

Iris Mattos Santos Pirath

**INVESTIGAÇÃO DOS PRINCIPAIS MECANISMOS  
APOPTÓTICOS INDUZIDOS POR COMPOSTOS DE ORIGEM  
SINTÉTICA E NATURAL EM CÉLULAS DE LINHAGENS DE  
NEOPLASIAS LINFOIDES**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Doutor em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> 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.

Santos Pirath, Iris Mattos  
INVESTIGAÇÃO DOS PRINCIPAIS MECANISMOS  
APOPTÓTICOS INDUZIDOS POR COMPOSTOS DE ORIGEM  
SINTÉTICA E NATURAL EM CÉLULAS DE LINHAGENS DE  
NEOPLASIAS LINFOIDES / Iris Mattos Santos Pirath ;  
orientadora, Maria Cláudia Santos da Silva, 2018.  
190 p.

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

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Neoplasias linfoides. 3. 3,4,5  
trimetoxifenila. 4. tiossemicarbazona. 5.  
plastoquinona. I. Santos da Silva, Maria Cláudia .  
II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

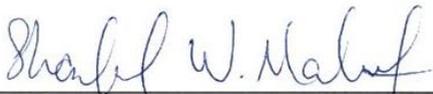
**“Investigação dos principais mecanismos apoptóticos induzidos por compostos de origem sintética e natural em células de linhagens de neoplasias linfoides”**

**POR**

**Iris Mattos Santos Pirath**

Tese 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). Sharbel Weidner Maluf (UFSC – Membro Titular)**



**Prof(a). Dr(a). Izabella Thais da Silva (UFSC – Membro Titular)**



**Prof(a). Dr(a). Louise Domeneguini Chiaradia Delatorre (SMS/PMJ - Membro Titular)**



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



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

Florianópolis, 05 de dezembro de 2018.



## AGRADECIMENTOS

Acredito que se dedicar ao máximo e dar o seu melhor é o mínimo que podemos fazer para alcançar a vida que merecemos e que coisas grandiosas nunca vêm da zona de conforto. No entanto, um trabalho como este não poderia ser realizado sem a ajuda de pessoas incríveis com as quais eu pude contar e que foram e/ou ainda são essenciais na minha vida.

Agradeço primeiramente à minha orientadora, profa. Maria Cláudia Santos da Silva, pelas oportunidades, pela confiança e por disponibilizar todos os recursos necessários ao desenvolvimento deste trabalho. Você foi muito importante na realização de alguns sonhos da minha vida, como o doutorado e o desenvolvimento da minha vida profissional em uma área que amo e que pretendo me dedicar e aprender cada vez mais. Fico muito feliz em fazer parte do seu sonho de sermos uma equipe de excelência no que fazemos, em compartilhar dúvidas e ensinamentos e em ter a oportunidade e o estímulo para poder me especializar cada vez mais no diagnóstico de neoplasias hematológicas por citometria de fluxo.

Agradeço aos professores Ricardo José Nunes, Miriam de Barcellos Falkenberg, Patrícia Neuenfeldt e Larissa Sens e aos alunos Lucas Antônio Pacheco e Ana Cláudia Philippus por disponibilizarem os compostos utilizados neste trabalho e pela colaboração e disponibilidade de sempre.

Agradeço aos professores membros da banca examinadora da qualificação, Lilian Sibelle Campos Bernardes, Sharbel Weidner Maluf e Thiago Caon que contribuíram para a melhoria deste trabalho. Agradeço também aos professores membros da banca da defesa, Izabella Thaís Da Silva, Louise Domeneghini Chiaradia Delatorre, Sharbel Weidner Maluf e Ana Carolina Rabello de Moraes pela disponibilidade em avaliar esta tese.

Agradeço ao PGFAR, CnPq e CAPES pelas oportunidades e pelo apoio financeiro para a execução do trabalho.

Agradeço também aos integrantes e ex integrantes do LOEH em especial à Dai, Nati, Amanda, Pati, Bruna e Stephanie pela amizade e momentos de discussões e descontrações. Devo um agradecimento especial à Laura, que foi “minha” estagiária e estava sempre disposta a aprender tudo que eu estava fazendo e contribuiu muito na execução do trabalho e também à Mari Maioral, que me permitiu lembrar momentos felizes vividos durante a graduação e auxiliou na elaboração da tese e de todos os artigos. Com certeza, sem vocês tudo seria muito mais difícil!

Gostaria de agradecer também aos colegas, ex-colegas e amigos do setor de onco-hematologia do HU/UFSC, como a Mariangeles, Renata, Carol, Manu, Sandro, Bá, Jessi, Amanda, Pati, Helô, Júlia, Vicky, Ket, Chris e Mariana pela convivência diária. Assim como aos colegas e amigos de outros setores, em especial a Malu, a Fran e a Letícia, pelas conversas no corredor e confraternizações que deixam os dias mais leves.

Agradeço também as minhas amigas do HU. A Camila que está sempre presente na minha vida e sei que posso contar. A Chandra que divide comigo as responsabilidades e alegrias que a citometria nos proporciona.

Agradeço também a minha família, meu marido, minhas tias e minha irmã, pelo amor, suporte e incentivo. Ao Renan pelo amor, paciência, apoio, estímulo em todos os momentos e por estar construindo uma nova família junto comigo. Toda a minha gratidão à Lú e à Léa pelo carinho, dedicação, apoio e por tudo que já fizeram e ainda fazem por nós. Agradeço também aos meus amigos irmãos Martina, Lucas, Jacque e Marcio por estarem presentes em todos os momentos. Amo vocês!

**Muito obrigada!**

## RESUMO

As neoplasias linfoides são caracterizadas por uma expansão clonal de células linfoides imaturas ou maduras em vários estágios de diferenciação. A quimioterapia utilizada acarreta muitos efeitos adversos e está associada a recidivas e a altas taxas de morbidade e mortalidade. Assim, é necessário o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento dessas doenças. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito citotóxico de compostos sintéticos com o grupo 3,4,5-trimetoxifenila e de derivados de tiossemicarbazonas e da plastoquinona natural AP1, tendo como foco a investigação dos seus mecanismos de ação em células de neoplasias hematológicas de linhagem linfoide. Inicialmente foram selecionados os compostos sintéticos com maior atividade citotóxica (EtA04, Eh09, CMS-08) e foi demonstrado que, assim como AP1, eles reduziram a viabilidade celular de diferentes linhagens tumorais de forma dependente do tempo e da concentração. Dos compostos selecionados, Eh09 causou hemólise significativa e, por isso, foi excluído do estudo. Os compostos EtA04, CMS-08 e AP1 não induziram bloqueio no ciclo celular, porém o AP1 diminuiu a expressão do marcador de proliferação celular Ki-67. Além disso, não apresentaram citotoxicidade significativa sobre células não neoplásicas. A morte por apoptose foi confirmada pela avaliação da morfologia celular, pelo ensaio de fragmentação do DNA e por citometria de fluxo pelo método da anexina V. Sugere-se que o mecanismo envolvido na morte celular induzida por CMS-08 e AP1 envolve a apoptose intrínseca, com inversão de Bcl-2 e Bax, o que leva à perda do  $\Delta\psi_m$  dependente do tempo. O envolvimento da apoptose extrínseca demonstrado pelo aumento da expressão de FasR, e o aumento de AIF foram observados apenas para o composto AP1. CMS-08 e AP1 também diminuíram a expressão de survivina e aumentaram a caspase-3 ativada em células Daudi e Jurkat e induziram uma diminuição na expressão de NF $\kappa$ B em células Jurkat. CMS-08 induziu uma diminuição na expressão de Akt, pAkt, MAP cinase/ERK2 e CHOP em células Daudi, o que sugere modulação das vias PI3K/Akt/mTOR, MAPK/ERK e UPR. Por fim, CMS-08 e AP1 reduziram a viabilidade das células mononucleadas de pacientes com neoplasias linfoides. Os resultados fornecem novas informações sobre os mecanismos apoptóticos dos compostos selecionados e sugerem que os mesmos sejam moléculas bioativas para o desenvolvimento de novos fármacos para serem utilizados no tratamento de neoplasias linfoides.

**Palavras-chave:** Neoplasias linfoides, leucemia, linfoma, citotoxicidade, apoptose, 3,4,5-trimetoxifenila, tiossemicarbazona, plastoquinona.

## ABSTRACT

Lymphoid neoplasms are characterized by a clonal expansion of immature or mature lymphoid cells at various stages of differentiation. Chemotherapy has many adverse effects and is associated with relapses and high morbidity and mortality rates. Therefore, the development of new drugs to treat these diseases is a necessity. In this context, the aim of the present study was to evaluate the cytotoxic effect of new synthetic compounds containing a 3,4,5-trimethoxyphenyl fragment, of new thiosemicarbazones derivatives and of natural plastoquinone AP1, focusing on the investigation of their death mechanisms in hematological cells of the lymphoid lineage. Initially, the most cytotoxic synthetic compounds (EtA04; Eh09; CMS-08) were selected and it was demonstrated that these compounds, like AP1, reduced the cell viability of different tumor cell lines in a time and concentration-dependent manner. Among the compounds, Eh09 showed a significant hemolytic effect and then, it was excluded from the study. Compounds EtA04, CMS-08 and AP1 were not significantly cytotoxic to non-neoplastic cells and they did not induce cell cycle arrest, however AP1 decreased Ki-67 expression, a cell proliferation marker. Apoptotic cell death was confirmed by cell morphology, DNA fragmentation and flow cytometry using the annexin V method. The mechanisms involved in cell death induced by CMS-08 and AP1 involves intrinsic apoptosis with Bcl-2 and Bax inversion, which leads to time-dependent  $\Delta\psi_m$  loss. Involvement of extrinsic apoptosis, as demonstrated by an increased FasR expression, was observed only for compound AP1. The two selected compounds decreased survivin expression and increased activated caspase-3. CMS-08 and AP1 reduced NF $\kappa$ B expression in Jurkat cells. CMS-08 decreased Akt, pAkt, MAP kinase/ERK2, and CHOP expression in Daudi cells, which suggests the modulation of PI3K/AKT/mTOR, MAPK/ERK, and UPR signaling pathways. Finally, CMS-08 and AP1 reduced the viability of mononuclear cells from patients with lymphoid neoplasms. The results provided new information about the apoptotic mechanisms of the selected compounds and suggest that they are promising bioactive molecules for the development of new drugs against lymphoid neoplasms.

**Key words:** Lymphoid neoplasms, leukemia, lymphoma, cytotoxicity, apoptosis, 3,4,5-trimethoxyphenyl, thiosemicarbazone, plastoquinone.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hematopoiese na MO.....	27
Figura 2 - Maturação das células linfoides B.....	30
Figura 3 - Maturação das células linfoides T.....	32
Figura 4 - Fluxograma da classificação das neoplasias de células linfoides de acordo com a classificação da OMS de 2016.....	35
Figura 5 - Dinâmica dos microtúbulos.....	41
Figura 6 - Atividade antimitótica dos compostos desestabilizantes e estabilizantes dos microtúbulos.....	42
Figura 7 - Estrutura química da colchicina.....	43
Figura 8 - Estrutura química geral das tiossemicarbazonas.....	44
Figura 9 - Estrutura do composto AP1 (9-hidroxisargaquinona). ....	46
Figura 10 - Ciclo celular e seus mecanismos de regulação. ....	49
Figura 11 - Mecanismos das apoptoses intrínseca e extrínseca.....	53
Figura 12 - Envolvimento de outras vias de sinalização na morte celular. ....	57
Figura 13 - Delineamento do estudo. ....	59
Figura 14 - Caracterização fenotípica das células de linhagem linfóide T (Jurkat e Molt-4).....	77
Figura 15 - Caracterização fenotípica das células de linhagem linfóide B (Daudi e Namalwa). ....	78
Figura 16 - Sonda de FISH em preparações de células em interfase e cromossomos em metáfase da amostra de células Daudi. ....	79
Figura 17 - Triagem dos compostos com o grupo 3,4,5-trimetoxifenila em células Daudi e Jurkat.....	80
Figura 18 - Estrutura química dos compostos EtA04 e Eh09.....	81
Figura 19 - Curvas de concentração e tempo resposta dos compostos EtA04 e Eh09 nas linhagens Daudi (A) e Jurkat (B). ....	82
Figura 20 - Triagem dos derivados de tiossemicarbazonas em células Daudi e Jurkat.....	84
Figura 21 - Estrutura química dos compostos CMS-08 e VIU-09. ....	85
Figura 22 - Curvas de concentração e tempo resposta dos compostos CMS-08 e VIU-09 nas linhagens Daudi e Jurkat.....	86
Figura 23 - Triagem do composto natural AP1 em células Daudi e Jurkat. ....	87
Figura 24 - Curvas de concentração e tempo resposta do composto AP1 nas linhagens Daudi e Jurkat.....	88

Figura 25 - Efeito dos compostos EtA04 e Eh09 sobre os eritrócitos do SP.....	90
Figura 26 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 sobre os eritrócitos do SP.....	91
Figura 27 - Efeito citotóxico dos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 sobre células mononucleadas em comparação com os controles positivos (taxol e vincristina) e negativos (células sem tratamento e tratadas com DMSO 1%). .....	93
Figura 28 - Efeito citotóxico do composto EtA04 sobre células de neoplasias hematológicas.....	94
Figura 29 - Efeito citotóxico do composto CMS-08 sobre células de neoplasias hematológicas.....	95
Figura 30 - Efeito citotóxico do composto AP1 sobre células de neoplasias hematológicas.....	96
Figura 31 - Efeitos dos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 nas células Daudi e Jurkat sobre o ciclo celular.....	98
Figura 32 - Efeito dos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 na expressão da proteína Ki-67 em células Daudi e Jurkat.....	99
Figura 33 - Características de tamanho (FSC) e complexidade interna (SSC) das células Daudi e Jurkat após o tratamento com os compostos EtA04, CMS-08 e AP1.....	101
Figura 34 - Avaliação morfológica das células Daudi e Jurkat após tratamento com os compostos CMS-08, AP1 e EtA04.....	102
Figura 35 - Efeito dos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 na exposição dos resíduos de fosfatidilserina em células Daudi e Jurkat pelo método da anexina V conjugada a FITC após 18 h de incubação.....	103
Figura 36 - Efeito do composto CMS-08 na exposição dos resíduos de fosfatidilserina em células Daudi pelo método da anexina V conjugada a FITC após 24 h de incubação.....	104
Figura 37 - Efeito dos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 na fragmentação do DNA de células Daudi e Jurkat.....	105
Figura 38 - Efeito dos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 no $\Delta\Psi_m$ de células Daudi e Jurkat após incubação por 18 h.....	106
Figura 39 - Efeito dos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 no $\Delta\Psi_m$ de células Daudi e Jurkat após incubação por 24 h.....	107
Figura 40 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 na expressão das proteínas Bcl-2 e Bax em células Daudi e Jurkat.....	109

Figura 41 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 na expressão da proteína AIF em células Daudi e Jurkat. ....	110
Figura 42 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 na expressão da proteína FasR em células Daudi e Jurkat. ....	111
Figura 43 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 na expressão da proteína caspase-3 ativada em células Daudi e Jurkat. ....	112
Figura 44 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 na expressão da proteína survivina em células Daudi e Jurkat.....	113
Figura 45 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 na expressão da proteína NFκB nas células Daudi e Jurkat. ....	114
Figura 46 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 na expressão da proteína p53 nas células Daudi e Jurkat. ....	115
Figura 47 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 na expressão das proteínas Akt e pAkt nas células Daudi e Jurkat. ....	116
Figura 48 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 na expressão da proteína MAP cinase/ERK2 nas células Daudi e Jurkat. ....	117
Figura 49 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 na expressão da proteína CHOP nas células Daudi e Jurkat. ....	118
Figura 50 - Efeito citotóxico dos compostos CMS-08 e AP1 sobre células mononucleadas de pacientes portadores de neoplasias linfoides. ....	120
Figura 51 - Esquema ilustrativo do mecanismo de ação do composto CMS-08 em células de neoplasias linfoides. ....	148
Figura 52 - Esquema ilustrativo do mecanismo de ação do composto AP1 em células de neoplasias linfoides. ....	148



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Efeitos <i>in vitro</i> das tiossemicarbazonas descritos na literatura. .....	45
Quadro 2 - Anticorpos utilizados na caracterização fenotípica das células de linhagens de neoplasias linfoides. ....	63
Quadro 3 - Anticorpos utilizados na análise de proteínas relacionadas com a apoptose e proliferação celular por CF. ....	72
Quadro 4 - Anticorpos utilizados na avaliação por WB. ....	74



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de $CI_{50}$ ( $\mu M$ ) calculados para as células Daudi e Jurkat após 24, 48 e 72 h de incubação com os compostos EtA04 e Eh09. ....	82
Tabela 2 - Valores de $CI_{50}$ ( $\mu M$ ) calculados nas células Daudi e Jurkat após 24, 48 e 72 h de incubação com os compostos CMS-08 e VIU-09. ....	86
Tabela 3 - Valores de $CI_{50}$ ( $\mu M$ ) calculados nas células Daudi e Jurkat após 24, 48 e 72 h de incubação com o composto AP1. ....	88
Tabela 4 - Taxa de hemólise (%) provocada pelos compostos EtA04, Eh9, CMS-08 e AP1 nas concentrações de específicas. ....	89
Tabela 5 - Valores de $CI_{50}$ ( $\mu M$ ) calculados nas células Molt-4, Namalwa, K562 e MM.1S após 24, 48 e 72 h de incubação com os compostos EtA04, CMS-08 e AP1. ....	95
Tabela 6 - Índice de seletividade para os compostos EtA04, CMS-08 e AP1. ....	97
Tabela 7 - Efeito dos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 nas fases do ciclo celular de células Daudi e Jurkat. ....	97
Tabela 8 - Razão entre a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e a proteína pró-apoptótica Bax. ....	109
Tabela 9 - Características e valores de $CI_{50}$ ( $\mu M$ ) observados para as amostras de pacientes portadores de neoplasias linfoides. ....	121
Tabela 10 - Sumário de resultados. ....	122



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\Psi_m$  - Potencial de membrana mitocondrial  
AIF - Fator indutor de apoptose  
APAF-1 - Fator-1 ativador de protease apoptótica  
APC: Alociocianina  
APCH7: Alociocianina H7  
BCA - Ácido bicinonínico  
BCR - Do inglês, *B cell receptor*  
BE - Brometo de etídeo  
CC - Cromatografia em camada delgada  
CDK - Cinase dependente de ciclinas  
CEPSH - Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos  
CF - Citometria de fluxo  
CHOP - Do inglês, *C/EBP homologous protein*  
CG - Centro germinativo  
DAPK1 - Proteína cinase associada à morte  
DISC - Complexo sinalizador indutor de apoptose  
DLAI - Doenças linfoproliferativas associadas à imunodeficiência  
DNA - Ácido desoxirribonucleotídeo  
DMSO - Dimetilsulfóxido  
EBV - Epstein-Barr vírus  
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético  
EPM - Erro-padrão da média  
EROs - Espécies reativas de oxigênio  
FDA - Do inglês, *Food and Drug Administration*  
FISH - Hibridização *in situ* fluorescente  
FITC: Fluoresceína  
FSC - Do inglês, *Forward scatter*  
GDP – Difosfato de guanosina  
GTP – Trifosfato de guanosina  
HEPES - Ácido N-[2-Hidroxietyl]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]  
HIV - Vírus da imunodeficiência humana  
CI<sub>50</sub> - Do inglês, *half minimal (50%) inhibitory concentration*  
CLV - Cromatografia líquida a vácuo  
IFM - Intensidade de fluorescência média  
Ig - Imunoglobulina  
IL - Interleucina  
INCA - Instituto Nacional do Câncer  
IP - Iodeto de propídeo  
IS - Índice de seletividade  
IUPAC - Do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*  
LA - Laranja de acridina  
LB - Linfoma de Burkitt  
LDGCB - Linfoma Difuso de Grandes Células B

