as leucemias cuja incidência também vem aumentando a cada ano (INCA 2015). A forma de terapia antileucêmica mais utilizada ainda é a quimioterapia, porém está associada a altas taxas de morbidade, mortalidade e recidiva. Apesar dos grandes avanços no desenvolvimento de novos quimioterápicos, na estratificação de riscos e prognóstico, a eficácia da resposta ao tratamento das leucemias agudas ainda é limitada, e mostra poucos avanços em opções de novos fármacos (KRUG et al., 2011; PETERS et al, 2015; KAVANAGH et al., 2017). Nesse contexto, a busca por novos fármacos com maior seletividade é necessária para minimizar os efeitos dos quimioterápicos.

Assim a indústria farmacêutica tem focado na investigação de novos compostos naturais e sintéticos bioativos como modelos para produtos a serem utilizados no desenvolvimento de quimioterápicos mais seletivos (NEWMAN et al., 2012).

Dentre os compostos sintéticos se encontram as tiossemicarbazonas, relatadas na literatura com várias propriedades farmacológicas descritas, entre elas a atividade antitumoral (LEHMKE et al., 1977; FEUN et al., 2002; SERDA et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2015). Com a finalidade de conhecer melhor as propriedades quimioterápicas dessa classe de compostos, este trabalho buscou estudar o efeito citotóxico de tiossemicarbazonas sintéticas, bem como investigar os mecanismos envolvidos na indução de morte celular.

Inicialmente, foi avaliado a citotoxicidade de 33 tiossemicarbazonas em células K562. A linhagem K562 foi selecionada para a realização da primeira triagem, pois é um modelo celular resistente. Foi originalmente obtida a partir da amostra de um paciente com LMA secundária a LMC (LMC em crise blástica) (RUMJANEK, 2001), cujo prognóstico é bastante desfavorável, pois está associada a uma grande resistência ao tratamento (MATTE-MARTONE et al., 2015). Dessas, 21

apresentaram efeito citotóxico significativo (**Figura 10**). Entre as séries avaliadas a LAP apresentou efeito citotóxico maior, e, das 16 tiossemicarbazonas da série LAP analisadas, aquelas que apresentaram maior redução na viabilidade celular foram a LAP3, LAP17 e LAP19 com redução da viabilidade celular de $34,15 \pm 2.1\%$, $28,72 \pm 2.4\%$ e $33,19 \pm 2.5\%$, respectivamente, quando comparadas ao controle (100% de células viáveis).

Essas diferenças podem ser observadas dentro de uma mesma classe de compostos devido às diferenças químicas dos radicais ligados a molécula estrutural. DE OLIVEIRA (2015) e colaboradores mostraram que a presença de um grupo alquil ligado no anel aromático pode aumentar o efeito citotóxico das células leucêmicas, o que vai ao encontro dos resultados observados com a tiossemicarbazona LAP17, que foi o composto que apresentou maior citotoxicidade para a célula K562 e apresenta um grupo alquil ligado ao anel.

Por apresentarem maior efeito citotóxico para a célula K562, as tiossemicarbazonas LAP3, LAP17 e LAP19 foram escolhidas para análise do efeito citotóxico em diferentes concentrações e tempos de incubação e calcular a CI_{50} sobre as células leucêmicas K562 e Jurkat. Como mostra a **Figura 11** as tiossemicarbazonas selecionadas reduziram a viabilidade celular das duas linhagens de forma dependente da concentração e do tempo de incubação quando comparadas com o grupo controle (células sem tratamento). Dentre as tiossemicarbazonas analisadas LAP17 apresentou maior citotoxicidade (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) com CI_{50} de $34,66 \pm 1.04\mu\text{M}$ para a célula K562 e $25,27 \pm 1.40\mu\text{M}$ para célula jurkat com incubação de 24 horas. COS e colaboradores (2002) afirmaram que compostos com CI_{50} acima de $50\mu\text{M}$ podem ser citotóxicos também para células normais, o que aumenta a probabilidade de causar efeitos adversos ao paciente. Por isso, a tiossemicarbazona LAP17 foi o escolhida para dar continuidade aos experimentos.

O efeito citotóxico das tiossemicarbazonas também já foi alvo de outros estudos, CABRERA e colaboradores (2015) encontraram um valor bem menor de CI_{50} para a célula Jurkat, de $4,2\mu\text{M}$, porém o tempo de incubação da célula foi de 48 horas (5×10^4 células/poço). FERRAZ e colaboradores (2009) observaram um valor de $1,5\mu\text{M}$ de CI_{50} para a célula Jurkat, porém nesse estudo além do tempo de incubação ser de 48 horas foi utilizado apenas $2,5 \times 10^4$ células/poço.