LH - Linfoma de Hodgkin  
LLA - Leucemia Linfoblástica Aguda  
LLA-T - Leucemia Linfoblástica Aguda do tipo T  
LCB - Linfomas de Células B  
LCM - Linfoma de Células do Manto  
LF - Linfoma Folicular  
LLC-B: Leucemia Linfocítica Crônica B  
LMC - Leucemia mieloide crônica  
LNH - Linfomas não-Hodgkin  
LOEH - Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias  
LZME - Linfoma da Zona Marginal Esplênica  
MCR - Morte celular regulada  
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade  
MM - Mieloma múltiplo  
MO - Medula óssea  
MTT - Brometo de dimetiazoldifeniltetrazólio  
NCLM - Neoplasias de células linfoides maduras  
NCLBM - Neoplasias de células linfoides B maduras  
NCP - Neoplasias de células plasmocitárias  
NFkB - Fator de transcrição nuclear kappa B  
NK - Do inglês, *Natural Killer*  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
PacB: Pacific blue  
PacO: Pacific Orange  
PBS - Tampão fosfato  
PE: Ficoeritrina  
PECy7: Ficoeritrina-cianina 7  
PercP: Complexo proteína peridina-clorofila  
RE - Retículo endoplasmático  
RIPA - Do inglês, *Radioimmunoprecipitation Assay*  
RMN - Ressonância magnética nuclear  
RPMI - Do inglês, Roswell Park Memorial Institute  
SNC - Sistema nervoso central  
SP - Sangue periférico  
SSC – Do inglês, *Side scatter*  
TAE - Tampão tris/ácido acético/EDTA  
TCR - Do inglês, *T cell receptor*  
TdT - Desoxinucleotidil-transferase terminal  
TNF - Fator de necrose tumoral  
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina  
UPR - Do inglês, *Unfolded Protein Response*  
WB – Western Blotting

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	25
2.1 OBJETIVO GERAL .....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	27
3.1 HEMATOPOIESE .....	27
3.2 MATURAÇÃO LINFOIDE .....	28
<b>3.2.1 Maturação das células linfoides B</b> .....	29
<b>3.2.2 Maturação das células linfoides T</b> .....	31
3.3 NEOPLASIAS LIFOIDES .....	33
<b>3.3.1 Leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T)</b> .....	34
<b>3.3.2 Linfoma de Burkitt (LB)</b> .....	36
3.4 TRATAMENTO DE NEOPLASIAS LIFOIDES .....	37
3.5 NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS .....	40
<b>3.5.1 Análogos sintéticos que contêm o grupo 3,4,5-trimetoxifenila</b>	41
<b>3.5.2 Derivados de Tiossemicarbazonas</b> .....	43
<b>3.5.3 Compostos naturais</b> .....	44
3.6 REGULAÇÃO DE MORTE CELULAR .....	46
<b>3.6.1 Modulação e bloqueio do ciclo na regulação celular</b> .....	48
<b>3.6.2 Indução da apoptose na regulação celular</b> .....	50
3.6.2.1 Apoptose intrínseca .....	50
3.6.2.2 Apoptose extrínseca .....	52
<b>3.6.3 Vias de sinalização na regulação celular</b> .....	53
<b>3.6.4 O papel do retículo endoplasmático na regulação celular</b> .....	56
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	59
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL .....	59
4.2 OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS .....	61
4.3 CULTIVO CELULAR .....	61
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE LINHAGENS DE NEOPLASIAS LIFOIDES .....	62
4.5 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM OS COMPOSTOS E DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR .....	63
4.6 DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CONCENTRAÇÃO E TEMPO RESPOSTA .....	64
4.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS EM CÉLULAS DE SP DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS .....	65
<b>4.7.1 Teste de hemólise</b> .....	66
<b>4.7.2 Efeito citotóxico dos compostos selecionados em células não neoplásicas (células mononucleadas de SP)</b> .....	66

4.8 EFEITO CITOTÓXICO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS SOBRE OUTRAS CÉLULAS DE LINHAGENS DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS .....	67
4.9 CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS).....	67
4.10 EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE O CICLO CELULAR .....	67
4.11 DETERMINAÇÃO DA INDUÇÃO DA APOPTOSE.....	68
<b>4.11.1 Análise do tamanho e complexidade interna das células por CF e por microscopia de fluorescência com BE e LA.....</b>	<b>68</b>
<b>4.11.2 Detecção da externalização dos resíduos de fosfatidilserina por CF.....</b>	<b>69</b>
<b>4.11.3 Análise de fragmentação do DNA em gel de agarose .....</b>	<b>70</b>
4.12 AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi$ M).....	70
4.13 AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE POR CF (KI-67, BCL-2, BAX, AIF, FASR, CASPASE-3 ATIVADA E SURVIVINA).....	71
4.14 AVALIAÇÃO DE P53, NF $\kappa$ B, AKT, PAKT, MAP CINASE E CHOP POR WB.....	72
4.15 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS SOBRE CÉLULAS DE PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS LINFOIDES.....	74
4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	74
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>77</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE LINHAGENS DE NEOPLASIAS LINFOIDES.....	77
5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SINTÉTICOS E NATURAL SOBRE CÉLULAS NEOPLÁSICAS .....	78
<b>5.2.1 Triagem e determinação das curvas concentração e tempo resposta dos análogos sintéticos que contêm o grupo 3,4,5-trimetoxifenila.....</b>	<b>79</b>
<b>5.2.2 Triagem e determinação das curvas de concentração e tempo resposta das três séries de tiossemicarbazonas .....</b>	<b>82</b>
<b>5.2.3 Triagem e determinação das curvas de concentração e tempo resposta do composto natural API .....</b>	<b>86</b>
5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS EM CÉLULAS DO SP.....	88
<b>5.3.1 Investigação do efeito hemolítico induzido pelos compostos selecionados em eritrócitos humanos .....</b>	<b>88</b>
<b>5.3.2 Efeito citotóxico dos compostos EtA04, CMS-08 e API em células mononucleadas de SP .....</b>	<b>91</b>

5.4 EFEITO CITOTÓXICO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS SOBRE OUTRAS CÉLULAS DE LINHAGENS DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS.....	92
5.5 CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS) .....	96
5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	97
<b>5.6.1 Efeito dos compostos no ciclo celular .....</b>	<b>97</b>
<b>5.6.2 Efeito dos compostos sobre a proteína Ki-67 .....</b>	<b>98</b>
5.7 DETERMINAÇÃO DA INDUÇÃO DA APOPTOSE .....	100
<b>5.7.1 Análise da morfologia celular por CF após incubação com os compostos selecionados .....</b>	<b>100</b>
<b>5.7.2 Avaliação da morfologia celular por microscopia de fluorescência com BE e LA.....</b>	<b>102</b>
<b>5.7.3 Detecção da externalização dos resíduos de fosfatidilserina por CF .....</b>	<b>103</b>
<b>5.7.4 Avaliação da Apoptose pelo Método de Fragmentação do DNA .....</b>	<b>104</b>
5.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS SOBRE A MITOCÔNDRIA.....	105
<b>5.8.1 Avaliação do comprometimento do potencial mitocondrial .</b>	<b>105</b>
5.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA MORTE CELULAR.....	108
<b>5.9.1 Investigação do efeito dos compostos CMS-08 e AP1 sobre proteínas envolvidas na apoptose intrínseca .....</b>	<b>108</b>
5.9.1.1 Efeito dos compostos sobre a proteína antiapoptótica Bcl-2 e sobre a proteína pró-apoptótica Bax .....	108
5.9.1.2 Efeito dos compostos sobre a proteína pró-apoptótica AIF.....	110
<b>5.9.2 Investigação do efeito dos compostos CMS-08 e AP1 sobre proteínas envolvidas na apoptose extrínseca .....</b>	<b>110</b>
5.9.2.1 Efeito dos compostos sobre o receptor de membrana Fas .....	110
<b>5.9.3 Investigação do efeito dos compostos CMS-08 e AP1 sobre a caspase-3 ativada .....</b>	<b>111</b>
<b>5.9.4 Efeito dos compostos sobre a proteína antiapoptótica survivina .....</b>	<b>112</b>
<b>5.9.5 Investigação do efeito dos compostos CMS-08 e AP1 sobre o NFκB .....</b>	<b>113</b>
<b>5.9.6 Investigação do efeito dos compostos CMS-08 e AP1 sobre a expressão de p53 .....</b>	<b>114</b>
<b>5.9.7 Investigação do efeito dos compostos CMS-08 e AP1 sobre a via PI3K/Akt/mTOR pela expressão de Akt1/2/3 e pAkt1/2/3 .....</b>	<b>115</b>

<b>5.9.8</b>	<b>Investigação do efeito dos compostos CMS-08 e AP1 sobre a via MAPK/ERK pela expressão de MAP cinase/ERK2 .....</b>	<b>117</b>
<b>5.9.9</b>	<b>Investigação do efeito dos compostos CMS-08 e AP1 sobre o RE pela expressão de CHOP .....</b>	<b>118</b>
<b>5.10</b>	<b>CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS SELECIONADOS EM CÉLULAS DE PACIENTES COM NEOPLASIAS LINFOIDES .....</b>	<b>119</b>
<b>5.11</b>	<b>SUMÁRIO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>122</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>123</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>147</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>149</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>151</b>
	<b>ANEXO A - Síntese dos compostos sintéticos e isolamento do composto natural .....</b>	<b>181</b>
	<b>ANEXO B - Parecer do CEPESH da UFSC. ....</b>	<b>187</b>

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), câncer é um termo utilizado para designar um grupo de doenças caracterizadas pela rápida e anormal proliferação celular que pode resultar na invasão de órgãos ou partes do corpo adjacentes ao foco inicial. Os casos de câncer estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo e, no ano de 2018, foram registrados mais de 18 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes relacionadas a essa doença (GLOBOCAN, 2018). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se para o Brasil, no biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. Entre essas doenças, podem-se citar as neoplasias hematológicas, como as leucemias e os linfomas, que estão entre os dez tipos de cânceres mais incidentes no Brasil. Para cada ano do biênio 2018-2019, estimam-se 5.940 casos novos de leucemia em homens e 4.860 em mulheres e, em relação aos linfomas, estimam-se 5.370 novos casos de linfoma não Hodgkin (LNH) em homens e 4.810 em mulheres (INCA, 2018). O alvo do presente estudo são as neoplasias hematológicas de linhagem linfoide, as quais se encaixam nos critérios do INCA como leucemias ou LNH.

As neoplasias hematológicas de linhagem linfoide podem ser divididas em neoplasias de células B, T ou *natural killer* (NK) (SWERDLOW et al, 2017) e o diagnóstico correto do tipo de neoplasia reflete diretamente no tratamento a ser administrado a cada paciente. Em casos de doenças que apresentam um curso clínico mais agressivo, a conduta pode envolver a terapia sistêmica com fármacos citotóxicos (quimioterapia), a radioterapia, a imunoterapia (anticorpos monoclonais) e o transplante de medula óssea (CHANG et al, 2008; BASSAN, MAINO & CORTELAZZO, 2016). A quimioterapia é amplamente utilizada e tem como objetivo inibir a proliferação celular, induzir a morte celular regulada e/ou estimular a diferenciação das células neoplásicas. No entanto, a citotoxicidade não específica dos fármacos utilizados pode levar ao desenvolvimento de sérias complicações e contribuir para a diminuição da sobrevida e da qualidade de vida dos pacientes (HERR & DEBATIN, 2001; NOWAK, STEWART & KOEFFLER, 2009). Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de novas moléculas bioativas para a obtenção de fármacos mais eficientes e seguros que acarretem menos efeitos adversos, maiores taxas de cura e melhor qualidade de vida aos indivíduos em tratamento.

Nesse contexto, o Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) tem estudado o efeito citotóxico de diferentes

classes de compostos de origem sintética e natural para investigar possíveis novos quimioterápicos. Uma das perspectivas terapêuticas estudadas como tratamento antineoplásico é a indução da morte celular por apoptose, por meio da ligação à tubulina, a qual interfere na formação dos microtúbulos do citoesqueleto. Como exemplo de composto que interfere na dinâmica dos microtúbulos, pode-se citar a colchicina, que possui a capacidade de despolimerizá-los (ATTARD et al, 2006; PASQUIER & KAVALLARIS, 2008; PEREZ, 2009; FREZZATO et al, 2014). Dessa forma, neste trabalho foi avaliada a citotoxicidade de compostos contendo o grupo 3,4,5-trimetoxifenila, os quais apresentam a colchicina como protótipo. Além disso, foram avaliados derivados de tiossemicarbonas, visto que estudo prévio demonstrou o efeito citotóxico de compostos dessa classe (PERONDI, 2018). E, por fim, devido à importância de produtos de origem natural como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos, foram investigados os efeitos citotóxicos e os mecanismos de ação envolvidos na morte celular induzida por uma plastoquinona isolada da alga parda da espécie *Desmarestia menziesii*.

Assim, o objetivo do presente estudo foi buscar novos compostos de origem sintética e natural que possuam efeito citotóxico sobre células de neoplasias hematológicas de linhagem linfóide e estudar os principais mecanismos que induzem as mesmas à apoptose.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito citotóxico e os principais mecanismos apoptóticos induzidos por compostos sintéticos contendo o grupo 3,4,5-trimetoxifenila e derivados de tiossemicarbazonas e por uma plastoquinona isolada da alga *Desmarestia menziesii* sobre células de linhagens de neoplasias linfoides.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar avaliação fenotípica e molecular das células linfoides T (Jurkat e Molt-4) e B (Daudi e Namalwa) incluídas no estudo.

- Avaliar o efeito de 28 análogos sintéticos contendo o grupo 3,4,5-trimetoxifenila e de 38 derivados de tiossemicarbazonas sobre a viabilidade de células de linhagens humanas de neoplasias linfoides imatura (Jurkat) e madura (Daudi), além de avaliar a influência do composto natural AP1 sobre a viabilidade dessas células.

- Selecionar, em cada classe, os compostos que apresentaram maiores reduções na viabilidade celular e determinar suas respostas em relação à concentração e ao tempo de incubação em células Jurkat e Daudi.

- Investigar o efeito dos compostos selecionados em células do sangue periférico de indivíduos considerados saudáveis pela capacidade de causar lise em eritrócitos humanos e pela avaliação sobre células não neoplásicas.

- Determinar a resposta dos compostos selecionados em relação à concentração e ao tempo de incubação em outras células de neoplasias linfoides (Molt-4 e Namalwa), em uma linhagem de neoplasia mieloide (K562) e em uma linhagem de mieloma múltiplo (MM.1S).

- Calcular o índice de seletividade dos compostos selecionados em células de neoplasias linfoides em comparação com células de outras neoplasias hematológicas.

- Avaliar o efeito dos compostos selecionados sobre o ciclo celular e na expressão do marcador de proliferação celular Ki-67 em células Jurkat e Daudi.

- Verificar se os compostos selecionados causam morte celular por apoptose em células Jurkat e Daudi.

- Analisar o efeito dos compostos selecionados sobre o potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) das células Jurkat e Daudi.

- Investigar o efeito dos compostos selecionados sobre os seguintes fatores reguladores de apoptose: proteína antiapoptótica Bcl-2, proteína pró-apoptótica Bax, AIF, receptor Fas, caspase-3 ativada e survivina.

- Avaliar o efeito dos compostos selecionados sobre a expressão da proteína supressora de tumor p53 e dos fatores de transcrição NF $\kappa$ B e CHOP. Além de proteínas das vias PI3K/Akt/mTOR (Akt e pAkt) e MAPK/ERK (MAP cinase/ERK2).

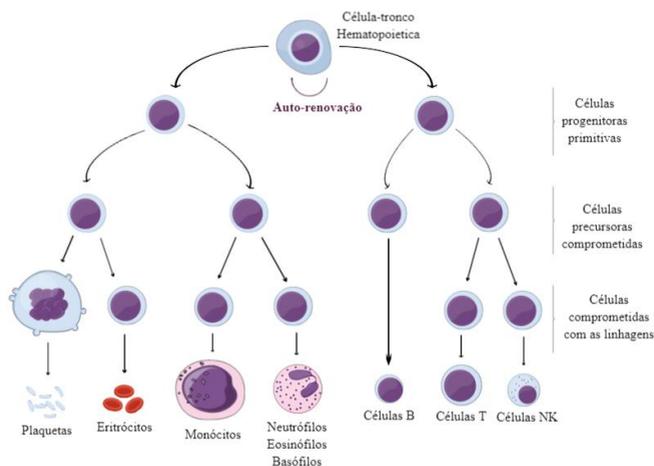
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos selecionados em ensaios *ex vivo* com células mononucleadas de sangue periférico e medula óssea de pacientes portadores de neoplasias linfoides no momento do diagnóstico ou da recidiva.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 HEMATOPOIESE

A hematopoiese é um processo dinâmico e complexo de formação de células sanguíneas que resulta na renovação, proliferação, diferenciação e maturação de todas as células funcionais que são liberadas da medula óssea (MO) para o sangue periférico (SP). Durante o desenvolvimento fetal, a hematopoiese ocorre em diferentes áreas do organismo, como no saco vitelínico, baço, fígado e MO, enquanto que, em adultos, todo o processo é mais restrito à MO (SMITH, 2012). Como consequência da interação com o microambiente medular (células estromais, endoteliais, adipócitos, macrófagos, osteoblastos, osteoclastos e fibroblastos) e da interação com citocinas e fatores de crescimento, as células-tronco hematopoiéticas permanecem viáveis e podem sofrer um processo de autorrenovação ou de diferenciação em células progenitoras. Essas células podem estar comprometidas com a linhagem mieloide, as quais darão origem às plaquetas, eritrócitos, monócitos e granulócitos ou com a linhagem linfóide, que se diferenciarão em linfócitos B, T ou NK, que são células do sistema imunológico (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015) (Figura 1).

Figura 1 - Hematopoiese na MO.



Desenvolvimento de células sanguíneas a partir de uma célula-tronco multipotente. Fonte: A AUTORA.

O desenvolvimento das células linfoides ocorre nos tecidos linfoides primários e secundários. Os tecidos linfoides primários são constituídos da MO e do timo, locais de formação das células B e T, respectivamente. Já os tecidos linfoides secundários, como baço, gânglios linfáticos e tecidos linfoides associados a mucosas, são os locais onde as células tornam-se especializadas após a estimulação antigênica (BLOOM & SPITZ, 2006; SMITH, 2012).