DE OLIVEIRA e colaboradores (2015) encontraram valores significativos de CI_{50} na célula K562 ao analisar uma série de dez

tiossemicarbazonas, cujos valores foram de 0,9 μ M a 1,6 μ M, com um tempo de incubação de 48 horas (5x10⁴ células/poço).

Apesar de alguns trabalhos na literatura relatarem valores de CI₅₀ mais baixos, as condições experimentais não são as mesmas, em alguns deles o tempo de incubação das células com os compostos foi maior, em outros o número de células era inferior ao utilizado neste trabalho. Sabe-se que quanto maior o tempo de incubação dos compostos com as células, maior é eficiência em induzir a morte celular. Nesse sentido, a tiossemicarbazona LAP17 com a CI₅₀ de 72 horas, principalmente com as células Jurkat, pode ser comparada aos outros estudos citados na literatura.

Os valores de CI₅₀ mais elevados na célula K562 podem ser justificados por se tratar de uma linhagem de LMA secundária a uma LMC, como citado anteriormente, e, esse subtipo de leucemia é de mau prognóstico e menos responsiva ao tratamento que as demais leucemias agudas (LARSON, 2007; SEKERES et al., 2009).

Para que um novo composto seja promissor para o desenvolvimento de quimioterápicos para o tratamento de LA é importante que apresente citotoxicidade seletiva para as células tumorais e que não afete as células normais. Esse aspecto é importante, pois a citotoxicidade causada em células normais é responsável pelos efeitos adversos indesejados aos pacientes (HOIJAT-FARSANGI, 2015; SURYADEVARA et al., 2015). Como mostra a **Figura 12**, LAP17 não causou morte celular significativa nas células mononucleadas oriundas de indivíduos considerados saudáveis, o que não foi observado com Taxol (10 μ M), que é um quimioterápico utilizado na clínica, e, que apresenta valores de CI₅₀ menores. Porém, são necessários mais experimentos *in vitro* e *in vivo* para afirmar a especificidade da tiossemicarbazona LAP17.

Numa outra etapa do trabalho, foi avaliado o efeito de LAP17 sobre os eritrócitos saudáveis, para verificar se a administração do composto via endovenosa não causaria hemólise dos eritrócitos, pois a maioria dos quimioterápicos são administrados por via sistêmica (MOCAN, 2010). Como mostra a **Figura 13**, LAP17 não causou hemólise significativa, mesmo na concentração de três vezes a sua CI₅₀ de 24 horas, porém para afirmar que o composto não causa a hemólise de forma sistêmica serão necessários experimentos *in vivo*.

O sucesso de um quimioterápico depende da sua capacidade de induzir apoptose em células tumorais onde a ativação das vias apoptóticas é inevitável. A ativação de vias que resultem em apoptose é o tipo de morte celular mais interessante, pois a apoptose é um processo que

apresenta baixa capacidade imunogênica, o que evita a reação inflamatória que acontece na necrose (KOFF et al., 2015).

Nesse contexto, o próximo passo do estudo foi avaliar o tipo de morte celular induzido pela tiossemicarbazona LAP17, para isso foram utilizadas três metodologias: coloração com LA e BE, marcação com anexina-V e fragmentação do DNA.

Inicialmente foi analisada a morfologia das células por microscopia de fluorescência após coloração com brometo de etídio e laranja de acridina. Como demonstrado na **Figura 14**, após 12 horas de incubação das células com LAP17, foi observado que as células K562 apresentavam características de apoptose inicial, como membrana plasmática íntegra, condensação da cromatina e formação de *blebs*. Nas células Jurkat foi observado características típicas de apoptose tardia, com formação de corpos apoptóticos e perda de integridade da membrana. É possível constatar que as células Jurkat apresentaram menos células viáveis após o tratamento do que as células K562 o que sugere que as células Jurkat apresentam uma maior sensibilidade ao composto LAP17 do que as K562.

A externalização de fosfatidilserina acontece durante a apoptose, e, dessa forma, promove a perda de assimetria na composição dos fosfolípidos, e assim são identificados a superfície das células apoptóticas para serem fagocitadas por células vizinhas, em geral os macrófagos. Detectar esses fosfolípidos permite identificar um dos eventos iniciais do processo apoptótico (ELMORE, 2007; RYSAVY et al., 2014). Como demonstra a **Figura 15**, as observações da morfologia foram confirmadas com a marcação dos resíduos de fosfatidilserina pela Anexina-V, onde a LAP17 aumentou significativamente a exposição dos resíduos de fosfatidilserina nas células de linhagem de LA, quando comparado ao grupo controle.