### 3.2 MATURAÇÃO LINFOIDE

Os linfócitos são células do sistema imunológico que derivam de um progenitor hematopoético comprometido com um precursor linfoide após interação com as células estromais via VLA4/VCAM-1, *c-kit/stem cell fator* e CD44/ácido hialurônico (BLOOM & SPITZ, 2006; NAGASAWA, 2006; SMITH, 2012). Os linfócitos são encarregados de reconhecer e responder de forma específica e adaptada a diferentes agentes e de induzir tolerância a estruturas próprias. De forma geral, são divididos em células B e células T, as quais desempenham papel fundamental na imunidade adaptativa. Existem também as células NK, que compartilham alguns mecanismos efetores da resposta imune com os linfócitos T e fazem parte da imunidade inata. Além disso, os linfócitos podem se subdividir em células que participam da imunidade humoral produzindo anticorpos (células B) e em células que participam da imunidade celular (células T e NK) (MELCHERS, 2015; SWERDLOW, 2017).

O comprometimento com a linhagem B ou T depende de sinalizações recebidas de vários receptores de superfície celular que produzem sinais para induzir reguladores específicos da transcrição e estimulam um progenitor linfoide comum a assumir especificamente o destino de uma célula B ou T. Esse processo acontece por meio da ativação de proteínas envolvidas no rearranjo V-D-J dos genes dos receptores de antígenos, tornando os *loci* particulares desses genes acessíveis a proteínas promotoras de rearranjo, e levam à formação de receptores de antígenos específicos como as imunoglobulinas (Igs) de células B e os receptores de células T (TCR). O rearranjo gênico que ocorre nas células B e T imaturas permite que seja gerado um grande número de éxons que codificam as regiões variáveis das Igs e dos TCRs com uma fração relativamente pequena do genoma, e também maximiza a variabilidade entre os receptores. No entanto, apenas uma em cada três células é capaz de realizar o rearranjo gênico de forma correta e gerar os

pré-receptores que são capazes de reconhecer sinais de sobrevida. Dessa forma, as células que não são capazes de realizar esse processo corretamente sofrem morte celular programada. Posteriormente, os linfócitos que continuaram o seu desenvolvimento expressam o receptor completo, enquanto ainda são células imaturas, e passam por um processo de seleção positiva e negativa no qual somente as células potencialmente úteis permanecem. Na seleção positiva, os precursores linfóides com receptores de antígenos se ligam a algum ligante próprio com baixa afinidade, são selecionados para sobreviver e continuar a maturação. Já na seleção negativa, as células que se ligam com alta afinidade aos antígenos presentes nos órgãos geradores recebem sinais que levam à morte celular ou que induzem a um rearranjo adicional dos genes receptores de antígenos (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015).

### 3.2.1 Maturação das células linfóides B

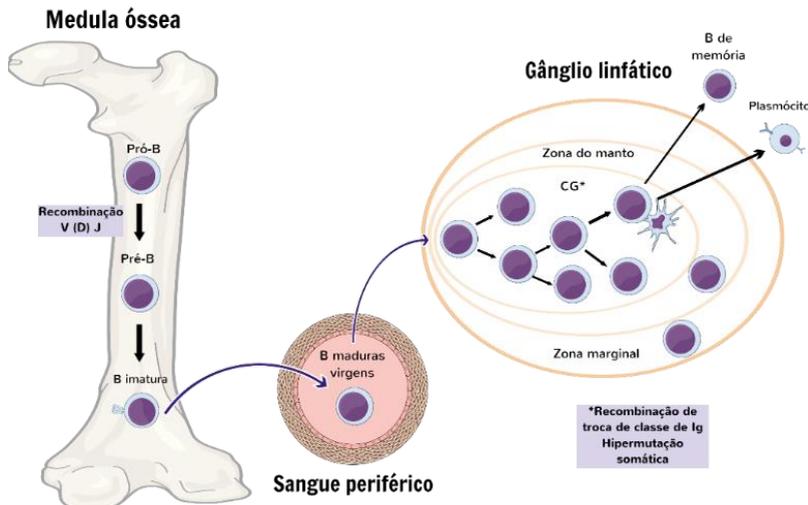
A maturação das células B ocorre de forma completa na MO no momento em que as células progenitoras diferenciam-se a células pró-B, enquanto os genes das Igs estão na configuração da linhagem germinativa. A recombinação V-D-J ocorre a fim de formar as células pré-B que expressam a proteína da cadeia pesada das Igs e o pré-receptor de células B (pré-BCR), mas que ainda precisam rearranjar os *loci* das cadeias leves. Posteriormente, cada célula B em desenvolvimento rearranja um gene da cadeia leve  $\kappa$  para produzir uma proteína que se juntará à cadeia pesada previamente sintetizada a fim de formar uma molécula de IgM completa.

As células B que expressam IgM são denominadas células B imaturas ou células B *naive*, e expressam também o receptor de células B (BCR) que envia sinais de sobrevivência e proliferação, assim como sinais para inibir o rearranjo adicional de outro gene de cadeia pesada (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015; COOPER, 2015). As células B que expressam o receptor BCR, denominadas células B maduras ou virgens, saem da MO (NOGAI et al, 2011), enquanto que, paralelamente, por um processo de seleção negativa, as células B com um receptor BCR autorreativo são eliminadas (DELFA, 2011). Dessa forma, as células B imaturas deixam a MO para amadurecer principalmente no baço, passam a expressar também IgD na membrana, são denominadas de células B virgens maduras, e adquirem a capacidade de recircular, além de passarem a apresentar competência funcional. Em seguida, migram para o centro germinativo dos órgãos linfóides secundários, onde entram em

contato com os antígenos com o auxílio de outras células e são ativadas após sofrerem processos de modificação no DNA. Esses processos compreendem a recombinação de troca de classe de imunoglobulina, no qual a classe de imunoglobulina pode variar de IgM para IgG, IgA ou IgE, e a hipermutação somática, em que a região variável da cadeia leve sofre mutação, criando a afinidade de um clone de células B a um antígeno específico (SHANKLAND et al, 2012).

A ativação leva à proliferação e à diferenciação de células específicas para o antígeno, o que gera células B de memória ou células plasmocitárias devido à expressão de vários fatores de transcrição. As células B de memória vivem por longos períodos, recirculam entre os gânglios linfáticos e o baço, e respondem à exposição ao antígeno com a diferenciação em células secretoras de anticorpos de alta afinidade. Já as células plasmocitárias secretam anticorpos e migram para a MO (Figura 2) (ZHU, GARRETT & JUNG, 2007; BONILLA; OETTGEN, 2010; ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015; COOPER, 2015; MELCHERS, 2015).

Figura 2 - Maturação das células linfoides B.



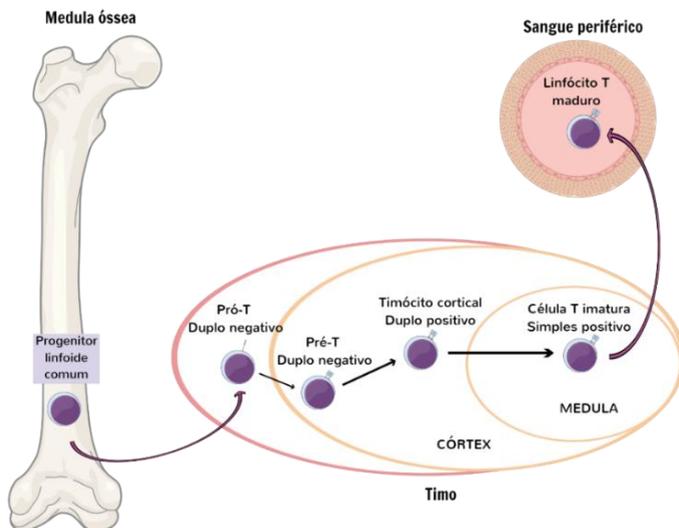
Na MO, as células B passam por uma recombinação genética até a formação das células B imaturas que migram para os órgãos linfoides secundários, onde se diferenciam em células de memória ou em células plasmocitárias. Fonte: A AUTORA. Nota: CG: Centro Germinativo, Ig: Imunoglobulina.

### 3.2.2 Maturação das células linfoides T

Conforme demonstrado na Figura 3, as células T desenvolvem-se na MO e migram para o timo pela corrente sanguínea, onde passam por processos de proliferação, seleção e diferenciação até completar a maturação e se tornar um linfócito T maduro (BLOOM & SPITZ, 2016). As células T presentes na MO ainda não expressam CD4, CD8 e TCR e migram para o timo onde são chamadas de timócitos. Os timócitos mais imaturos são encontrados no seio subcapsular e na região cortical externa do timo e diferenciam-se em células pró-T (duplo negativas - não apresentam os antígenos CD4 e CD8) que apresentam o TCR na configuração de linhagem germinativa. As células pró-T que sobrevivem aos processos de seleção no timo migram para a região cortical devido à ação de quimiocinas e são estimuladas por citocinas como a IL-7 (interleucina-7) a passar por rearranjos de genes somáticos (recombinação V-D-J) que, com o auxílio da enzima Desoxinucleotidil-transferase terminal (TdT), levam à formação das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do TCR e, dessa forma, expressam o pré-TCR e são denominadas pré-T. Nesse estágio, as células continuam duplo-negativas e o pré-TCR transduz sinais que inibem o rearranjo de outra cadeia  $\beta$  e promovem a diferenciação para o estágio de dupla expressão de CD4 e CD8 e a proliferação adicional dos timócitos imaturos. Ocorre então que a maioria das células passa a expressar TCR  $\alpha\beta$ , enquanto que o restante dará origem às células T  $\gamma\delta$ . As células T  $\alpha\beta$  amadurecem em células T duplo-positivas (CD4+ e CD8+) e são denominadas timócitos corticais. A seguir, os timócitos duplo-positivos que expressam o TCR  $\alpha\beta$  na superfície celular, são capazes de reconhecer antígenos apresentados por moléculas do MHC - complexo principal de histocompatibilidade (MHC) do hospedeiro e tornam-se comprometidas com a linhagem CD4 ou CD8 (simples-positivos), devido ao reconhecimento de moléculas de MHC de classe II ou I pelo TCR presente na célula. Nesse momento, acontecem os processos de seleção positivos e negativos que têm como objetivo fazer com que as células que se ligam com baixa afinidade ao MHC das células epiteliais do timo sejam estimuladas a sobreviver, enquanto que aquelas que reconhecem com alta afinidade sofrem morte regulada ou se diferenciam em células T reguladoras, as quais impedem a ocorrência de reações autoimunes. Assim, as células migram para a região medular do timo e entram em contato com as células apresentadoras de antígenos próprios associados ao MHC (WU, 2006; ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015).

Por fim, os tímócitos simples-positivos abandonam o timo na forma de linfócitos T maduros virgens e migram pelo SP para exercerem suas funções nos tecidos linfoides secundários. As células T CD4+ adquirem a capacidade de produzir citocinas em resposta à estimulação antigênica subsequente e a expressar moléculas efetoras que auxiliam os linfócitos B, as células dendríticas e os macrófagos a desempenharem suas funções. Essas células são denominadas células T auxiliares e podem se diferenciar em células TH1 (secretam  $\text{IFN-}\gamma$  que medeia a defesa contra os microrganismos intracelulares), TH2 (que secretam IL-4 e IL-5 e favorecem reações mediadas por IgE e reações imunes mediadas por eosinófilos e mastócitos) e TH17 (que promovem a inflamação e medeiam a defesa contra fungos e bactérias extracelulares). Já os linfócitos T CD8+ proliferam e se diferenciam em linfócitos T citotóxicos que produzem moléculas capazes de destruir células que expressam peptídeos derivados de antígenos citosólicos por meio da exocitose dos grânulos que libera perforina e granzimas e dão início às vias de morte celular (CHAPLIN, 2010; BONILLA & OETTGEN, 2010; ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015).

Figura 3 - Maturação das células linfoides T.



As células T imaturas migram para o timo onde passam por processos de proliferação, seleção e diferenciação, tornam-se maduras e exercem suas funções no sangue periférico. Fonte: A AUTORA.

### 3.3 NEOPLASIAS LINFOIDES

As neoplasias de células linfoides são neoplasias hematológicas caracterizadas por uma expansão clonal de células linfoides maduras ou imaturas, que pode ocorrer em vários estágios de diferenciação. A ocorrência de alterações genéticas pode resultar em erros em alguma etapa do processo de maturação das células linfoides e, conseqüentemente, no desenvolvimento de uma neoplasia. Geralmente, as características morfológicas e imunofenotípicas são suficientes para a realização do diagnóstico da maioria das neoplasias linfoides, pois as células neoplásicas mimetizam os estágios de diferenciação de células normais e, por isso, podem ser classificadas de acordo com o estágio maturativo correspondente. No entanto, algumas doenças podem apresentar perda de marcadores específicos ou expressão anômala de antígenos de outras linhagens, o que dificulta a sua classificação. Além disso, nenhum marcador antigênico é considerado específico para certo tipo de neoplasia, por isso, para o diagnóstico, é necessária a utilização de um painel contendo anticorpos capazes de reconhecer os diferentes antígenos (SWERDLOW et al, 2017).

A classificação de tumores hematopoiéticos e de tecidos linfoides, estabelecida pela OMS, representa um consenso mundial para o diagnóstico dessas doenças. Essa classificação foi publicada no ano de 2001, atualizada em 2008, e em 2016 e se tornou disponível em forma de livro impresso em 2017. É baseada no reconhecimento de neoplasias distintas de acordo com a combinação de aspectos morfológicos, imunofenotípicos, genéticos, moleculares e clínicos. As neoplasias de células imaturas podem ser subdivididas em linfoma/leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B), linfoma/leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T) e linfoma/leucemia linfoblástica aguda de células NK (Figura 4). O termo linfoma deve ser utilizado apenas quando a doença está presente na forma de massa tumoral e não apresenta ou apresenta mínimo envolvimento do SP e da MO, caso contrário, o termo apropriado é somente leucemia linfoblástica aguda (LLA). A LLA-B pode ser subdividida em LLA-B não especificada e LLA-B com anormalidades genéticas recorrentes, que incluem o achado de translocações, como a t(9;22)(q34.1;q11.2) BCR/ABL1, e anormalidades no número de cromossomos (BOROWITZ et al, 2017 a). A LLA-T será abordada mais adiante por ser foco do presente estudo, e a LLA de células NK é uma doença rara e de difícil diagnóstico (BOROWITZ et al, 2017 b; SWERDLOW et al, 2017). A revisão de 2016 da classificação de

neoplasias linfoides da OMS inclui novas entidades, juntamente com uma definição mais clara dos subtipos provisórios e definitivos com base na melhor compreensão dos fatores moleculares dos linfomas (SWERDLOW et al, 2017).

As neoplasias de células linfoides maduras (NCLM) podem ser divididas em neoplasias de células linfoides B maduras (NCLM-B), neoplasias de células linfoides T/NK maduras (NCLM-T/NK), linfoma de Hodgkin (LH) e doenças linfoproliferativas associadas à imunodeficiência (DLAI) como desordens linfoproliferativas pós-transplante (Figura 4). As NCLM-B abrangem os linfomas de células B (LCB) e as neoplasias de células plasmocitárias (NCP), e distingue mais de 30 subtipos de neoplasias, incluindo o linfoma de Burkitt na categoria dos LCB. Os LCB representam um grupo bastante heterogêneo de neoplasias com diferentes comportamentos clínicos e características patológicas e epidemiológicas, que comumente têm origem nos linfonodos, mas podem ocorrer em praticamente todos os tecidos do corpo (sítios extranodais). As neoplasias de células T e NK estão classificadas no mesmo grupo por apresentarem características funcionais e imunofenotípicas semelhantes (SHANKLAND et al, 2012; LYNCH, GRATZINGER & ADVANI, 2017; SWERDLOW et al, 2017).

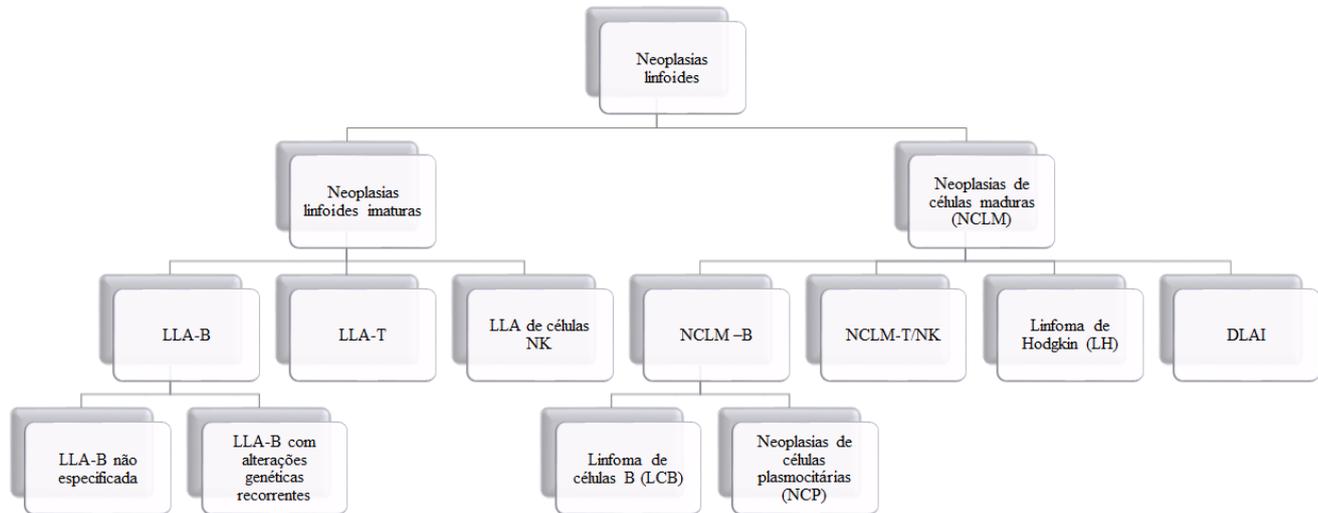
O presente trabalho terá como foco a LLA-T, uma neoplasia de células T imaturas, e o linfoma de Burkitt, uma NCLM-B, por se tratarem de doenças que apresentam alta agressividade e altos índices de recidiva e de progressão da doença.

### **3.3.1 Leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T)**

A LLA-T é uma neoplasia hematológica agressiva que se origina a partir da transformação maligna de células T precursoras em diferentes estágios de desenvolvimento, e compreende cerca de 15% dos casos de LLAs em crianças e 25% em adultos (DURINCK et al, 2015; GIRARDI et al, 2017). Ao diagnóstico há o acometimento da MO e/ou do SP (> 25% de blastos leucêmicos) e pode apresentar o timo como sítio de envolvimento primário, além de sítios nodais ou extranodais, como a pele, fígado, tonsilas, baço e sistema nervoso central (SNC).

Geralmente está associada à leucocitose, presença de massa mediastinal ou em outro tecido, linfadenomegalia e hepatosplenomegalia (BOROWITZ et al, 2017 c).

Figura 4 - Fluxograma da classificação das neoplasias de células linfóides de acordo com a classificação da OMS de 2016.



Fonte: Adaptado de SWERDLOW, 2017.

Nota: LLA: Linfoma/leucemia linfoblástica aguda, DLAI: Doenças linfoproliferativas associadas à imunodeficiência.

Quase todos os casos são caracterizados por um rearranjo clonal do TCR (PILOZZI, MULLER-HERMELINK & FALINI, 1999; SZCZEPANSKI, PONGERS-WILLEMSE & LANGERAK, 1999). Atualmente, com a análise do perfil genômico, é conhecida a maioria das alterações genéticas envolvidas na LLA-T, das quais as mais comuns são as mutações no receptor transmembrana Notch1 e na ligase de ubiquitina E3 FBXW7 (MOHARRAM, SHAH & KAZI, 2017).

Em geral, a classificação da LLA-T pode ser realizada utilizando-se a imunofenotipagem, que permite a diferenciação dos seguintes subtipos: LLA pró-T (cCD3+, CD7+ e CD34-/+), LLA pré-T (cCD3+, CD7+, CD34-/+ e CD2+), LLA T cortical (cCD3+, CD7+, CD34-/+, CD2+, CD1a+, CD4+ e CD8+) e LLA T medular (cCD3+, CD7+, CD34-/+, CD2+, sCD3+ e CD4+ ou CD8+) (RIZZATTI, 2013). Já foi observada correlação entre o estágio de diferenciação da célula T e o prognóstico da doença (WEISS, BINDL & PICOZZI, 1986). A LLA-T é considerada uma doença de alto risco por apresentar grandes chances de falência na terapia de indução, altas taxas de recidiva e infiltração no SNC (BASSAN et al, 2004; BOROWITZ et al, 2017 c).

Na revisão de 2016 realizada pela OMS, uma nova entidade de neoplasia de células T precursoras foi identificada e denominada LLA-T de células precursoras iniciais (do inglês, *Early T-cell precursor lymphoblastic leukaemia*) a qual é originada pela proliferação neoplásica de tímócitos em fases iniciais de diferenciação ou precursores de linhagem T da MO, que ainda não estão comprometidos de forma irreversível com a linhagem T e, por isso, mantêm o potencial de diferenciação para a linhagem mieloide/dendrítica. Trata-se de um subtipo raro e extremamente agressivo da doença que pode apresentar a expressão de marcadores mieloides como o CD117, CD13 e/ou CD33 (BOROWITZ et al, 2017 c; IACOBUCCI & MULLIGHAN, 2017).

### **3.3.2 Linfoma de Burkitt (LB)**

O LB é uma doença altamente agressiva que pode se apresentar na forma extranodal ou de leucemia aguda e representa de 1 a 2% de todos os linfomas (LEONCINI et al, 2017). Foi descrito por Denis Burkitt, em 1958, em crianças africanas que apresentavam massas tumorais na face que comprometiam os ramos mandibulares (DUNLEAVY, LITTLE, WILSON, 2016). De acordo com a OMS, existem três variantes clínicas dessa doença, as quais são reconhecidas pelas suas características biológicas, clínicas e epidemiológicas. A primeira é a forma endêmica

que ocorre na África equatorial, acomete principalmente crianças e apresenta distribuição geográfica como a da malária endêmica; a segunda é a forma esporádica; e a última, a forma associada à imunodeficiência que está relacionada à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (DUNLEAVY, LITTLE, WILSON, 2016; LEONCINI et al, 2017). O LB é considerado uma doença definidora da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) e, ao contrário de outras doenças linfoproliferativas associadas ao HIV, não apresenta relação direta com baixas contagens de células T CD4+ (PEREIRA & LAGE, 2013).

O LB caracteriza-se pela rápida proliferação celular e também pelas altas taxas de apoptose. A hiperexpressão da proteína MYC, decorrente das translocações envolvendo o gene *MYC* localizado no cromossomo 8, representadas pela t(8;14) e suas variantes, são comuns no LB, porém não são patognomônicas. O vírus Epstein-Barr (EBV) está presente em todos os casos de LB endêmico e em cerca de 25 a 40% das outras formas. O EBV apresenta papel fundamental na patogênese da doença devido à capacidade de gerar uma instabilidade genética que predispõe a um maior risco de recombinações do gene *MYC* e, conseqüentemente, à hiperexpressão da proteína MYC. Essa proteína ativa a transcrição de proteínas envolvidas na formação do LB, pois é essencial para o desenvolvimento das células B da MO e é responsável pelo controle de várias funções celulares como proliferação, ciclo celular, sobrevivência, metabolismo, biossíntese, adesão e função mitocondrial (THORLEY-LAWSON & ALLDAY, 2008; ROWE, FITZSIMMONS & BELL, 2014; NGUYEN, PAPPENHAUSEN, SHAO, 2017). Nos últimos anos, a compreensão da biologia do LB avançou significativamente com a identificação de novas mutações que cooperam com o *MYC* como as mutações nos genes *ID3*, *TCF3* e *CCND* (DUNLEAVY, LITTLE, WILSON, 2016).

### 3.4 TRATAMENTO DE NEOPLASIAS LINFOIDES

A escolha terapêutica atual é baseada em características histológicas e fenotípicas das células neoplásicas, estágio da doença no momento do diagnóstico, idade do paciente e presença de comorbidades associadas (SALLES et al, 2017). Atualmente, é crescente a compreensão da fisiopatologia e dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas neoplasias hematológicas e existem promissores agentes em desenvolvimento clínico para o seu tratamento, como os inibidores de

Bcl-2, fármacos conjugados a anticorpos monoclonais específicos e células T com receptor de antígeno quimérico (YOUNES et al, 2017).

O regime de tratamento da LLA-T é constituído de quimioterapia de altas doses formada por uma combinação de fármacos citotóxicos administrados de forma sistêmica, a qual se baseia no potencial sinérgico ou aditivo de dois ou mais compostos com o objetivo de aumentar a eficácia terapêutica. O tratamento quimioterápico inclui fármacos como daunorubicina, vincristina, L-asparaginase, prednisona, metotrexato, ciclofosfamida, citarabina e 6-mercaptopurina, e é dividido em três fases que compreendem a fase de indução, a terapia de consolidação e a manutenção, a qual pode ser seguida de transplante de células-tronco hematopoiéticas (VASEKAR et al, 2016; FUSO et al, 2016).

A fase de indução tem como objetivo alcançar a remissão completa, a qual é definida por critérios morfológicos (menos de 5% de blastos na MO e restauração da hematopoiese normal com ausência de células leucêmicas no SP) e clínicos e, mais recentemente, pela avaliação da doença residual mensurável por técnicas moleculares. Essas técnicas incluem citometria de fluxo (CF) multiparamétrica (6 a 10 cores) e reação em cadeia da polimerase quantitativa e apresentam sensibilidade de  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ , respectivamente, na identificação de células neoplásicas. Além disso, técnicas atuais como o sequenciamento de última geração são capazes de identificar células neoplásicas com sensibilidade de  $10^{-6}$  (CHEN & WOOD, 2017; SHORT & JABBOUR, 2017).

A segunda fase, chamada de consolidação, tem o propósito de manter a remissão e de eliminar as células neoplásicas residuais que possam levar o paciente à recidiva. A fase de manutenção, que pode durar de um a dois anos, tem como objetivo reforçar o efeito alcançado nas fases anteriores e prevenir recidivas. Deve-se realizar também a profilaxia e/ou tratamento do SNC com altas doses de quimioterapia sistêmica e/ou intratecal (BASSAN et al, 2004; CORNELL & PALMER, 2012).

Recentemente, com a utilização de técnicas genômicas, foi possível o estudo da biologia da LLA-T e detectou-se alterações em várias vias como a Notch, Jak/Stat, PI3K/Akt/mTOR e MAPK e, apesar dos avanços nos estudos de novos fármacos para o tratamento de LLAs, como os inibidores da via PI3K/mTOR, a terapia padrão continua sendo amplamente utilizada (RAETZ & TEACHEY, 2016). Infelizmente, com os regimes quimioterápicos convencionais, os pacientes apresentam severos efeitos adversos devido à falta de especificidade dos fármacos disponíveis para células tumorais e, ainda, cerca de 15% das crianças e 40% dos adultos com LLA-T apresentam recidiva em função da aquisição

de resistência aos medicamentos utilizados (DURINCK et al, 2015; TERWILLIGER & ABDUL-HAY, 2017).

Os protocolos de tratamento mais utilizados para o LB são combinações elaboradas de altas doses de quimioterápicos contendo fármacos como etoposido, prednisona, ciclofosfamida, vincristina, doxorrubicina, dexametasona, ifosfamida, metotrexato e citarabina, além do rituximabe (DUNLEAVY, LITTLE, WILSON, 2016). Esses agentes são administrados em uma variedade de combinações e cronogramas que dependem do estágio da doença no momento do diagnóstico, o que reflete a natureza empírica das combinações. Devido à frequência relativamente baixa do LB e à escassez de ensaios clínicos, a abordagem terapêutica ideal é controversa, particularmente em adultos, nos quais a toxicidade é um desafio significativo. Como o LB é um linfoma comum em crianças, muitas das abordagens comumente utilizadas em adultos foram inicialmente desenvolvidas em populações pediátricas. Assim, um dos maiores desafios da terapia padrão para o LB é a toxicidade, pois embora crianças e adultos jovens possam tolerar abordagens agressivas usadas para a doença em estágio avançado, esse não é o caso de adultos mais idosos ou imunossuprimidos e, por isso, a mortalidade relacionada ao tratamento é bastante alta (WILDES et al, 2014; DUNLEAVY, LITTLE, WILSON, 2016).

Assim como nos casos de LLAs, deve-se ter atenção constante com relação à profilaxia para evitar a infiltração da doença no SNC e deve-se realizar um manejo terapêutico a fim de evitar a síndrome de lise tumoral (PERKINS & FRIEDBERG, 2008). Além disso, na literatura, descreve-se que o LB é uma doença agressiva e potencialmente curável quando são administradas altas doses de quimioterapia, com uma taxa de cura de até 90% para pacientes que tiveram o diagnóstico realizado em estágios iniciais e, entre 60 e 80% para pacientes diagnosticados em estágios avançados (LEONCINI et al, 2017; DUNLEAVY, LITTLE, WILSON, 2016). No entanto, um estudo realizado recentemente com os pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Universitário (HU) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) demonstrou que os pacientes portadores de LB apresentaram altos índices de recidiva/progressão da doença (83,3% dos casos) e uma sobrevida global de apenas 7,9 meses (CARDOSO, 2015).

Por fim, é sabido que a quimioterapia com fármacos citotóxicos tem como alvo inibir a proliferação celular, promover a morte e/ou induzir a diferenciação das células neoplásicas, porém as mesmas podem adquirir resistência aos medicamentos utilizados. Essa resistência pode estar relacionada à expressão de proteínas de resistência a múltiplos fármacos,

as quais promovem o efluxo de uma grande variedade de substratos químicos ou fármacos a partir da célula (RUMJANEK, VIDAL, MAIA, 2013). Sabe-se que a resistência gerada nessas células é multifatorial e pode estar relacionada ao mecanismo de resistência citado anteriormente, o qual se associa à expressão de proteínas que promovem o efluxo de substâncias do interior da célula (PASQUIER & KAVALLARIS, 2008; LANCET & KARP, 2010). Além disso, há registros de efeitos citoprotetores presentes nas células tumorais, como, por exemplo, o aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas, como a proteína survivina, e a expressão de proteínas inibidoras das vias de morte celular (PARK et al, 2011; ZHANG et al, 2015). Outros mecanismos envolvidos na resistência a quimioterapia estão relacionados a distúrbios no ciclo celular (ZHANG et al, 2015; WIMAN & ZHIVOTOVSKY, 2017).

Dessa forma, mesmo com centenas de novos agentes em fase de avaliação pré-clínica e clínica para o tratamento do câncer, a taxa de falha dos processos de desenvolvimento de medicamentos permanece alta. A maioria dos novos agentes não obtém sucesso devido a toxicidades inaceitáveis ou falta de eficácia antitumoral (YOUNES et al, 2017). Além disso, em função das frequentes recidivas e da elevada morbidade dos quimioterápicos disponíveis atualmente, a busca por novos compostos antineoplásicos que tenham maior eficiência em induzir a morte nas células tumorais de forma seletiva, com o mínimo de efeitos adversos para o paciente, é um grande alvo de investigação da indústria farmacêutica e da comunidade científica.

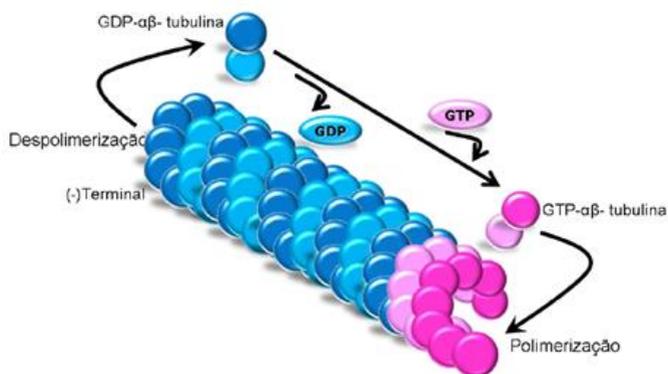
### 3.5 NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS

A química medicinal é de grande importância, pois permite o planejamento e o desenho de novos compostos que possuam propriedades farmacoterapêuticas úteis para se tornarem novos fármacos antitumorais, além de permitir a elucidação das relações estrutura-atividade (IMMING, 2008). Além disso, a química de produtos naturais está diretamente ligada à química medicinal, pois as substâncias ativas de plantas com atividades biológicas que antigamente eram apenas identificadas e isoladas podem, com o avanço da ciência, ser sintetizadas para que haja melhores rendimentos do composto de interesse (SENS, 2018).

### 3.5.1 Análogos sintéticos que contêm o grupo 3,4,5-trimetoxifenila

Os microtúbulos são componentes do citoesqueleto celular que auxiliam no desempenho de várias funções celulares como o transporte intracelular, a manutenção da forma da célula, a polaridade, a sinalização celular e a mitose. Durante a divisão celular eles permitem a formação do fuso mitótico e, dessa forma, podem ser utilizados como alvo para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos (PEREZ, 2009). Trata-se de polímeros não covalentes em forma de tubo filamentososo constituídos por heterodímeros de  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina nos quais uma extremidade é cercada de  $\alpha$ -tubulina e a outra de  $\beta$ -tubulina, gerando um polo positivo e outro negativo. Cada subunidade contém um trifosfato de guanosina, que é estável quando ligado à  $\alpha$ -tubulina e instável quando ligado à  $\beta$ -tubulina, o qual pode ser hidrolisado a difosfato de guanosina após a polimerização. O equilíbrio entre a ligação ao trifosfato de guanosina e os eventos de hidrólise asseguram a rápida montagem e desmontagem dos microtúbulos durante o alinhamento e separação dos cromossomos na divisão celular. A dinâmica é definida por fases de polimerização e despolimerização (Figura 5) e a interrupção dessa dinâmica causada por compostos que inibem a mitose impede a progressão do ciclo celular com parada na fase G2/M, o que resulta em morte celular por apoptose (PASQUIER & KAVALLARIS, 2008; PEREZ, 2009).

Figura 5 - Dinâmica dos microtúbulos.

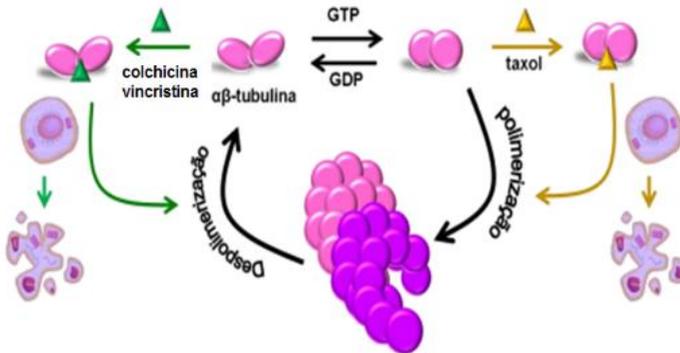


Os processos de polimerização e despolimerização dos microtúbulos devem estar em equilíbrio. Fonte: SALUM, 2011.

Nota: GTP: trifosfato de guanosina; GDP: difosfato de guanosina.

Conforme demonstrado na Figura 6, os inibidores de microtúbulos podem ser classificados como agentes estabilizantes como o taxol, que têm sua ação baseada na promoção da polimerização da tubulina e aumentam a quantidade de microtúbulos no interior da célula, ou como agentes desestabilizantes, como a colchicina e os alcaloides da vinca, que promovem a despolimerização e diminuem a quantidade de microtúbulos na célula. A colchicina liga-se ao heterodímero na interface entre as  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulinas, em um local adjacente ao sítio de ligação ao trifosfato de guanossina na  $\alpha$ -tubulina. Essa ligação pode desencadear uma alteração na estrutura secundária da proteína, o que leva à despolarização dos microtúbulos. Já os alcaloides da vinca apresentam o mecanismo de ação baseado no bloqueio da divisão celular por meio da ligação à  $\beta$ -tubulina (PASQUIER & KAVALLARIS, 2008; PEREZ, 2009; FREZZATO et al, 2014; ISSHIKI et al, 2015).

Figura 6 - Atividade antimitótica dos compostos desestabilizantes e estabilizantes dos microtúbulos.



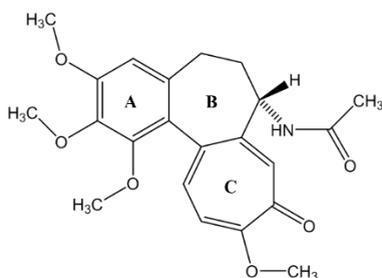
Efeitos provocados por agentes estabilizantes e desestabilizantes que geram um desequilíbrio na formação dos microtúbulos e culminam em morte celular. Fonte: Adaptado de SALUM, 2011.

Nota: GTP: trifosfato de guanossina; GDP: guanossina difosfato.

Como mencionado, a colchicina (Figura 7) interfere na dinâmica dos microtúbulos e apresenta alta capacidade antiproliferativa, no entanto, sua eficácia é limitada devido à elevada toxicidade e a baixas solubilidade e biodisponibilidade (SALUM, 2011; BANERJEE et al, 2018). Dessa forma, o desenho de novos agentes antitumorais utilizando esse protótipo

natural é uma ferramenta útil na pesquisa de novos fármacos para o tratamento do câncer (RISINGER, GILES & MOOBERRY, 2009). Com base na colchicina, foram desenvolvidas diversas novas estruturas que são descritas na literatura por apresentarem atividade antiproliferativa (DUCKI et al, 2009; LEON-GONZALEZ et al, 2015; FU et al, 2018) e citotoxicidade sobre células K562, linhagem de leucemia mieloide aguda (LMA) e células Jurkat, de LLA-T (LAWRENCE et al, 2006; PEDRINI et al, 2010; MAIORAL et al, 2013; MAIORAL et al, 2016; MAIORAL et al, 2017).

Figura 7 - Estrutura química da colchicina.



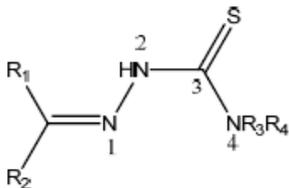
Fonte: A AUTORA.

Devido a isso, neste trabalho foi avaliado o efeito citotóxico de análogos sintéticos que contêm o grupo 3,4,5-trimetoxifenila em sua estrutura sobre células de neoplasias linfoides. A colchicina foi utilizada como protótipo para a síntese desses compostos, visto que é composta por três anéis aromáticos, dos quais o anel A apresenta o grupo 3,4,5-trimetoxifenila, o qual é responsável pela sua atividade biológica (FOURNIER-DIT-CHABERT et al, 2012).

### 3.5.2 Derivados de Tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas são compostos orgânicos que podem ser consideradas bases de Schiff (grupo funcional que contém uma ligação dupla entre carbono e nitrogênio conectado a um grupo aril ou alquil) e cuja estrutura química geral e numeração segundo a IUPAC (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) podem ser observados na Figura 8. Essa classe de compostos apresenta baixo custo de síntese e pode gerar diferentes análogos pelas substituições na posição N1 e N4 (TENÓRIO et al, 2005; LOBANA et al, 2010).