Finalmente, a apoptose causada nas células de linhagens de LA pela tiossemicarbazona LAP17 foi avaliada pela visualização da fragmentação do DNA, que é a última etapa da apoptose. Como pode ser observado na **Figura 16**, após 12 horas de tratamento com o composto, o DNA das células K562 e Jurkat apresentaram o “padrão em escada” para as células, o qual é característico de apoptose.

As três metodologias mostraram que a tiossemicarbazona LAP17 induz apoptose nas células K562 e Jurkat, o que corrobora os dados de alguns trabalhos encontrados na literatura sobre essa classe de compostos (FERRAZ et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2015; CABRERA et al., 2015).

A ativação da via intrínseca tem seu início na mitocôndria e os estímulos que levam a sua ativação levam a perda do potencial transmembrânico mitocondrial, o que leva a liberação de proteínas pró-apoptóticas da mitocôndria para o citoplasma das células (ELMORE, 2007; FULDA, 2015).

A alteração da permeabilidade do potencial mitocondrial é o evento central da apoptose pela via intrínseca, e são regulados pelos membros da família Bcl-2 presentes na mitocôndria (ROLLAND et al., 2010; PIHÁN et al., 2017). Neste trabalho foi avaliado se a apoptose induzida pela tiossemicarbazona LAP17 envolvia a via intrínseca. Para isso foi avaliado o efeito da LAP17 sobre o potencial mitocondrial e sobre a expressão das proteínas Bcl-2 e Bax nas células K562 e Jurkat.

Como é possível observar na **Figura 17**, que o LAP17 não causa nenhuma alteração no potencial mitocondrial das células de LA, após 12 horas de incubação. Porém, pode ser necessário um tempo acima de 12 horas de incubação para visualizar alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial de ambas as células. Não foi encontrado na literatura outros estudos demonstrando a influência de tiossemicarbazonas sobre o potencial mitocondrial das células.

Como pode ser observado na **Figura 18**, o LAP17 causou um aumento significativo na expressão da proteína pró-apoptótica Bax de $58,96 \pm 2,5\%$ e $121,5 \pm 5\%$ para as células K562 e Jurkat, respectivamente, entretanto, não causou alterações na expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 nas células K562 e aumentou a expressão nas células Jurkat. A razão Bax/Bcl-2 foi de 0,70% na linhagem K562 e 0,61% na linhagem Jurkat. Assim, como o equilíbrio da via intrínseca se baseia no equilíbrio de Bax e Bcl-2 por mais que o LAP17 não tenha alterado a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 nas células K562 ou causado um aumento nas células Jurkat, o aumento da Bax prevaleceu o que desencadeou o processo apoptótico. A mudança de razão Bax/Bcl a favor de Bax predispõe à célula a apoptose (CORY et al., 2002; SCARFO et al., 2013). CABRERA e colaboradores também mostraram uma super expressão de Bax em uma tiossemicarbazona testada, mostrando o envolvimento da via intrínseca da apoptose nas células Jurkat.

A outra via estudada neste trabalho foi a via extrínseca, esta é ativada por receptores encontrados na membrana plasmática, como por exemplo o receptor Fas. Uma cascata de sinalização intracelular pode ser ativada através desse receptor com a clivagem das pró-caspase 8 e pró-caspase 10 com a finalidade de promover a formação do complexo indutor de morte DISC no citoplasma ativando assim a caspase-3 que é de via comum da apoptose (OLSSON et al., 2011; KOOF et al., 2015).

Neste trabalho foi avaliada a expressão do receptor Fas nas células K562 e Jurkat após 12 horas de tratamento com a tiossemicarbazona LAP17. Conforme **Figura 19**, pode-se observar um aumento significativo da expressão desse receptor nas células K562 e Jurkat, o que sugere que a apoptose causada pela LAP17 envolve a ativação da via extrínseca da apoptose.

Tanto a via intrínseca como a via extrínseca convergem para a fase de execução de apoptose, o que leva a ativação das caspases executoras (caspases -3, -6 e -7) (OLSSON et al., 2011; FULDA, 2015). Na sequência deste trabalho, foi investigado se a ativação das vias intrínseca e extrínseca causada pela tiossemicarbazona LAP17 levava a um aumento da caspase -3 ativa. Como é possível observar na **Figura 21**, o tratamento das células K562 e Jurkat levaram ao aumento significativo da caspase -3 ativa. Esses resultados mostram que a tiossemicarbazona LAP17 causa morte celular por apoptose e envolve os mecanismos intrínseco e extrínseco, o que resulta na ativação da caspase-3. CABRERA e colaboradores (2015) também mostraram a ativação de caspase-3 ao testar uma tiossemicarbazona na célula jurkat.

Além dessa via de indução de morte celular, também foi avaliado a via que envolve o fator indutor de apoptose (AIF), o qual é liberado da mitocôndria diante de um sinal de morte celular, independente da ativação de caspases (NORBERG et al., 2010). Como pode ser observado na **Figura 20**, LAP17 aumentou significativamente a expressão do AIF em ambas as linhagens celulares estudadas após o tratamento de 12 horas. Sendo assim, pode-se sugerir que a apoptose causada pela tiossemiocarbazona LAP17 envolve as vias extrínseca e intrínseca de apoptose e a liberação do AIF, o que amplifica o sinal de morte celular. Não foi encontrado na literatura outros estudos relacionando tiossemicarbazonas com a liberação do AIF.

Sabe-se que um desequilíbrio no ciclo celular das células pode levar a uma proliferação descontrolada destas, o que é característico de células neoplásicas. Neste trabalho foi avaliado o efeito da tiossemicarbazona LAP17 no ciclo celular das linhagens K562 e Jurkat. Como é possível visualizar na **Tabela 4**, LAP17 causou bloqueio das células de LA na fase G2/M. CABRERA e colaboradores (2015) mostraram que uma outra tiossemicarbazona levou ao bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, o que corrobora os resultados deste trabalho.

Conforme já citado anteriormente a fase G2/M é a fase em que a célula está se preparando para a divisão mitótica. Já existe na clínica fármacos que provocam o bloqueio do ciclo celular, esta classe de fármacos é chamada de antimetabólitos, que provocam o bloqueio de uma

ou mais vias metabólicas envolvidas na síntese de DNA (RANG et al., 2007; HOFFBRAND et al., 2013).

A literatura mostra que as tiossemicarbazonas com atividade antiproliferativa exibem uma ampla diversidade estrutural, a maioria delas compartilha o mesmo mecanismo de ação que está associado a ribonucleotídeo redutase e à topoisomerase II, ambas são enzimas envolvidas com o processo de replicação da célula (KALINOVSKY et al., 2009). Porém, mais experimentos seriam necessários para investigar o mecanismo de ação da LAP17 sobre o bloqueio da proliferação das células de LA na fase G2/M do ciclo celular.

Os resultados obtidos no estudo nos permitem sugerir um dos possíveis mecanismos de citotoxicidade da tiossemicarbazona LAP17 sugerindo que o composto tem sua ação sobre as células K562 e Jurkat ativando a via intrínseca e extrínseca da apoptose, liberando também o fator indutor de apoptose, porém sem causar danos no potencial mitocondrial e bloqueando a fase G2/M do ciclo celular evitando assim a replicação das células.

7 CONCLUSÃO

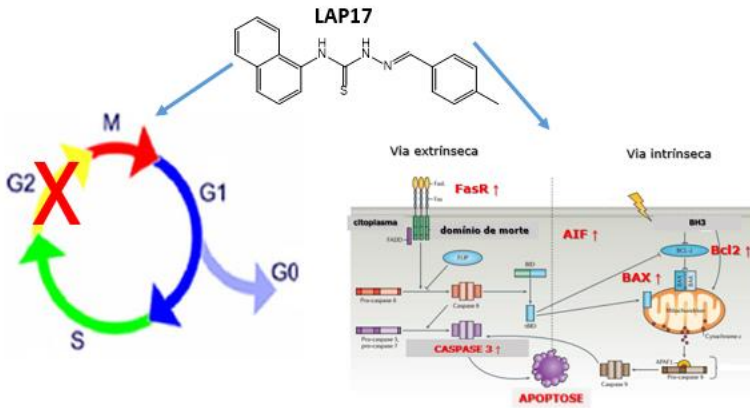
Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- Dentre as duas séries de tiossemicarbazonas testadas, a série **LAP** apresentou maior citotoxicidade quando comparada a série **LS**. Da série **LAP** as tiossemicarbazonas que apresentaram maior citotoxicidade foram: **LAP3**, **LAP17** e **LAP19**.
- A tiossemicarbazona **LAP17** apresentou melhor atividade em 24 horas para a célula K562 e Jurkat do que **LAP3** e **LAP19**.
- **LAP17** levou a uma redução da viabilidade celular nas células K562 e Jurkat de uma maneira dependente da concentração e do tempo de incubação.
- **LAP17** induz a morte celular por apoptose nas células K562 e Jurkat.
- **LAP17** não apresenta citotoxicidade para células mononucleadas de indivíduos saudáveis, nem causa hemólise em amostras de sangue periférico de indivíduos considerados saudáveis, mesmo em concentração três vezes superior à maior CI_{50} calculada nas células neoplásicas.
- **LAP 17** não causou alteração no potencial mitocondrial das células K562 e Jurkat após 12 horas de tratamento.
- A **LAP17** causou um aumento significativo na expressão da proteína pró-apoptótica Bax nas células K562 e Jurkat, entretanto, não causou alterações na expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 nas células K562 e aumentou a expressão nas células Jurkat. Porém, o aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax prevaleceu em relação a anti-apoptótica Bcl-2, e, esse desequilíbrio foi responsável pelo processo apoptótico pela via intrínseca nas células K562 e Jurkat e ativação da caspase 3.
- **LAP17** aumentou a expressão do receptor Fas nas células K562 e Jurkat.
- **LAP17** aumentou a expressão de AIF nas células K562 e Jurkat.
- **LAP17** causou um bloqueio do ciclo celular na fase G2/M das células K562 e Jurkat.