Figura 8 - Estrutura química geral das tiossemicarbazonas.



Fonte: A AUTORA.

Nota: R1, R2, R3 e R4 = H, alquil ou aril.

As tiossemicarbazonas apresentam diversas propriedades biológicas, dentre as quais se destacam o efeito antiproliferativo e citotóxico em células de neoplasias hematológicas (SILVA et al, 2010; DE OLIVEIRA et al, 2015; PERONDI, 2018). Os efeitos antiproliferativos induzidos por tiossemicarbazonas em células neoplásicas têm sido explicados pela inibição das enzimas ribonucleotídeo redutase e topoisomerase II envolvidas na síntese e replicação do DNA (ácido desoxirribonucleotídeo) (LIU, LIN, SARTORELLI, 1992; FEUN et al, 2002; BISCEGLIE et al, 2015). Essa classe de compostos também é conhecida por apresentar propriedades para a formação de complexos organometálicos (WEST et al, 1993; TENÓRIO et al, 2005; YU et al, 2009) que apresentam propriedades farmacológicas (LIBERTA; WEST, 1992; MISHRA et al, 2006; FERRAZ et al, 2009; BISCEGLIE et al, 2015; STEFANI et al, 2015). Ferraz e colaboradores (2009) demonstraram efeitos citotóxicos desses compostos complexados com paládio em células de leucemia promielocítica aguda (HL-60) e de LLA-T (Jurkat). Outras propriedades atribuídas às tiossemicarbazonas estão descritas no Quadro 1.

### 3.5.3 Compostos naturais

Muitos fármacos usados atualmente são produtos naturais ou foram inspirados pela natureza (HARVEY, 2008; COSTA-LOTUFO, WILKE & JIMENEZ, 2009). Entre os antitumorais de origem vegetal, pode-se citar a vincristina, que foi isolada da *Catharanthus roseus* L. e, conforme já citado, é um agente antimitótico de grande utilidade para o tratamento de leucemias e linfomas (BRANDÃO, 2010; MOUDI et al, 2013).

Quadro 1 - Efeitos *in vitro* das tiossemicarbazonas descritos na literatura.

EFEITO	REFERÊNCIA
Antiprotozoário	BHARTI et al, 2002
Antiviral	TEITZ et al, 1994; GENOVA et al, 2004
Antiproliferativo Citotóxico Antitumoral	PALENIK, RENDLE, CARTER, 1974; LEMKE et al, 1977; FEUN et al, 2002; SILVA et al, 2010; SERDA et al, 2012; PALANIMUTHU et al, 2013; DE OLIVEIRA et al, 2015
Antimicrobiana	PANDEYA et al, 1999; KASUGA et al, 2003; DE AQUINO et al, 2008
Leishmanicida	DE MELOS et al, 2015
Antiparasitária	ESPINDOLA et al, 2015
Antituberculose	OLIVEIRA et al, 2014

Outra descoberta importante para o tratamento do câncer foi a podofilotoxina, que foi extraída da *Podophyllum peltatum* L. e permitiu a síntese do etoposido, que é utilizado no tratamento de leucemias agudas e linfomas e tem o seu mecanismo de ação baseado na inibição da enzima topoisomerase II (BRANDÃO, 2010; EZOE, 2012). Além dos antitumorais de origem vegetal, podem-se citar aqueles de microrganismos, como é o caso das antraciclinas, que são provenientes de *Streptomyces*. A partir dessa bactéria, pode-se isolar a daunorrubicina e, consequentemente, sintetizar a doxorrubicina, ambas utilizadas no tratamento de neoplasias hematológicas por inibir a síntese de DNA (SZWED, 2014).

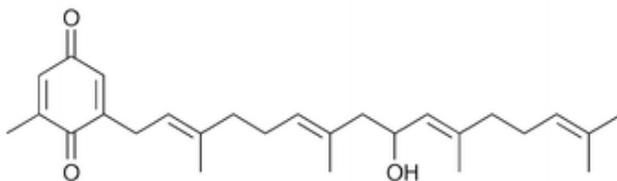
Os organismos terrestres, como microrganismos e plantas, são responsáveis por quase a totalidade das substâncias disponíveis na atualidade; enquanto que os organismos marinhos, apesar de promissores, passaram a ser investigados de maneira sistemática apenas recentemente (NEWMAN & CRAGG, 2006; HARVEY, 2008; COSTA-LOTUFO, WILKE & JIMENEZ, 2009; NEWMAN & CRAGG, 2016). Sabe-se que os ecossistemas marinhos apresentam ampla biodiversidade, com potencial biotecnológico associado praticamente ilimitado e a medicina moderna tem encontrado no oceano uma vasta fonte de compostos com importante potencial terapêutico (NEWMAN & CRAGG, 2007; NEWMAN & CRAGG, 2016). O primeiro exemplo é o ara-C, um análogo sintético dos nucleosídeos esponouridina e espongotimidina extraídos da esponja *Tethya crypta*, que apresenta atividade antitumoral devido à sua incorporação ao DNA durante a replicação, o que leva à

inibição do processo de síntese e, conseqüente, ao bloqueio da proliferação. Ara-C é usada principalmente na terapia de leucemias mieloides e linfoides e é utilizada com o nome de citarabina (KONUMA et al, 2015).

Nesse contexto, o presente trabalho avaliou também a atividade citotóxica do composto natural extraído da *Desmarestia menziesii*, uma alga parda da classe Phaeophyceae e da família Desmarestiaceae (ALGAEBASE, 2018), a qual foi coletada na Ilha do Rei George, no continente Antártico. Trata-se de uma plastoquinona (RIVERA & PODESTA, 1990) chamada de 9-hidroxisargaquinona que foi denominada, no laboratório, como API (Figura 9).

As plastoquinonas desempenham função como transportadoras de elétrons na cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese e participam da biossíntese e metabolismo de importantes compostos químicos. Além disso, atuam como antioxidantes e regulam a expressão gênica e a transdução de sinal celular (LIU & LU, 2016). Em um estudo prévio, foi demonstrada a atividade citotóxica das plastoquinonas sobre células de linhagem de adenocarcinoma de cólon (26-L5) (MORI et al, 2005) mas, até o momento, não foram encontrados estudos em células de neoplasias hematológicas humanas.

Figura 9 - Estrutura do composto API (9-hidroxisargaquinona).



Fonte: A AUTORA.

### 3.6 REGULAÇÃO DE MORTE CELULAR

As células são capazes de monitorar constantemente as suas condições endógenas e exógenas a fim de manter a homeostase, a qual é resultado de um equilíbrio entre proliferação, diferenciação e morte celular. Dessa forma, fatores como disponibilidade de oxigênio e nutrientes, integridade genômica e balanço das vias de regulação celular devem estar controlados. No caso da detecção de danos ou mau funcionamento em alguma das etapas, sistemas intracelulares

determinarão se a proliferação celular deve pausar e reparar as vias alteradas para levar à restauração da homeostase ou se as células devem ativar vias de sinalização que desencadeiam uma morte celular regulada (MCR) que, em situações fisiológicas, é denominada morte celular programada (GALLUZI et al, 2018).

Sabe-se que em processos malignos ocorre a perda da homeostase e as células passam a se dividir mais rapidamente do que elas morrem. Isso pode ocorrer devido à presença de alterações genéticas que desencadeiam a inativação de genes reguladores ou à expressão desregulada de proteínas que conduzem à proliferação descontrolada de uma célula e a imortalidade da mesma (FESIK, 2005; HEJMADI, 2010; GALLUZI et al, 2018). Assim, o objetivo de novos agentes quimioterápicos é provocar alterações nas células neoplásicas que gerem estresse e que culminem em dano ao DNA. Dessa forma, as próprias células podem sofrer um processo de morte induzido por um mecanismo rigorosamente controlado que pode sofrer modulação farmacológica ou genética (BOSE & GRANT, 2015; GALLUZI et al, 2018). O entendimento dos mecanismos de morte celular é fundamental para identificação de novos alvos na terapia antitumoral e, dentre os diversos tipos de MCR, a apoptose é a mais bem estudada na literatura (HUNTER; LACASSE; KORNELUK, 2007; LI & DEWSON, 2015).

Atualmente, está bem determinado que a apoptose não é o único mecanismo de MCR envolvido na eliminação de células malignas. A morte celular dependente de autofagia também é um tipo comum de MCR, a qual envolve a degradação e a reciclagem de organelas citoplasmáticas e de proteínas. Além disso, mais recentemente tem-se estudado a morte celular imunogênica, a qual é uma forma de MCR capaz de ativar uma resposta imune adaptativa específica para antígenos endógenos ou exógenos expressos pelas células que estão em processo de morte. Esse tipo de morte celular exibe as principais características bioquímicas da apoptose, mas apresenta características comuns a estímulos imunogênicos indutores de apoptose como a indução de estresse ao retículo endoplasmático (RE). O Comitê de Nomenclatura em Morte Celular classificou, de acordo com os aspectos morfológicos, genéticos, farmacológicos, bioquímicos e funcionais, as formas de morte celular como: apoptose intrínseca, apoptose extrínseca, necrose de transição de permeabilidade mitocondrial, necroptose, ferroptose, piroptose, *parthanatos*, entose, netose, morte celular dependente de lisossomos, morte celular dependente de autofagia, morte celular imunogênica, além de processos não letais como senescência celular e

catástrofe mitótica (KATSUYA; SATOSHI; HIROYASU, 2009; HASSAN, 2014; ZHANG et al, 2015; GALLUZZI, et al, 2018).

### 3.6.1 Modulação e bloqueio do ciclo na regulação celular

O ciclo celular é composto por uma sequência de eventos que permitem que uma célula duplique seu conteúdo genético e se divida em duas células filhas geneticamente idênticas. Ele compreende a interfase, que consiste nas fases G1, S e G2, e a fase mitótica (M) (Figura 10). Durante a interfase, a célula se prepara para a divisão por meio do crescimento e da replicação do DNA. A fase G1 é o intervalo entre o fim da citocinese (separação das duas células filhas) de uma divisão anterior e o início da fase S, e é a fase em que ocorre aumento do volume celular, condensação dos cromossomos e síntese de proteínas. Além disso, é a fase que determina se uma célula vai se dividir novamente ou entrar na fase G0 ou quiescência, dependendo da disponibilidade de fatores de crescimento no início da fase G1. Durante a fase S, a replicação do DNA ocorre e cada cromossomo é duplicado, tornando-se duas cromátides irmãs. Após a replicação, inicia-se a fase G2, durante a qual a célula sintetiza componentes necessários para a mitose, como RNA e proteínas. A fase M, por sua vez, é subdividida em cinco fases: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase, e termina em citocinese (ZARITSKY; WOLDRINGH, 2015; WENZEL & SINGH, 2018).

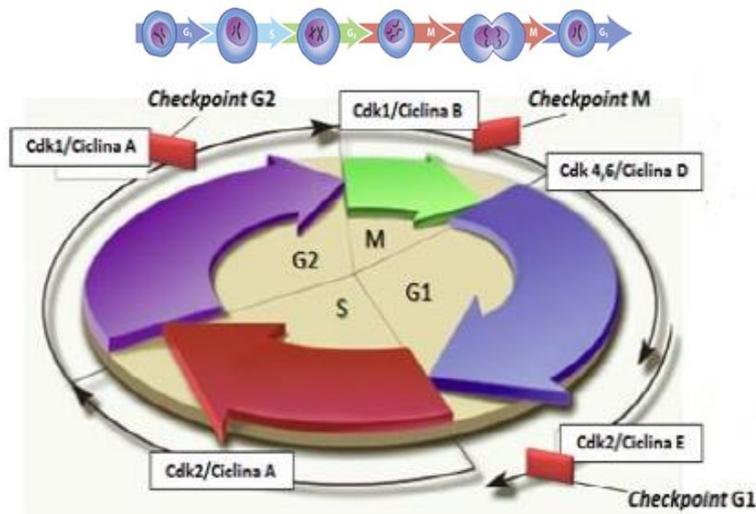
Os mecanismos pelos quais a célula bloqueia de forma ativa o ciclo celular são denominados *checkpoints* ou pontos de checagem do ciclo celular. Esses bloqueios têm o objetivo de monitorar e responder a distúrbios celulares impedindo a progressão de células alteradas até que os erros sejam reparados de forma adequada antes do avanço para a próxima fase do ciclo ou até a promoção da apoptose. São reconhecidos três principais pontos de bloqueio: na fase G1, antes de a célula entrar na fase S do ciclo; G2, antes de a célula entrar em mitose; e durante a metáfase, impedindo a ligação dos cromossomos aos microtúbulos (WIMAN & ZHIVOTOVSKY, 2017).

Sabe-se que as células neoplásicas não são capazes de finalizar o ciclo de replicação celular de forma normal, ou seja, não retornam à fase G0 e passam diretamente da mitose para uma nova fase G1. Muitas proteínas estão envolvidas em sua regulação, como as ciclinas e cinases dependentes de ciclinas (CDKs), além de oncogenes, genes supressores de tumor e proteínas *checkpoint*. Mutações em qualquer um desses mecanismos regulatórios podem levar à proliferação de células que

transportam mutações genéticas ou a um número anormal de cromossomos, o que resulta em instabilidade genômica e no desenvolvimento de neoplasias, além de afetarem significativamente a eficácia das terapias antitumorais (WIMAN; ZHIVOTOVSKY, 2017; WENZEL & SINGH, 2018).

Os *checkpoints* e, conseqüentemente, a progressão do ciclo celular, são controlados, principalmente, pelas CDKs que interagem com ciclinas específicas e promovem a ativação das cinases, as quais, por sua vez, fosforilam uma série de substratos-chave que permitem a progressão de uma fase para outra do ciclo celular (Figura 10) (ZARITSKY & WOLDRINGH, 2015). Quando são identificados erros no processo de replicação celular, o ciclo celular pode ser inibido pela formação de complexos estáveis entre as CDKs e um grupo de proteínas denominadas de inibidores de CDK, as quais impedem que as CDKs se liguem às suas respectivas ciclinas até que o reparo do DNA esteja completo e a progressão do ciclo celular possa continuar de forma adequada (HOCHEGGER, TAKEDA & HUNT, 2008; BONELLI et al, 2014; WENZEL & SINGH, 2018).

Figura 10 - Ciclo celular e seus mecanismos de regulação.



As fases do ciclo celular são representadas por G1, S, G2 e M. Os três principais bloqueios do ciclo celular são os pontos de checagem (*checkpoints*) das fases G1, G2 e M. Fonte: Adaptado de MAIORAL, 2013.

Uma das proteínas mais importantes relacionadas ao ciclo celular é a Ki-67, a qual é considerada um marcador de proliferação celular capaz de organizar e manter a arquitetura do DNA e a síntese de ribossomos durante a mitose (PATHMANATHAN & BALLEINE, 2013; DENKERT et al, 2015; YANG et al, 2018). Ela é detectada no núcleo das células somente durante as fases do ciclo celular e a mitose, e não é encontrada nas células quiescentes ou na fase G0 (YANG et al, 2018). A superexpressão de Ki-67 é observada em muitas neoplasias, incluindo as hematológicas, e sua detecção por imuno-histoquímica contribui para a avaliação do prognóstico em LCB (WANG & WANG, 2016).

### 3.6.2 Indução da apoptose na regulação celular

A apoptose é um processo fisiológico de morte celular que permite regular o número de células totais de um determinado tecido e eliminar células inviáveis ou com elevadas taxas de mutações genéticas. É um mecanismo essencial para diversos processos fisiológicos, incluindo a renovação das células normais, o desenvolvimento apropriado do organismo, o funcionamento do sistema imunológico e o desenvolvimento embrionário (HEJMADI, 2010). Nesse tipo de morte celular, as células mantêm a integridade da membrana plasmática e ocorre picnose devido à condensação da cromatina e redução do volume celular com consequente perda da aderência com a matriz extracelular. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção das mitocôndrias, que podem apresentar poros na sua membrana externa. Ocorre a formação de invaginações e pregas na membrana plasmática, denominadas *blebs*, o que culmina com a separação dos fragmentos celulares em corpos apoptóticos, os quais são fagocitados por células do sistema imune e degradados nos fagolisossomas (GOLDAR et al, 2015; GALLUZZI, et al, 2018). Outra característica importante da apoptose é a fragmentação do DNA, que ocorre pela ação de endonucleases ativas dependentes de caspases, as quais produzem fragmentos de tamanhos variáveis, múltiplos de cerca de 200 pares de base (SARASTE & PULKKI, 2000; ELMORE, 2007).

#### 3.6.2.1 Apoptose intrínseca

A apoptose intrínseca ou mitocondrial é uma forma de MCR controlada pelos membros da família Bcl-2 que se inicia devido a perturbações no microambiente intra ou extracelular, como a presença de

danos ao DNA, estresse do RE, sobrecarga de espécies reativas de oxigênio (EROs), alterações nos microtúbulos ou defeitos na mitose (Figura 11) (GALLUZI et al, 2018). Esse processo nem sempre é imunologicamente silencioso, como descrito anteriormente (YATIM, CULLEN & ALBERT, 2017).

A mitocôndria, além do seu papel no metabolismo energético, apresenta também uma importante relação na indução da apoptose intrínseca. Essa organela é composta por uma membrana interna e uma externa e o espaço entre as duas membranas é controlado pelo  $\Delta\Psi_m$ , que permite a troca de metabólitos entre a matriz e o citosol (SONG et al, 2015). A Figura 11 demonstra que danos nas mitocôndrias desencadeiam uma diminuição da capacidade de troca de metabólitos (perda do  $\Delta\Psi_m$ ), o extravasamento do seu conteúdo e a consequente liberação de proteínas apoptóticas, como AIF (fator indutor de apoptose), citocromo c, SMAC, endonuclease G e pró-caspase-9 (GOLDAR et al, 2015). A liberação desses fatores pela mitocôndria ocorre quando há um desequilíbrio entre a quantidade das proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xL e Bcl-w e das proteínas pró-apoptóticas Bax, Bak, Bid, Puma e Noxa (ADAMS, 2007; GALLUZZI et al, 2018).

O citocromo c, quando liberado da mitocôndria, liga-se à APAF-1 (fator-1 ativador de protease apoptótica), e esse complexo denominado apoptossoma, na presença de ATP, cliva a pró-caspase-9 em caspase-9 ativada, que por sua vez, ativa a caspase-3 (GOLDAR et al, 2015; GALLUZZI et al, 2018). O AIF e a endonuclease G atuam independentemente da ativação de caspases e, após serem liberadas no citoplasma, são translocadas para o núcleo onde induzem a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA (RIEDL, 2004). Já a proteína SMAC promove a apoptose por bloquear os inibidores endógenos das caspases (KIECHLE, 2002; FULDA, 2009). Dentre esses inibidores encontram-se os membros da família de proteínas inibidoras da apoptose que incluem a survivina, considerada uma proteína antiapoptótica devido à sua capacidade de inibir as caspases 9, 3 e 7. Essa proteína apresenta-se superexpressa na maioria das neoplasias humanas e pode estar envolvida na resistência ao tratamento (PARK et al, 2011).

Em resumo, a apoptose intrínseca é um tipo de MCR iniciada por alterações presentes no microambiente extracelular ou intracelular, caracterizada pela permeabilização da membrana externa mitocondrial e que culmina na ativação de caspases efetoras, como a caspase-3 (GALLUZZI et al, 2018).

### 3.6.2.2 Apoptose extrínseca

A apoptose extrínseca é um tipo de MCR que se inicia devido a perturbações no microambiente extracelular após a transmissão de sinais que ativam receptores localizados na membrana plasmática das células (Figura 11). Esses receptores transmembrana possuem um domínio citoplasmático (denominado de domínio de morte) para a propagação do sinal apoptótico, e um domínio extracelular, responsável pela ligação do receptor com seu ligante específico. Os receptores podem ser de dois tipos: receptores de morte (ativação dependente da ligação ao respectivo ligante) e receptores de dependência (ativação ocorre quando a concentração de seus ligantes específicos extracelulares está abaixo do valor basal) (GALLUZZI et al, 2018).

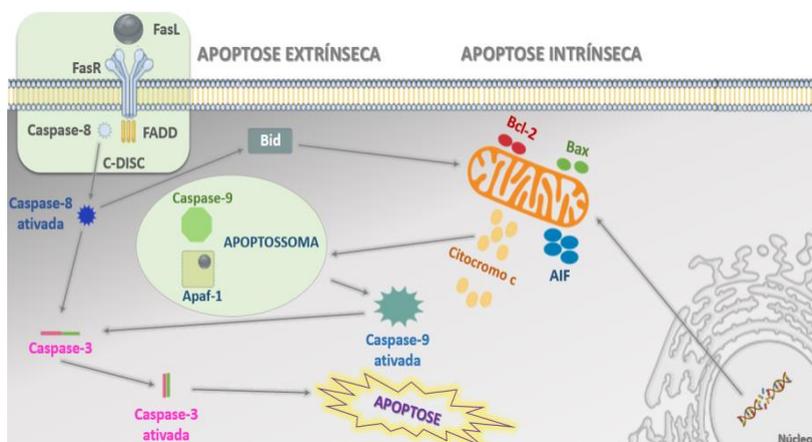
Os receptores de morte mais conhecidos são o FasR (Apo-1 ou CD95) e os pertencentes à família TNF (fator de necrose tumoral), tais como TNF-R, TRAIL-R (DR4 e DR5) e DR3 (Apo-2). Após ocorrer a ligação ao ligante específico, os receptores recrutam os domínios de morte (FADD - domínio de morte associado a Fas ou TRADD - domínio de morte associado a TNF) que, em combinação com as caspases iniciadoras 8 e 10, formam o complexo DISC (complexo sinalizador indutor de apoptose). O complexo DISC induz a clivagem da caspase-8 iniciadora e a liberação da sua forma ativa, caspase-8, a qual pode ativar diretamente as caspases efetoras 3 e 7, resultando em morte celular de forma totalmente independente da via mitocondrial (ELMORE, 2007; INDRAN et al, 2011; HASSAN, 2014; GOLDAR et al, 2015; VOLPE et al, 2016; GALLUZZI et al, 2018). A caspase-8 também é capaz de clivar a proteína pró-apoptótica Bid, membro da família Bcl-2, que leva a um aumento da permeabilidade mitocondrial e à liberação dos fatores pró-apoptóticos pela mitocôndria, além de amplificar a ativação da caspase-8 (ELMORE, 2007; GALLUZZI et al, 2018). A sinalização de receptores da morte, como o TNFR1, também pode levar à ativação do NFκB (fator de transcrição nuclear kappa B), o que pode resultar em sobrevivência celular associada a resposta inflamatória, pois esse fator de transcrição pode se ligar ao complexo DISC, modulando-o e inativando-o (HORN et al, 2017; GALLUZZI et al, 2018).

Os receptores de dependência são compostos de aproximadamente 20 membros, os quais permitem a rápida ativação das caspases executoras, em especial a caspase-3. O receptor DCC, quando ativo, interage com a proteína adaptadora citoplasmática DRAL para a formação do apoptossoma. Enquanto que o receptor UNC5B, na ausência

de seu ligante (neutrina-1), recruta um complexo de sinalização, resultando na desfosforilação de DAPK1 (proteína cinase associada a morte), a qual pode ativar diretamente as caspases executoras ou favorecer a permeabilidade da membrana mitocondrial (PORTER & DHAKSHINAMOORTHY, 2004; GALLUZZI et al, 2018).

Em resumo, a apoptose extrínseca é um tipo de MCR iniciada por alterações no microambiente extracelular detectadas por receptores de membrana plasmática, propagadas pela caspase-8, e que culmina na ativação de caspases executoras, principalmente a caspase-3 (GALLUZZI et al, 2018).

Figura 11- Mecanismos das apoptoses intrínseca e extrínseca.



Apoptose intrínseca ou mitocondrial e apoptose extrínseca ou ativada pelos receptores de morte, como o FasR. Fonte: A AUTORA.

Nota: AIF: Fator indutor de apoptose, APAF-1: Fator-1 ativador de protease apoptótica; DISC: Complexo sinalizador indutor de apoptose; FADD: Domínio de morte associado ao receptor Fas.

### 3.6.3 Vias de sinalização na regulação celular

A sinalização celular é uma rede de comunicação complexa em forma de cascata que controla as atividades biológicas das células. As células tumorais podem apresentar alterações genéticas que culminam na produção de proteínas alteradas e desencadeiam defeitos em várias vias de sinalização. Algumas vias são bem conhecidas por funcionarem de forma errônea nas células neoplásicas como as que controlam o ciclo

celular e a morte por apoptose, o que provoca proliferação celular descontrolada e formação de tumores (SARKAR et al, 2009).

A via do NF $\kappa$ B desempenha um papel importante no controle da proliferação celular, apoptose, inflamação, resposta ao estresse e em outros processos fisiológicos. É composta por um complexo de proteínas que pode ser formado a partir de homo ou heterodímeros das proteínas p50, p52, p65, c-Rel e Rel B e pode ser ativada por uma via clássica e/ou alternativa. Os dímeros p65/p50, em condições normais, permanecem no citoplasma celular na presença do inibidor de NF $\kappa$ B  $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ) e, quando há ativação da via clássica por receptores como BCR e TCR, o inibidor é degradado por um complexo I $\kappa$ B cinase. Na via alternativa, a ativação é dependente da formação do dímero formado pelas subunidades Rel B com p50 ou p52 após a degradação e que pode ser ativada por um número mais restrito de ligantes (KARIN, 1999; GASPARINI et al, 2014). Desligado do inibidor, o NF $\kappa$ B transloca-se ao núcleo da célula, onde se liga ao DNA e é capaz de regular a expressão gênica e permitir a tradução de proteínas antiapoptóticas (como Bcl-2 e survivina) (Figura 12), de invasão tecidual, de imortalização celular, reguladoras do ciclo celular (ciclina e MYC), de resposta ao estresse oxidativo, promotoras de vascularização, além de citocinas pró-inflamatórias e fatores de adesão. Dessa forma, ocorre uma modulação antiapoptótica, proliferativa, pró-invasiva, inflamatória e antioxidante que favorece o desenvolvimento de neoplasias e, por isso, acredita-se que a inibição do NF $\kappa$ B possa ser um mecanismo de sensibilização e/ou inativação de células neoplásicas (HOESEL & SCHMID, 2013; GASPARINI et al, 2014).

As células linfóides B e T exercem suas funções por meio da ativação das vias do NF $\kappa$ B para permitir o ótimo desempenho celular, e estudos já demonstraram a expressão constitutiva desse fator de transcrição em neoplasias hematológicas (KORDES et al, 2000; GASPARINI et al, 2014). Na LLA-T, é observada uma ativação constitutiva das vias do NF $\kappa$ B, o que garante a sobrevivência das células neoplásicas, pois ela inibe a apoptose e aumenta a proliferação celular. Isso ocorre, pois a LLA-T é caracterizada pela ativação de mutações de Notch1, a qual regula positivamente a expressão de algumas subunidades como o Rel B e ativa o complexo I $\kappa$ B cinase, que degrada o inibidor de NF $\kappa$ B (KORDES et al, 2000; VILIMAS et al, 2007; GASPARINI et al, 2014).

Ao contrário do que ocorre na maioria das neoplasias, o LB é caracterizado por uma atividade basal de NF $\kappa$ B muito baixa, o que sugere que o mesmo pode não estar relacionado ao desenvolvimento dessa doença. Foi observado que em doenças que apresentam a superexpressão

de MYC, como o LB, o NFκB regula a expressão de proteínas pró e antiapoptóticas favorecendo a apoptose, principalmente relacionada ao FasR. Dessa forma, acredita-se que a superexpressão de MYC sensibiliza as células à apoptose induzida pelo NFκB e, que a inatividade persistente da sinalização de NFκB é um pré-requisito para a tumorigênese mediada por MYC (KLAPPROTH et al, 2009; GASPARINI et al, 2014).

A proteína supressora de tumor p53 pode induzir uma célula à apoptose por vários mecanismos, como o bloqueio da função antiapoptótica de Bcl-2 e Bcl-xL (Figura 12), o que promove, direta ou indiretamente, as atividades apoptóticas de Bax e Bak e resulta na ativação da caspase-9 (ODA et al, 2000). Além disso, essa proteína é capaz de estimular a transcrição de genes como BAX e FAS e regular o ciclo celular. Nesse contexto, a proteína p53 atua no *checkpoint* localizado entre as fases G1 e S pela ativação de vários genes efetores pró-apoptóticos ou inibidores do crescimento, como a p21. A p21 interage com as CDKs e mantém a célula na fase G1/S para que ocorra o reconhecimento de danos e a ativação de proteínas de reparo ao DNA, ou a apoptose se esse dano for irreparável (ABBAS & DUTTA, 2009). Sabe-se que a maioria das neoplasias apresenta mutações no gene p53 (ATTARDI, 2005; ELMORE, 2007; HASSAN et al, 2014), e foi demonstrada a superexpressão dessa proteína mutada em casos de LLA (DANOVA et al, 1990). Também foram observados diferentes padrões de desregulação da p53 em LCB que podem estar associados à progressão da doença (ICHIKAWA et al, 1992), como, por exemplo, mutações com superexpressão da proteína, mutação com quantidades indetectáveis da proteína (como encontrado no LB) ou expressão da proteína sem mutações concomitantes nas regiões conservadas (GAIDANO et al, 1991; VILLUENDAS et al, 1993; LI et al, 1995).

Outra via de sinalização bastante estudada é a via da PI3K (fosfoinositol-3-cinase)/Akt/mTOR, que está comumente ativada nas neoplasias hematológicas. A ativação dessa via é realizada de forma complexa em resposta a fatores de crescimento e estresse celular, o que resulta na ativação da Akt (pAkt), e, dessa forma, desempenha um papel importante na proliferação, sobrevivência e mobilidade celular (Figura 12) (MENDOZA, ER & BLENIS, 2011). A ativação aberrante da via PI3K/Akt/mTOR é uma característica comum na LLA-T, que ocorre devido a vários mecanismos, como a deleção ou a supressão do gene PTEN (um potente repressor da via) ou a fosforilação/oxidação da proteína PTEN, a qual é detectável em 70 a 85% dos pacientes, e está associada a um pior prognóstico. Muitos inibidores dessa via estão sendo investigados na literatura e acredita-se que, futuramente, os pacientes

portadores de LLA-T poderão ser beneficiados ao utilizar essa forma de tratamento (KAWAUCHI et al, 2009; EVANGELISTI et al, 2014; BERTACCHINI et al, 2015, PARK, SIM & LEE K, 2016). Também foi demonstrado que a p53 é capaz de inibir a proteína PTEN e que Akt pode regular a via do NFκB por meio de fosforilação e ativação de moléculas nessa via (SARKAR et al, 2009). Além disso, foi demonstrado que a ativação da via PI3K/Akt/mTOR de forma aberrante no LB contribui para a proliferação e sobrevivência das células neoplásicas e, por isso, sugere-se a inserção de inibidores dessa via no tratamento dessa doença (SPENDER & INMAN, 2012, LI et al, 2015).

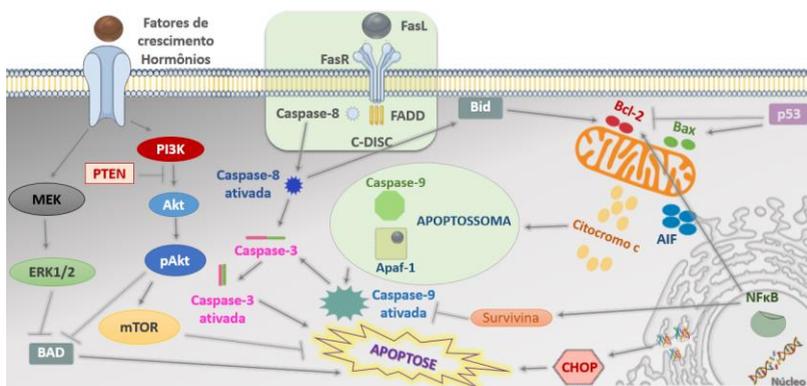
Por fim, a via MAPK/ERK também está relacionada à proliferação e sobrevivência celular e está ativada em neoplasias hematológicas. As duas vias citadas anteriormente, quando ativadas, são capazes de suprimir a apoptose de forma direta (pela inibição por mTOR) ou indireta (pela inibição da proteína pró-apoptótica BAD por Akt e MAPK) (Figura 12). Além disso, MAPK é capaz de inibir IKB que ativa a via de NFκB (MENDOZA, ER & BLENIS, 2011).

### 3.6.4 O papel do retículo endoplasmático na regulação celular

Como mencionado anteriormente, a capacidade de resposta de uma célula diante de estímulos e/ou estresses de origem endógena ou exógena é essencial para a manutenção de sua homeostase. O RE é a organela celular responsável pela síntese, dobramento e modificação de peptídeos e proteínas (SANO & REED, 2013). Diante de situações de estresse que resultam em perturbações na homeostase, o processo de dobramento de proteínas é afetado e pode ocorrer um acúmulo de proteínas não enoveladas no interior do RE, o que desencadeia um processo denominado estresse no RE. Nesse caso, os compartimentos celulares responsáveis por esta função possuem mecanismos que permitem a detecção dessas proteínas e a sua correção (MORI, 2009). Assim, quando perturbações mínimas na estrutura das proteínas nascentes são detectadas, ocorre a ativação de uma via de sinalização intracelular denominada UPR (do inglês *Unfolded Protein Response*) (Figura 12). A UPR é uma via de resposta bastante eficiente que permite à célula identificar o aumento de proteínas mal dobradas no lúmen do RE e incrementar a capacidade celular de redobrá-las de maneira correta ou induzir sua degradação. Se esse esforço não for suficiente para a eliminação do excesso de proteínas desenoveladas, a UPR pode ainda induzir a célula à apoptose (SCHRÖDER, 2008).

Uma das formas de ativação da via UPR é pela chaperona BiP, localizada no lúmen do RE que, em condições fisiológicas, se liga a componentes da via como ATF6, IRE1 e PERK, inativando-as. Em condições de estresse devido à presença de proteínas não enoveladas no lúmen do RE, ocorre o desligamento de BiP dos três componentes da via UPR, os quais ficam, então, livres para serem ativados (RUTKOWSKI & KAUFMAN, 2004). O resultado é a ativação de PERK e a consequente fosforilação da proteína eIF2 $\alpha$  no citosol. Como resultado da clivagem de eIF2 $\alpha$ , ocorre a inibição da tradução de RNA mensageiro, o que diminui a síntese de proteínas e a sobrecarga de proteínas não enoveladas no RE, restaurando a homeostase celular (DUFEY et al, 2014).

Figura 12 - Envolvimento de outras vias de sinalização na morte celular.



Envolvimento das vias do NF $\kappa$ B, p53, PI3K/Akt/mTOR, MAPK/ERK e UPR na morte celular. Fonte: A AUTORA.

Nota: AIF: Fator indutor de apoptose, APAF-1: Fator-1 ativador de protease apoptótica; DISC: Complexo sinalizador indutor de apoptose; FADD: Domínio de morte associado ao receptor Fas.

No entanto, as respostas adaptativas ao estresse celular nem sempre são bem sucedidas e, quando a homeostase é irremediavelmente perdida, a célula gera uma resposta que leva à MCR. Assim, a fosforilação de eIF2 $\alpha$  em consequência da UPR permite também a expressão de genes reguladores da apoptose, incluindo o que origina o fator de transcrição CHOP (do inglês *C/EBP homologous protein*). A ativação de CHOP resulta na inibição da transcrição de membros antiapoptóticos da família Bcl-2 e na regulação positiva de membros da família dos receptores de morte. Além disso, a via UPR pode modular diretamente a via do NF $\kappa$ B

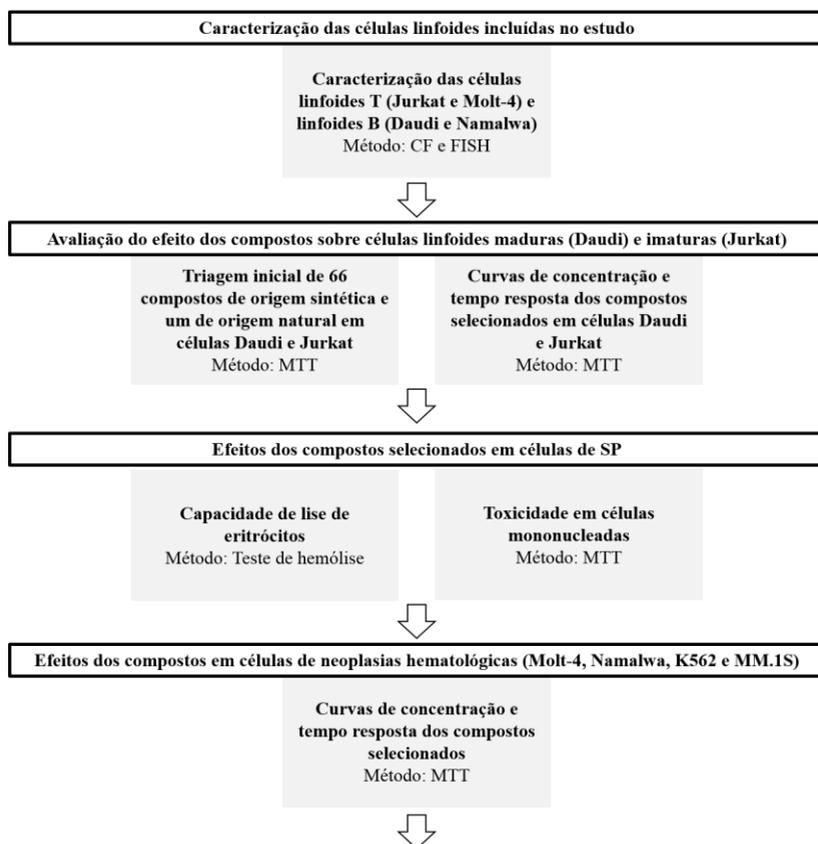
e levar a célula à MCR (DUFEY et al, 2014; GARG et al, 2015, GALLUZI et al, 2018).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

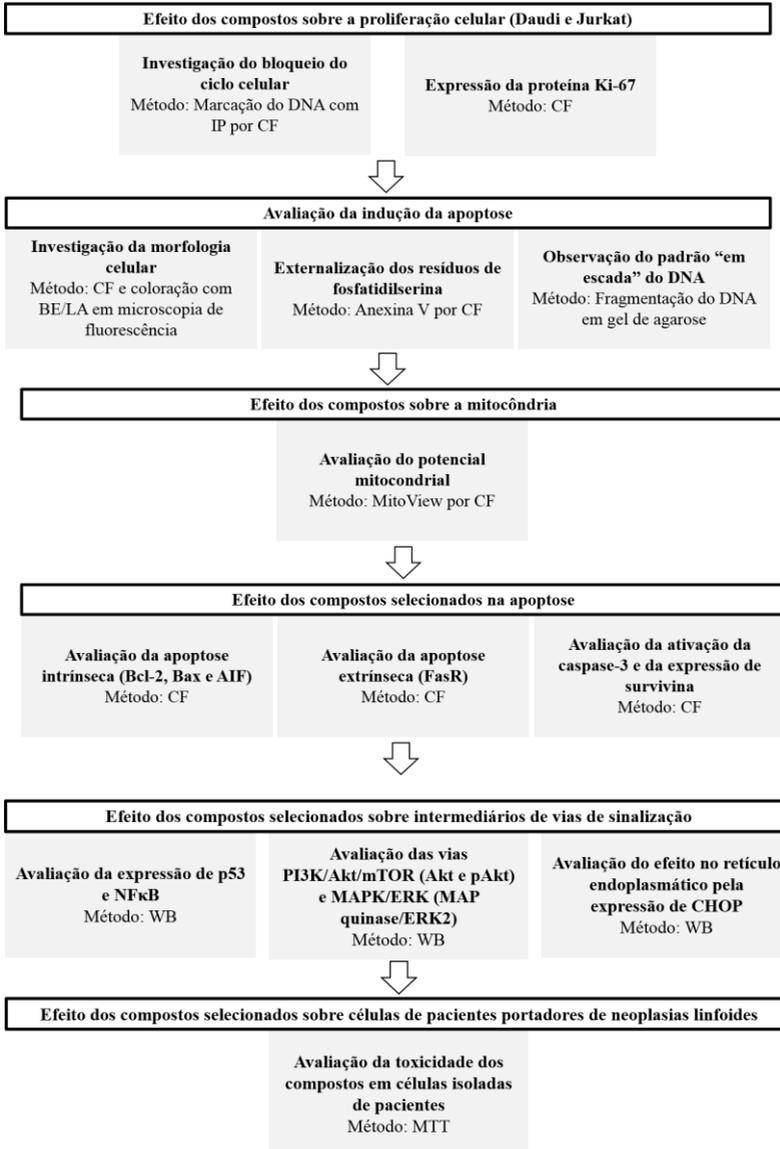
### 4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Esta seção irá abordar os procedimentos, as técnicas e os reagentes utilizados para a obtenção dos resultados apresentados no trabalho, conforme o delineamento apresentado no fluxograma da Figura 13. Os experimentos foram realizados em uma ordem que permitiu a seleção dos compostos mais promissores para o prosseguimento dos estudos.