Nos resultados apresentados é possível observar que o composto não causa alterações no potencial mitocondrial das células K562 e Jurkat,

porém leva a um aumento não significativo de Bcl-2 na célula K562 e significativo na célula Jurkat, levando também a aumento expressivo de Bax tanto em K562 como em Jurkat demonstrando o envolvimento da via intrínseca da apoptose. O aumento de FasR em K562 e em Jurkat demonstra o envolvimento da via extrínseca, e o aumento da caspase-3 em ambas as linhagens estudadas confirma a morte celular por apoptose. É possível observar também um bloqueio expressivo na fase G2/M do ciclo celular (**Figura 22**), sugerindo LAP17 como um promissor protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das leucemias agudas.

Figura 22 - Esquema mecanismo de ação de LAP17



Fonte: Adaptado de CUDA., et al 2016.

REFERÊNCIAS

ABBAS, T.; DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews Cancer**. v. 9, n. 6, p. 400-414, 2009.

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

ALMEIDA, V. L. 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, n. 1, p. 118-129, 2005.

BAIN, B. J. *Leukaemia Diagnosis*. 4th Edition ed. Oxford: **Wiley-Blackwell**, 2010.

BENBROOK, D. M. et al. biologically active heteroarotinoids exhibiting anticancer activity and decreased toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 22, p. 3567-3583, 1997.

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.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Mol Aspects Med**, v. 21, n. 6, p. 167-223, 2000.

BHARTI, N. et al. Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 23, p. 3475-3478, 2002.

BISCEGLIE, F. et al. Quinoline-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones and their Cu(II) and Ni(II) complexes as topoisomerase IIa inhibitors. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 152, p. 10-19, 2015.

BONELLI, P. et al. CDK/CCN and CDKI alterations for cancer prognosis and therapeutic predictivity. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 15, 2014.

BRADFORD, J.A. et al. Non- Cytotoxic Near – IR DNA stein for cell cycle analysis in living cells. **Life Technologies**, v. 5791, 2010.

BRISSOT, E.; MOTY, M. which acute myeloid leukemia patients should be offered transplantation? **Seminars in Hematology**, v. 52, n. 3, p.223-231, 2015.

BURNETT, A. K. New induction and postinduction strategies in acute myeloid leukemia. **Curr Opin Hematol**, v. 19, n. 2, p. 76-81, 2012.

CABRERA, Maia. Et al. G2/M Cell Cycle Arrest and Tumors Selective Apoptosis of Acute Leukemia Cells by a Promisin Benzophenone Thiosemicarbazone Compound. **Plos One** 10(9): e0136878. *Jornal.pone*. 2015.

CARVALHO, M.S; OLIVEIRA, E.X.G; GRABOIS, M.F. Assistência ao câncer entre crianças e adolescentes: Mapeamento dos fluxos origem-destino no Brasil. **Revista Saúde Pública**. v. 47, p 368-378, 2013.

CASSIER, P.A et al. Targeting apoptosis in acute myeloid leukemia. **British Journal of Cancer**, v. 117, p. 1089-1098, 2017.

COS, P et al. In Vitro Antioxidant Profile of Phenolic Acid Derivatives. **Free Radical Research**, v. 36, p. 711-716, 2002.

CORNELL, R. F.; PALMER, J. Adult acute leukemia. **Dis Mon**, v. 58, n. 4, p. 219-38, 2012.