Figura 13 - Delineamento do estudo.



(... continua)



Fonte: A AUTORA.

Nota: BE/LA: Brometo de etídeo/Laranja de acridina; CF: Citometria de fluxo; FISH: Hibridização *in situ* fluorescente; IP: Iodeto de propídeo; MTT: Brometo de dimetiazoldifeniltetrazólio; WB: Western blotting.

## 4.2 OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS

Neste trabalho foi investigado o efeito citotóxico de 66 compostos sintéticos (28 análogos sintéticos que contêm o grupo 3,4,5-trimetoxifenila e 38 derivados de tiossemicarbazonas) e um de origem natural sobre linhagens de células de neoplasias linfoides. Todos os compostos foram obtidos por meio de parcerias entre o LOEH e outros laboratórios da UFSC. A síntese dos compostos sintéticos e o isolamento do composto natural estão descritos no Anexo A.

## 4.3 CULTIVO CELULAR

No presente trabalho foram utilizadas duas linhagens celulares de neoplasias linfoides humanas imaturas (Jurkat e Molt-4) e duas linhagens de neoplasias linfoides maduras (Daudi e Namalwa), além de células de LMA (K562) e células plasmocitárias de mieloma múltiplo (MM) (MM.1S). As células K562 e Jurkat foram cedidas pelo professor Dr. Alberto Orfao do *Cientro de Investigación del Cancer* da Universidade de Salamanca (Espanha), as linhagens Molt-4, Daudi e Namalwa foram cedidas pela professora Dra. Patricia Maria Bergamo Favaro da Universidade Federal de São Paulo (Brasil) e a linhagem MM.1S foi cedida pela Dra. Anamika Dhyani do Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas (Brasil).

As células de linhagens de neoplasias hematológicas foram cultivadas em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI, Gibco®) 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco®), 10.000 U/mL de penicilina (Gibco®), 10.000 µg/mL de estreptomicina (Gibco®) e 10 mM de tampão de ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES, Gibco®) em pH 7,4. Todas as células foram mantidas em frascos plásticos estéreis para cultura celular e armazenadas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Inicialmente as células foram semeadas a uma densidade de 1,0 x 10<sup>6</sup> células por frasco e tiveram o meio substituído a cada 48 ou 72 h, de acordo com o crescimento celular.

A fim de realizar a contagem celular para os experimentos, o meio de cultura contendo as células em suspensão (Jurkat, Molt-4, Daudi, Namalwa, K562 e MM.1S), foi centrifugado a 264 x g por 10 min em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspendido em 5,0 mL de meio RPMI. O número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão com o corante azul de tripan

0,4% (Sigma-Aldrich®) e apenas as amostras com viabilidade celular superior a 95% foram utilizadas nos experimentos. O tempo de tratamento, a quantidade de células e a placa utilizada (6, 12, 24 ou 96 poços) foram definidos de acordo com cada protocolo experimental e as condições requeridas pelo mesmo.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE LINHAGENS DE NEOPLASIAS LINFOIDES

A caracterização fenotípica das linhagens Jurkat, Molt-4, Daudi e Namalwa foi realizada a fim de identificar possíveis diferenças em relação ao estágio de maturação das células estudadas. Para isso,  $1 \times 10^6$  células de cada linhagem celular foram centrifugadas a  $264 \times g$  por 10 min e lavadas com tampão fosfato (PBS). Em seguida, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos específicos (Quadro 2) e foram incubadas por 30 min na ausência de luz. Para as células de LLA-T (Jurkat e Molt-4) foram utilizados no mesmo tubo anticorpos para os marcadores CD5 conjugado a FITC, CD2 conjugado a PeCy7, CD7 conjugado a APC, CD3 conjugado a APCH7, CD45 conjugado a PacO e o corante 7-AAD, e para as células de LB (Daudi e Namalwa) foram utilizados no mesmo tubo CD81 conjugado a FITC, CD10 conjugado a PE, CD19 conjugado a PeCy7, IgM conjugado a APC, CD38 conjugado a APCH7, CD20 conjugado a Pacific Blue, CD45 conjugado a PacO, além do 7-AAD. Em seguida, adicionou-se uma solução para a fixação das células marcadas (BD FACS Lysing Solution - BD Biosciences®) e, após a incubação de 30 min, as amostras foram centrifugadas e ressuspendidas com  $500 \mu\text{L}$  de PBS. Por fim, foram adquiridos um total de 50.000 eventos no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) com o *software* BD FACSDiva versão 6.1.2 e os resultados foram analisados no *software* Infinicyt versão 1.7 (Cytognos®). O 7-AAD (Exbio®) é um corante de DNA e foi utilizado  $2 \mu\text{L}$  em todos os tubos com o objetivo de excluir as células inviáveis da amostra analisada.

As células Daudi utilizadas no presente estudo foram utilizadas como controle positivo em um trabalho que visava à padronização da técnica de FISH para a pesquisa da  $t(8;14)$  (SIEGEL, 2016).

Quadro 2 - Anticorpos utilizados na caracterização fenotípica das células de linhagens de neoplasias linfóides.

<b>Marcador</b>	<b>Clone</b>	<b>Fabricante</b>	<b>N° Catálogo</b>	<b>Volume (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Fluorocromo</b>
<b>CD2</b>	LFA-2	Beckman Coulter	PN A51074	3	PeCy7
<b>CD3</b>	HIT3 a	BioLegend	30318	1	APCH7
<b>CD5</b>	L17F 12	BD	341089	7	FITC
<b>CD7</b>	MEM -186	Exbio	1A-20- 7100	3	APC
<b>CD10</b>	IM19 15U	Beckman Coulter	PN IM1915U	10	PE
<b>CD19</b>	SJ25 C1	BD Pharmigen	557835	2	PeCy7
<b>CD20</b>	L27	BD	642274	2	PacB
<b>CD38</b>	HB7	BD	646646	3	APCH7
<b>CD81</b>	JS-81	BD	656647	3	APCH7
<b>CD45</b>	HI30	BD	7188870	1	PacO
<b>IgM</b>	CH2	Exbio	1A-320- C100	7	APC

Nota: PECy7: ficoeritrina-cianina 7; APCH7: Alofocianina H7; FITC: fluoresceína; APC: alofocianina; PE: ficoeritrina; PacB: pacific blue; PacO: pacific Orange.

#### 4.5 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM OS COMPOSTOS E DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Todos os compostos incluídos no presente trabalho foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck Millipore®) na concentração de 10 mM e armazenados a 4°C (solução estoque). Para a obtenção das concentrações utilizadas nos experimentos, foram preparadas soluções intermediárias a partir da solução estoque e diluídas em meio de cultura.

Inicialmente foi realizada uma triagem dos compostos sobre células de neoplasias linfóides. Para isso, as células Daudi ( $5 \times 10^4$  células/poço) e Jurkat ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços com um volume final de 200  $\mu$ L e incubadas com os compostos na concentração de 100  $\mu$ M. As placas foram incubadas por

24 h a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> e a viabilidade celular foi avaliada por método colorimétrico utilizando MTT (Amresco®). Esse método baseia-se na medida indireta da viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial de células vivas que reduzem o MTT de cor amarela ao seu derivado formazan de cor roxa (MOSMANN, 1983). Após o tempo de incubação das células com os compostos, removeu-se 150 µL do meio de cultura de cada poço e adicionou-se 50 µL de uma solução contendo meio de cultura com 10% (v/v) de MTT (5 mg/mL em PBS). Após 3 h de incubação a 37°C, as placas foram centrifugadas a 264 x g por 10 min e o sobrenadante foi removido. Os precipitados formados em cada poço foram dissolvidos com 100 µL de solução de álcool isopropílico/ácido clorídrico 0,04 N e as placas foram mais uma vez centrifugadas para a remoção dos restos celulares. O sobrenadante foi transferido para outra placa de 96 poços, na qual foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro *Microwell Systems* (OrganonTeknika®) no comprimento de onda 540 nm. Em todos os experimentos foram utilizados dois controles, um de células sem tratamento, e outro acrescido do solvente (DMSO) ao meio de cultura na maior concentração utilizada nos experimentos (1%). Os procedimentos de preparação das amostras foram executados em condições estéreis. A densidade óptica do grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como 100% de células viáveis e os valores de absorbância encontrados para os compostos foram transformados em porcentagens de viabilidade em relação aos controles.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CONCENTRAÇÃO E TEMPO RESPOSTA

Os compostos que induziram maior redução da viabilidade celular, no ensaio descrito acima, foram selecionados para a realização das curvas concentração e tempo resposta nas linhagens Daudi e Jurkat. Para a linhagem de células Jurkat, seguiu-se a relação de 1 x 10<sup>5</sup> células/poço para o tempo de tratamento de 24 h, 5 x 10<sup>4</sup> células/poço para 48 h e 2,5 x 10<sup>4</sup> células/poço para 72 h, com 200 µL de meio de cultura. Para as células Daudi, foram utilizadas 5 x 10<sup>4</sup> células/poço para o tempo de tratamento de 24 h, 2,5 x 10<sup>4</sup> células/poço para 48 h e 1,25 x 10<sup>4</sup> células/poço para 72 h, com 200 µL de meio de cultura. Dessa forma, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços e incubadas com os compostos selecionados em concentrações crescentes (1 a 100 µM) a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> nos tempos de 24, 48 e 72 h.

A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT e a  $CI_{50}$  (concentração inibitória 50%) foi obtida a partir da análise de regressão linear dos gráficos plotados com os valores de porcentagem de viabilidade celular *versus* concentração, utilizando-se o *software* GraphPadPrism 5. A  $CI_{50}$  de 24 h calculada para cada um dos compostos selecionados foi utilizada nos demais ensaios.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS EM CÉLULAS DE SP DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

Para avaliação da influência dos compostos selecionados em eritrócitos e em células mononucleadas, foram coletadas amostras de SP de seis indivíduos saudáveis e não fumantes que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme o Comitê de Ética de Pesquisa em Seres humanos (CEPSH) da UFSC n° 2.838.107/2018 (Anexo B). As amostras foram obtidas por punção venosa e processadas imediatamente após a coleta.

Para a avaliação da capacidade hemolítica dos compostos avaliados, as amostras de SP foram coletadas em tubos contendo o anticoagulante citrato de sódio. As amostras foram centrifugadas a 264 x g por 10 min e os eritrócitos foram isolados após a retirada do sobrenadante. O sedimento contendo as hemácias foi lavado três vezes com solução salina (0,9 % de NaCl) e, em seguida, diluído a fim de obter a dispersão estoque de eritrócitos. A absorbância da dispersão estoque foi lida em espectrofômetro a 540 nm e a diluição foi ajustada até obter-se um valor de absorbância entre 1,8 e 2,2 (teste de diluição).

A fim de avaliar a capacidade citotóxica dos compostos selecionados em células mononucleadas de indivíduos saudáveis, realizou-se a coleta das amostras em tubo contendo o anticoagulante ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) e diluídas em tampão PBS na proporção de 1,0 mL de amostra para 1,0 mL de PBS. Em seguida, as amostras diluídas foram cuidadosamente adicionadas sobre Ficoll-Hypaque (densidade 1.077 g/m<sup>3</sup>) na proporção 1:1 e centrifugadas a 300 x g por 30 min. A interfase contendo as células mononucleadas foi transferida para um novo tubo cônico e as mesmas foram ressuspensas em 10 mL de tampão PBS antes de serem centrifugadas a 200 x g por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram novamente lavadas com PBS. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 5,0 mL de meio RPMI 1640 e o número de

células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão do corante azul de tripan.

#### 4.7.1 Teste de hemólise

O teste hemolítico tem por objetivo avaliar o potencial de um composto em causar lesões à membrana dos eritrócitos e, conseqüentemente, extravasamento do conteúdo celular. O teste foi realizado segundo o protocolo descrito por Múzquiz-Ramos e colaboradores (2014), no qual a partir da dispersão estoque de eritrócitos obtida anteriormente, foram preparados o controle negativo, considerado 0% de hemólise (50 µl de dispersão de eritrócitos com adição de 950 µl de salina), o controle positivo, ou seja, 100% de lise celular (50 µl de dispersão de eritrócitos com adição de 950 µl de água destilada) e amostras testes (50 µl de dispersão de eritrócitos com adição de 950 µl de salina contendo diferentes concentrações dos compostos analisados, sempre múltiplas da CI<sub>50</sub>). As amostras foram incubadas em termobloco sob agitação a 100 x g por 1 h a 37 °C e, em seguida, centrifugadas a 500 x g por 5 min. O sobrenadante de cada tubo (100 µL) foi transferido para uma placa de 96 poços e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm (Microwell Systems, Organon Teknika®). A taxa de hemólise foi calculada refletindo a quantidade de hemoglobina liberada no sobrenadante devido à ruptura dos eritrócitos pela seguinte equação:

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

Nota: DO<sub>t</sub>: Densidade óptica da amostra teste; DO<sub>cn</sub>: densidade óptica do controle negativo; DO<sub>cp</sub>: densidade óptica do controle positivo.

#### 4.7.2 Efeito citotóxico dos compostos selecionados em células não neoplásicas (células mononucleadas de SP)

Um total de 5 x 10<sup>5</sup> células mononucleadas previamente isoladas do SP de voluntários saudáveis foram plaqueadas em placas de 96 poços com 200 µL de meio RPMI 1640. As células foram incubadas com os compostos selecionados, nas suas respectivas CI<sub>50</sub> de 24 h, por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT e os resultados obtidos para os compostos foram comparados com o grupo controle sem

tratamento, com os grupos tratados com taxol (Paclitaxel®) a 10  $\mu\text{M}$ , com vincristina (Tecnocris®) a 100  $\mu\text{M}$  e também com o solvente DMSO na maior concentração utilizada nos experimentos (1%). Além disso, para a avaliação da citotoxicidade foram realizadas curvas de concentração e tempo-resposta para o fármaco vincristina.

#### 4.8 EFEITO CITOTÓXICO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS SOBRE OUTRAS CÉLULAS DE LINHAGENS DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Após a seleção dos compostos a serem estudados, os seus efeitos citotóxicos foram avaliados em células de outras linhagens de neoplasias hematológicas e, para isso utilizou-se outras linhagens de células de neoplasia linfóide imatura (Molt-4) e madura (Namalwa), além de uma linhagem de neoplasia mieloide (K562) e uma linhagem de MM (MM.1S). Para as células Molt-4, K562 e MM.1S, utilizou-se  $5 \times 10^4$  células/poço para o tempo de tratamento de 24 h,  $2,5 \times 10^4$  células/poço para 48 h e  $1,25 \times 10^4$  células/poço para 72 h, com 200  $\mu\text{L}$  de meio de cultura. As células Namalwa seguiram a mesma proporção utilizada para as células Jurkat, ou seja,  $1 \times 10^5$  células/poço para o tempo de tratamento de 24 h,  $5 \times 10^4$  células/poço para 48 h e  $2,5 \times 10^4$  células/poço para 72 h, com 200  $\mu\text{L}$  de meio de cultura. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT.

#### 4.9 CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

No presente estudo foram comparadas as  $\text{CI}_{50}$  de 24 h de células de linhagem de neoplasias linfóides (Jurkat, Daudi, Molt-4 e Namalwa) com células de neoplasia mieloide (K562) e de MM (MM.1S), segundo a seguinte equação:  $\text{IS} = \text{CI}_{50}$  de células de origem mieloide ou de MM /  $\text{CI}_{50}$  de células de neoplasias linfóides incluídas no estudo.

#### 4.10 EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE O CICLO CELULAR

Para avaliar os efeitos dos compostos selecionados nas fases do ciclo celular, as células Daudi e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas por 24 h com os compostos selecionados nas concentrações de suas  $\text{CI}_{50}$  de 24 h. Em seguida, foi utilizado o kit *PI/RNASE Solution* (Immunostep®), cujo princípio consiste na coloração dos ácidos nucléicos pelo IP após a digestão do RNA. O controle negativo foi

preparado com células sem tratamento para caracterização dos parâmetros a serem analisados no citômetro de fluxo. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS, fixadas com 200 µL de etanol 70% e incubadas durante 30 min a 4°C. Em seguida, foram lavadas com PBS contendo 2% de albumina bovina e centrifugadas a 200 x g por 10 min. Ao sedimento celular, foram adicionados 500 µL de solução de IP contendo RNase disponível no kit e as células foram mantidas no escuro por 15 min em temperatura ambiente. Os *doublets* foram excluídos após a realização de *gates* no canal PE (área x largura) e foram adquiridos 10.000 eventos em ciclo celular (*storage gate*) no citômetro de fluxo BD FACSCanto II com o *software* BDFACSDiva versão 1.6.2. As análises foram feitas no software Infinicyt versão 1.7 (Cytognos®).