CORY, S.; ADAMS, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews**. v. 2, p. 647-656, 2002.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins: patologia estrutural e funcional. 8ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2010.

CRUZ, C. H et al. Tratamiento con quimioterapia de la leucemia mieloide aguda en el Hospital “Hermanos Ameijeiras” Experiencia de 20 años de trabajo. **Revista Cubana de Medicina**. v. 45, n. 1, 2006.

CRUZ et al. Minimal residual disease in acute myelogenous leucemia. **International Journal of Laboratory Hematology**, v.39, n.1, p. 53-60, 2017.

CUDA, C.M.; RICHARD, M.P.; HARRIS, P.; The inflammatory role of phagocyte apoptotic pathways in rheumatic diseases. **Nature Reviews**. v.12 p. 543-558, 2016.

DE AQUINO, T. M. et al. Synthesis, anti-*Toxoplasma gondii* and antimicrobial activities of benzaldehyde4-phenyl-3-thiosemicarbazones and 2 [(phenylmethylene)hydrazono]-4-oxo-3-phenyl-5-thiazolidineacetic acids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 446-456, 2008.

DE FARIA, J.L. Patologia geral: fundamentos das doenças, com aplicações clinicas. 4. ed.Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008.

DE MELOS, J. L. R. et al. Novel 3,4-methylenedioxyde-6-X benzaldehydethiosemicarbazones: Synthesis and antileishmanial effects against *Leishmania amazonensis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 103, p. 409-417, 2015.

DE OLIVEIRA, J. F. et al. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 104, p. 148-156, 2015.

DU, X. et al. Synthesis and structure–activity relationship study of potent trypanocidal thioSemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 13, p. 2695-2707, 2002/06/01 2002.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ENGELAND, M. V 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.

ESPÍNDOLA, J. W. P. et al. Synthesis and structure–activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxy thiosemicarbazones inhibiting *Trypanosoma cruzi cruzain*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 818-835, 8/28/ 2015.

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.

FERNÁNDEZ, L.C.; TORRES, M.; REAL, F.X. Somatic mosaicism: on the road to cancer. **Nature**, v.16, n. 1, p.43-55, 2016.

FERRAZ, K. S. O. et al. 2-Benzoylpyridine-N(4)-tolyl thiosemicarbazones and theirpalladium(II) complexes: Cytotoxicity against leukemia cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 20, p. 7138-7144, 2009.

FEUN, L. et al. Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehydethiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 50, n. 3, p. 223-229, 2002.

FILLIPITS, M.; Mechanisms of câncer: Multidrug resistance. **Drug Discovery today disease mechanisms**, 1(2):229–234, 2004.

FINCH, R. A. et al. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): a potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n. 8, p. 983-991, 2000.

FRENZEL, A et al. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. **Apoptosis**, v. 14, n. 4, p. 584-596, 2009.

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

FULDA, S. Targeting extrinsic apoptosis in câncer: challenges and oportunities. **Seminars in Cell E Developmental Biology**. v.39, p 20-25, 2015.

FUSO, N.I et al. Combination therapy in cancer: effects of angiogenesis inhibitors on drug pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Chinese Journal of Cancer**, v. 35, n 1. p. 61-72, 2016.

GRIMWADE, D.; HILLS, R.K. Independent prognostic factors for AML outcome. **Hematology American Society of Hematology Education Program**, p. 385-395, 2009.

GRIMWADE, D.; SYLVIE, D.F.; Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for “prime time”? **Blood**. v. 124, p. 3345-3355, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A.; Hallmarkers of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 1, p. 646 – 674, 2011.

HOFFBRAND, A.V.; MOSS, P.A.H.; **Fundamentos em Hematologia**. Artmed, 2013.

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

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.

IACOBUCCI, I et al. Cytogenetic and molecular predictors of outcome in acute lymphocytic leukemia: recent developments. **Current hematologic malignancy reports**, v. 7, n. 2, p. 133-143, 2012.

INCA, 2018. *Estimativa 2018. Incidência de câncer no brasil*. Primeira edição ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância.

JACQUES, J.M et al. Minimal Residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast and standardized Technologies. **Blood**. v. 125, p. 3996-4009, 2015.

KADOWAKI, N.; KITAWAKI, T. Recent advance in antigen-specific immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Clinical Developmental Immunology*, 2011. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3199067>.

KALINOVSKI, D.S.; QUACH, P.; RICHARDSON, D.R.; Thiosemicarbazones: The new wave in cancer. **Future Med. Chem**. v. 6, p. 1143-1151, 2009.

KARCH, J.; MOLKETIN, J.D. Regulated necrotic cell death: the passive aggressive side of Bax and Bak. **Circ Res**. v. 22, n.11, p. 1800-9, 2015.

KASTAN, M.B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v.18, n. 432, p. 316– 323, 2004.

KAVANAGH, E.L et al. Protein and chemotherapy profiling of extracellular vesicles harvested from therapeutic induced senescent triple negative breast cancer cells. **Oncogenesis**. v. 6, p 1-13, 2017.

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

KOEFLER, 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.

KOSIOR, K.; LEWANDOWSKA-GRYGIEL, M.; GIANNOPOULOS, K. Tyrosine kinase inhibitors in hematological malignancies. **Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej**. v. 65, p. 819-828, 2011.

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.

KRUG, U, et al. The Treatment of Elderly Patients with acute myeloid Leukemia. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 108, p. 863-870, 2011.

KULKARNI, G. et al. Specific hopanoid class differentially affect free-living and symbiotic states of *Bradyrhizobium diazoefficiens*. **MBio**. v. 20:6, 2015

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. **Robbins & Cotran: Bases patológicas das doenças**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1458 p.

KUROKAWA, M.; KORNBLUTH, S. Caspases and kinases in a death grip. **Cell**, v. 138, n. 5, p. 838-854, 2009.

LARSON, R.A. Remission criteria in acute myeloid leucemia and monitoring for residual disease, 2017. Disponível em: <<http://uptodate>> Acesso em 03 de maio de 2017.

LEHMKE, T. L. et al. Synthesis of 5,6-dihydro-8(7H)-quinolinone thiosemicarbazones as potential antitumor agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 10, p. 1351-1354, 1977.

LESSA, J. A. et al. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones: cytotoxic activity in nanomolar doses against malignant gliomas. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p.5671-5677, 2010.

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

LÖBRICH, M.; JEGGO, P.A. The impact of a neglected G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. **Nature**, v.7, p. 861-869, 2007.

MALUMBRES, M.; BARBACIA, M. Cell cycle, CDK's and cancer: a changing paradigm. **Nature review**, v. 9, p. 153-166, 2009.

MATE-MARTONE, C et al. GVL against mouse BC-CML and CP-CML: Shared mechanisms of T cell killing, but PD-ligands render CP-CML and not BC-CML GVL-resistant. **Journal Immunology**. v, 187, p. 1653-1663, 2015.

MITA, M. M.; MITA, A. C.; TOLCHER, A. W. Apoptosis: mechanisms and implications for cancer therapeutics. **Targeted Oncology**, v. 1, n. 4, p. 197-214, 2006.

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.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: aplicattion o proliferation and citotoxicity assays. **Journal of immunological methods**.v.55. N. 1. P. 55-63, 1983.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. What Is Cancer? **About Cancer**, S.I., 2015. Disponível em: < <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer> >. Acesso em: 10 de abril. 2017.

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.

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.

OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Caspases and cancer. **Cell death and differentiation**, v.18, p. 1441-1449, 2011.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005.

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

PIHÁN, P.; CARRERAS-SUREDA, A.; HETZ, C.; BCL-2 family: integrating stress responses at the ER control cell demise. **Cell death differentiation**. v.24, p. 1478-1487, 2017.

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

PUI. C.H.; MULLINGHAM. C.G.; EVANS.W.E. Pediatric ALL: where are we going and how do we get there? **Blood**. v.6, p.1165-1174, 2012.

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

RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P. Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. **Organization**, v. 8, p. 155-181, 2009.

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

ROLLAND, S. G.; CONRADT, B. New role of the BCL-2 family of proteins in the regulation of mitochondrial dynamics. **Curr Opin Cell Biol**, v. 22, n.6, p. 852-858, 2010.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**. v. 205, p. 698-699, 1965.

RYSAVY, N.M.; et al. Beyond apoptosis: The mecanismo ad function of phosphatydierine asymmetry in the membrane of activating mast cells. **BioArchitecture**. v. 4, p 127-137, 2014.

RUBIN, E.; et al. **Patologia: Bases Clinicopatológicas da Medicina**. 4a ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2010.

RUMJANEK, F.D. Introdução a biologia molecular. Editora Ambito Cultural, Rio de Janeiro, 2001.

RUMJANEK, V. M.; VIDAL, R.S.; MAIA, R.C. Multidrug resistance in chronic myeloid leucemia: how much can we learn from MDR-CML cell lines. **Bioscience Reports**, v.33, n.6, 2013.

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

SCARFO, L.; GHIA, P.; Reprogramming cell death: BCL-2 family inhibition in hematological malignancies. **Immunology Letters**, p. 1-3, 2013.

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.

SCHWARTZ, G. K.; SHAH, M. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 36, p. 9408-9421, 2005.

- SEKERES, M.A.; et al. Time from diagnosis to treatment initiation predict survival in younger, but not older, acute myeloid leucemia patients. **Blood**, 113(1):28-36, 2009.
- SERDA, M. et al. Synthesis and characterization of quinoline-based thiosemicarbazones and correlation of cellular iron-binding efficacy to anti-tumor efficacy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 17, p. 5527-5531, 2012.
- SEVAL, G.C.S.; OZCAN, M. Treatment of acute myeloid leukemia in adolescent and young adult patients. **Journal of Clinical Medicine**, v.4, n.3, p.441-459, 2015.
- SEVRIOUKOVA, I. F. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, n. 12, p. 2545-2579, 2011.
- SIEGEL, R.L.; KIMBERLY, D.M.M.; AHMEDIN, J.D.; Cancer Statistics 2017. CA: a cancer journal for clinicians. **Cancer Medicine's**. v. 67, p 7-30, 2017.
- SIQUEIRA, K. M.; BARBOSA, M. A.; BOEMER, M. R. O vivenciar a situação de ser com câncer: alguns desvelamentos. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v. 15, n. 4, p. 605-611, 2007.
- 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.
- STEFANI, C.; et al. Identification of differential anti-neoplastic activity of copper bis(thiosemicarbazones) that is mediated by intracellular reactive oxygen species generation and lysosomal membrane permeabilization. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 152, p. 20-37, 2015.
- SUAREZ, L.; et al. Multiparametric analysis of apoptotic and multi-drug resistance phenotypes according to the blast cell maturation stage in elderly patients with acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v.86, n.12, p.1287-95, 2001.

SURYADEVARA, C.M.; VERLA, T.; SANCHEZ-PEREZ, R. Immunotherapy for malignant glioma. **Surg. Neural. Int.**v.6, 568-577, 2015.

SWERDLOW, S. H. et al., 2016. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th Edition ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer.

TAKAHASHI, A.; et al. High-LET radiation enhanced apoptosis but not necrosis regardless of status. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 60, n. 2, p. 591-597, 2004.

TAN, L., et al. Ig Superfamily Ligand and Receptor Pairs Expressed in Synaptic Partners in *Drosophila*., 2015.

TARN, W. Y.; LAI, M. C. Translational control of cyclins. **Cell division**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2011.

TENÓRIO, R. P. et al. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, v. 28, p. 1030-1037, 2005.

TOWER, J.; Programmed cell death in aging. **Ageing Res rev.** v 23, p 90-100, 2015.

TSURUO, F.N.; Cancer Chemotherapy Pharmacology 52: 524, 2003.

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.; RIZVI, S.; LIU, X.; VRANA, K. E.; ZHENG, H. Novel Immunotherapies for Hematological Malignancies. **Current Molecular Pharmacology**, 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.

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.

ZAGO, M.; FALCÃO, R.; PASQUINI, R. **Hematologia Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2005.

ZHANG, Y.; et al. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell research*, p. 1-13, 2017.

ZHAO, W.; FOOG, D.K.; KAPLAN, M.J.; A novel image-based quantitative method for the characterization of NETosis. **J Immunol Methods**. v.423. p. 104-115, 2015.

APÊNDICE 1 – Trabalhos Apresentados em Congressos




CERTIFICADO HEMO 2017

Certificamos que o trabalho intitulado **“AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DA TIOSSEMICARBAZONA LAP17 EM LINHAGENS DE CÉLULAS DE LEUCEMIAS AGUDAS”** de autoria de “Perondi DM, Jacques AV, Stefanes NM, Sens L, Nunes RJ, Silva MCS” foi apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2017, realizado no período de 8 a 11 de novembro de 2017, no Expotrade Convention Center de Curitiba/PR, na categoria painel com visita guiada (Painel 163).

Curitiba, 11 de novembro de 2017.




 DIMAS TADEU COVAS
 PRESIDENTE DO HEMO 2017
 PRESIDENTE DA ABHH


 RICARDO PASQUINI
 PRESIDENTE DE HONRA DO HEMO 2017

APÊNDICE 2 – 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 resíduo 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 Franconi Maioral, Giovanna Steffenello Durigton, 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 Rector 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		

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 discutí-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____

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:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-9696 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

Continuação do Parecer: 746.486

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata o presente de um projeto de pesquisa coordenado pela ProF. 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: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 Fax: (48)3721-9896 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)3721-9606 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br