#### 4.11 DETERMINAÇÃO DA INDUÇÃO DA APOPTOSE

Foi avaliado se a atividade citotóxica dos compostos selecionados envolve morte celular por apoptose por três abordagens: Análise de parâmetros como o tamanho das células (Forward Scatter - FSC) e a granulidade e/ou complexidade intracelular (Side scatter - SSC) e avaliação das células por microscopia de fluorescência com brometo de etídeo e laranja de acridina (BE/LA) (Sigma-Aldrich®), avaliação da expressão dos resíduos de fosfatidilserina na membrana celular por CF e ensaio de fragmentação de DNA por eletroforese em gel de agarose.

##### **4.11.1 Análise do tamanho e complexidade interna das células por CF e por microscopia de fluorescência com BE e LA**

A técnica de CF é capaz de fornecer informações sobre alterações no tamanho das células e a granulidade e/ou complexidade intracelular da população analisada após a incubação com os compostos selecionados. Para isso, as células Daudi e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com os compostos selecionados nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h. Após incubação por 24 h, as células foram centrifugadas a 264 x g por 10 min e lavadas com PBS. Em seguida, acrescentou-se uma solução para fixar as células (BD FACS Lysing Solution - BD Biosciences®) e as amostras foram incubadas por 15 min no escuro. As amostras foram novamente centrifugadas e ressuspensas em 500 µL de PBS. Foram adquiridos um total de 50.000 eventos para cada amostra no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems)

com o *software* BD FACSDiva versão 6.1.2. Os resultados foram analisados no software Infinicyt versão 1.7 (Cytognos®).

A avaliação das células após coloração com BE/LA permite a diferenciação das células viáveis daquelas em apoptose (em fase inicial ou tardia) ou em necrose devido à diferença de permeabilidade da membrana plasmática das células aos corantes. O corante LA é permeável à membrana intacta e confere fluorescência verde às células viáveis. Já o BE é impermeável à membrana intacta e é capaz de se intercalar ao DNA fragmentado das células não viáveis, conferindo-lhes fluorescência laranja. Para realizar a análise por microscopia de fluorescência, as células Daudi e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com os compostos selecionados nas suas  $CI_{50}$  de 24 h e incubadas por 18 h. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e o sedimento celular foi ressuspenso em 40  $\mu$ L de uma solução constituída de BE (5 $\mu$ g/mL) e LA (10 $\mu$ g/mL) na proporção 1:1. Após incubação por 10 min a temperatura ambiente, 25  $\mu$ L da suspensão celular foi adicionada sobre uma lâmina de vidro e recoberta com lamínula. As células dispostas na lâmina foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX41) e campos representativos foram fotografados com câmera fotográfica (Olympus BX40, Olympus®) em aumento de 400 vezes.

#### **4.11.2 Detecção da externalização dos resíduos de fosfatidilserina por CF**

As células Daudi e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com os compostos selecionados nas suas  $CI_{50}$  de 24 h. Após 18 e 24 h de incubação, as células foram submetidas à centrifugação por 5 min a 200 x g para a retirada do meio de cultura. Em seguida, de acordo com as instruções do fabricante, as células foram lavadas com PBS gelado e ressuspendidas em 1 mL de PBS. Dessa suspensão foi retirada uma alíquota de 100  $\mu$ L, na qual foi adicionado 5  $\mu$ L de anexina V conjugada a FITC (BD Pharmingen™ - Catálogo: 556419). As amostras foram incubadas por 15 min no escuro em temperatura ambiente e, em seguida, foi adicionado 400  $\mu$ L de PBS para aquisição no citômetro de fluxo. O controle negativo dos experimentos foi preparado com células sem tratamento a fim de definir a concentração basal de células marcadas com anexina V. Foram adquiridos um total de 20.000 eventos para cada amostra no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) com o *software* BD FACSDiva versão 6.1.2

Os resultados foram analisados no software Infinicyt versão 1.7 (Cytognos®).

#### 4.11.3 Análise de fragmentação do DNA em gel de agarose

As células Daudi e Jurkat ( $3,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com os compostos selecionados nas suas  $CI_{50}$  de 24 h. Após 24 h, as células foram centrifugadas a  $264 \times g$  por 10 min, lavadas duas vezes com PBS e a extração de DNA foi realizada utilizando-se o kit *QIAamp® DNA Mini* (Qiagen®), seguindo-se as instruções do fabricante. As amostras de DNA extraídas foram transferidas para um microtubo livre de RNase e DNase e separadas por eletroforese em gel de agarose 2% utilizando-se tampão TAE (tris/ácido acético/EDTA) por tempo e voltagem necessários. Os géis foram corados com BE (1  $\mu g/mL$ ) e fotografados no transiluminador MacoVue UV-20 Hoefer com o sistema de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT®, Biosystems®).

#### 4.12 AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi_m$ )

Para avaliar os efeitos dos compostos no  $\Delta\Psi_m$  foi utilizado o kit MitoView 633 (Biotium®) que é constituído por um corante fluorescente que se acumula na mitocôndria quando o  $\Delta\Psi_m$  está intacto. As células Daudi e Jurkat ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com os compostos selecionados nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h por 18 e 24 h em estufa úmida a  $37^\circ C$  com 5% de  $CO_2$ . Após esse período, as células foram lavadas com PBS, submetidas à centrifugação a  $200 \times g$  por 10 min e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados sobre o sedimento celular 300  $\mu l$  da solução de MitoView 633 diluído 1:10.000, de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente (20 a  $25^\circ C$ ) ao abrigo da luz e novamente centrifugadas a  $200 \times g$  por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso em 500  $\mu l$  de PBS. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems), com o *software* BD FACSDiva versão 6.1.2 para a aquisição dos eventos e o *software* Infinicity 1.7 (Cytognos®) para análise das células com mitocôndrias que apresentavam  $\Delta\Psi_m$  intacto. Foram adquiridos 20.000 eventos e os *doublets* foram retirados utilizando-se as características de FSC *Height* e

*Area.* O controle negativo foi preparado com células sem tratamento para caracterização dos parâmetros a serem analisados no citômetro de fluxo.

#### 4.13 AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE POR CF (KI-67, BCL-2, BAX, AIF, FASR, CASPASE-3 ATIVADA E SURVIVINA)

Um total de  $1,0 \times 10^6$  células das linhagens Daudi e Jurkat foram incubadas com os compostos selecionados nas suas  $CI_{50}$  de 24 h e incubadas por 24 h em estufa úmida a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ . Para todas as proteínas intracelulares (Ki-67, Bcl-2, Bax, AIF, caspase-3 ativada, survivina,), utilizou-se o kit *FIX&PERM®Cell Fixation and Permeabilization Kit* (Nordic-MUBio®), que é composto de um reagente A e um reagente B que permitem a fixação e permeabilização das células. O kit utilizado permite também a marcação de proteínas de membrana, como o FasR. Assim, as células foram centrifugadas a  $264 \times g$  por 10 min em um tubo específico para CF, lavadas com PBS e ressuspensas com  $100 \mu\text{L}$  de PBS. Foi adicionado o volume específico do anticorpo anti-FasR e as amostras foram incubadas por 15 min na ausência de luz e a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se  $100 \mu\text{L}$  do reagente A, procedeu-se novamente a incubação por 15 min na ausência de luz e a temperatura ambiente. Após a incubação, acrescentou-se 2 mL de PBS e a amostra foi centrifugada por 5 min a  $300 \times g$ . O sobrenadante foi retirado e acrescentou-se  $100 \mu\text{L}$  do reagente B e o volume adequado de cada um dos anticorpos específicos para as proteínas intracelulares. Novamente a amostra foi incubada por 15 min na ausência de luz a temperatura ambiente e, por fim, foi centrifugada a  $300 \times g$  por 5 min. Ao sedimento celular foi acrescentado  $500 \mu\text{L}$  de PBS para a análise no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems). A aquisição foi realizada com o *software* BD FACSDiva versão 6.1.2 e as análises foram realizadas com o Infinicity 1.7 (Cytognos®). Os anticorpos utilizados estão descritos no Quadro 3. Os tubos foram planejados de forma a não conter dois anticorpos monoclonais conjugados ao mesmo fluorocromo em um mesmo tubo e o controle negativo foi preparado utilizando-se células sem tratamento.

Quadro 3 - Anticorpos utilizados na análise de proteínas relacionadas com a apoptose e proliferação celular por CF.

Marcador	Clone	Fabricante	Nº Catálogo	Volume	Fluorocromo
<b>Bcl-2</b>	Bcl-2/100	Exbio	1F-668-T100	4	FITC
<b>Bax</b>	B-9	Santa Cruz	SC-7480 PercP	5	PercP
<b>FasR</b>	B-10	Santa Cruz	SC-8009 PE	5	PE
<b>AIF</b>	E-1	Santa Cruz	SC-13116 FITC	5	FITC
<b>Caspase-3 ativada</b>	C92-605	BD	560627	5	V450
<b>Ki-67</b>	20 Raj1	eBioscience	11-5699-41	5	FITC
<b>Survivina</b>	D-8	Santa Cruz	SC-17779 PE	5	PE

Nota: FITC: fluoresceína; PercP: Complexo proteína peridina-clorofila; PE: ficoeritrina.

#### 4.14 AVALIAÇÃO DE P53, NFKB, AKT, PAKT, MAP CINASE E CHOP POR WB

As células Daudi e Jurkat ( $4,0 \times 10^6$  células) foram incubadas com os compostos sintéticos selecionados e com o AP1 nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h e incubadas por 24 h em estufa úmida a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ . Após a incubação, foram preparados os lisados celulares totais. Para isso, as células foram lavadas e ressuspensas em 1 mL de PBS. A suspensão celular foi transferida para um tubo plástico de 1,5 mL e as amostras foram centrifugadas a  $300 \times g$  por 5 min. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 105  $\mu\text{L}$  de tampão RIPA contendo *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma-Aldrich®) e o sedimento foi repetidamente homogeneizado. As amostras foram incubadas em banho de gelo por 15 min e depois centrifugadas a  $500 \times g$  por 10 min. Por fim, o sobrenadante contendo as proteínas foi transferido para um novo tubo para a realização da quantificação proteica pelo método do ácido bicinonínico (BCA) com o *kit Micro BCA Protein Assay* (Pierce®). Uma curva-padrão com concentrações conhecidas de albumina bovina sérica foi confeccionada paralelamente aos experimentos. As amostras a serem analisadas foram

incubadas por 2 h a 37°C na presença do agente colorimétrico e a leitura das absorbâncias foi realizada no espectrofotômetro *Microwell Systems* (OrganonTeknika®) no comprimento de onda 540 nm.

Para a técnica de WB, 50 µg de cada um dos lisados proteicos de interesse foram submetidos à separação eletroforética em gel SDS-PAGE 12%, depois foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Hybond™-C Extra – Amersham Biosciences®) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1% e metanol 20%), a uma voltagem crescente que se inicia a 10 V por 45 min, no aparelho *semi-dry* mini (GE Healthcare Life Sciences®). A fim de verificar a eficácia do processo de transferência, a membrana foi corada em solução de Ponceau S 0,1% em ácido acético 3% por 5 min e o gel foi corado com Comassie antes de ser descartado. A membrana foi descorada por meio de lavagens sucessivas com ácido acético 1% e, posteriormente, procedeu-se a incubação da mesma com solução de bloqueio (TBS-T [Tris 25 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,1% com pH 7,4]) e leite desnatado a 5% por 1 h a temperatura ambiente, sob constante agitação. Após o bloqueio, a membrana de nitrocelulose foi incubada *overnight* com os anticorpos primários específicos para as proteínas de interesse em solução de bloqueio. A expressão de NFκB, p53, CHOP, Akt1/2/3, pAkt1/2/3, MAP cinase ERK2 e β-tubulina (utilizada como controle) nas linhagens celulares purificadas foi avaliada com anticorpos primários e secundários específicos (Quadro 4).

Após três lavagens com TBS-T por 10 min sob agitação constante, a membrana foi incubada com os respectivos anticorpos secundários conjugados a HRP diluídos em solução de bloqueio por 1 h (Quadro 4). A membrana foi novamente lavada três vezes com TBS-T por 10 min sob agitação e foi incubada com 1 mL de reagente ECL (GE Healthcare®) por 1 min, lida por quimioluminescência e fotografada no transiluminador MacoVue UV-20 Hoefer. Os resultados obtidos foram normalizados com a utilização da proteína constitutiva β-tubulina e a avaliação da expressão das proteínas de interesse foi realizada de forma quantitativa pela avaliação densitométrica das bandas geradas com o *software* ImageJ (disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

#### 4.15 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS SOBRE CÉLULAS DE PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS LINFOIDES

Foram coletadas amostras de SP e MO de pacientes com diagnóstico de neoplasias linfoides B e T, antes do primeiro tratamento e em casos de recidiva, atendidos pelo Serviço de Hematologia do HU/UFSC (CEPSH n° 2.838.107/2018 – Anexo B).

Quadro 4 - Anticorpos utilizados na avaliação por WB.

<b>Molécula alvo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Origem</b>	<b>Fabricante</b>	<b>N° Catálogo</b>
<b>CHOP</b>	1:1000	Camundongo	Cell Signaling Technologies	L63F7
<b>p53 (DO-1)</b>	1:100	Camundongo	Santa Cruz Biotechnology	sc-126
<b>NFκB p65 (C-20)</b>	1:250	Coelho	Santa Cruz Biotechnology	sc-372
<b>Akt 1/2/3</b>	1:1000	Coelho	Cell Signaling Technologies	9272S
<b>pAkt 1/2/3</b>	1:500	Camundongo	Santa Cruz Biotechnology	sc-514032
<b>MAP cinase ERK2</b>	1:1000	Camundongo	Calbiochem	442700
<b>β-tubulina</b>	1:250	Coelho	Santa Cruz Biotechnology	sc-9104
<b>Imunoglobulina de camundongo</b>	1:2000	Cabra	Invitrogen	62-6520
<b>Imunoglobulina de coelho</b>	1:2000	Cabra	Invitrogen	RF238896

As células mononucleadas foram isoladas conforme descrito anteriormente no item 4.7 e o número de células viáveis foi avaliado pelo método do azul de tripan. Um total de  $5 \times 10^5$  células foram plaqueadas e incubadas com os compostos selecionados em concentrações de 1 a 100  $\mu\text{M}$ . Após o período de 24 h de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT.

#### 4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os resultados apresentados no presente trabalho foram expressos como a média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM) e cada experimento foi

repetido, pelo menos, três vezes de forma independente. Em todas as análises foi adotado um nível de confiança de 95%. Para a análise dos resultados e testes estatísticos foi utilizado o *software* GraphPad Prism 6. A avaliação estatística dos testes de citotoxicidade em células neoplásicas e em células mononucleadas de SP e do efeito dos compostos no ciclo celular, além do ensaio de hemólise, foi realizada utilizando-se a análise de variância (ANOVA) *one way* ou *two way*, complementada pelo teste *post-hoc* de Bonferroni ou Tukey. Para a avaliação da expressão de resíduos de fosfatidilserina, da alteração do  $\Delta\Psi_m$  e da avaliação da expressão das proteínas pró e antiapoptóticas foi utilizado o teste *t* não pareado, comparando cada ponto com o respectivo grupo controle.

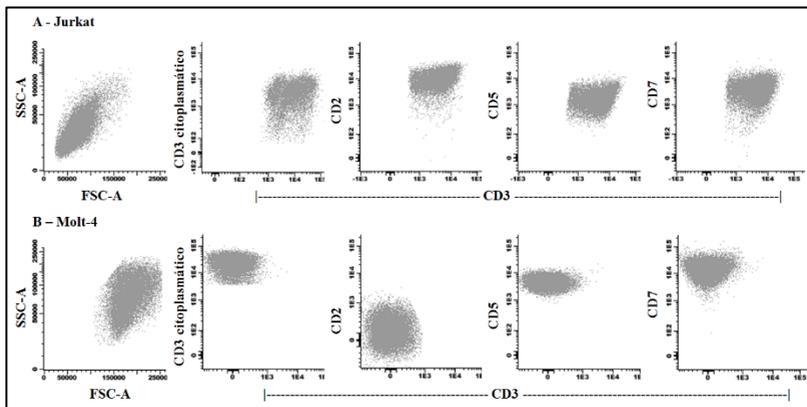


## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE LINHAGENS DE NEOPLASIAS LINFOIDES

Foi realizada a imunofenotipagem por CF para caracterizar o fenótipo e, conseqüentemente, o estágio de maturação das células de neoplasias linfoides incluídas no estudo. Conforme demonstrado na Figura 14, as células Jurkat (LLA-T) apresentaram a expressão de CD3 de membrana e citoplasmático, além da coexpressão de CD2, CD5 e CD7, o qual é um fenótipo sugestivo de LLA-T madura. As células Molt-4 apresentaram maior tamanho e complexidade interna e, diferente do que foi observado nas células Jurkat, demonstraram a expressão de CD3 apenas no citoplasma e coexpressão de CD5 e CD7; sem a expressão de CD2 e CD3 de membrana, o que sugere uma LLA pró-T.

Figura 14 - Caracterização fenotípica das células de linhagem linfóide T (Jurkat e Molt-4).

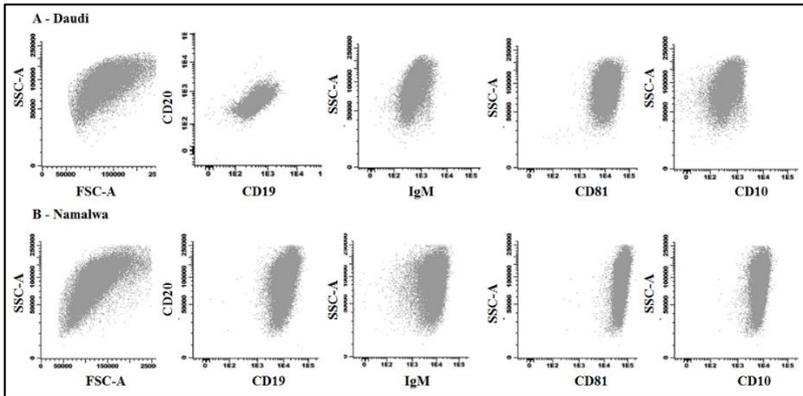


As células Jurkat (A) e Molt-4 (B) foram caracterizadas e classificadas conforme a expressão de antígenos como CD2, CD3 citoplasmático, CD3 de membrana, CD5 e CD7.

Com relação às células linfoides B, pode-se observar na Figura 15 que as células Daudi e as células Namalwa apresentam tamanho e complexidade interna similares, coexpressão de CD19 e CD20, expressão fraca de IgM e expressão de CD10 e CD81, fenótipo compatível com o

encontrado no LB. As células Daudi apresentaram menor expressão de CD19, CD20 e CD10 em comparação com as células Namalwa.

Figura 15 - Caracterização fenotípica das células de linhagem linfóide B (Daudi e Namalwa).



As células Daudi (A) e Namalwa (B) foram caracterizadas e classificadas conforme a expressão de antígenos como CD19, CD20, IgM, CD81 e CD10.

Na avaliação do FISH das células Daudi, foi observada a co-localização do sinal fluorescente, o que indica a presença da t(8;14) nas células analisadas (Figura 16).

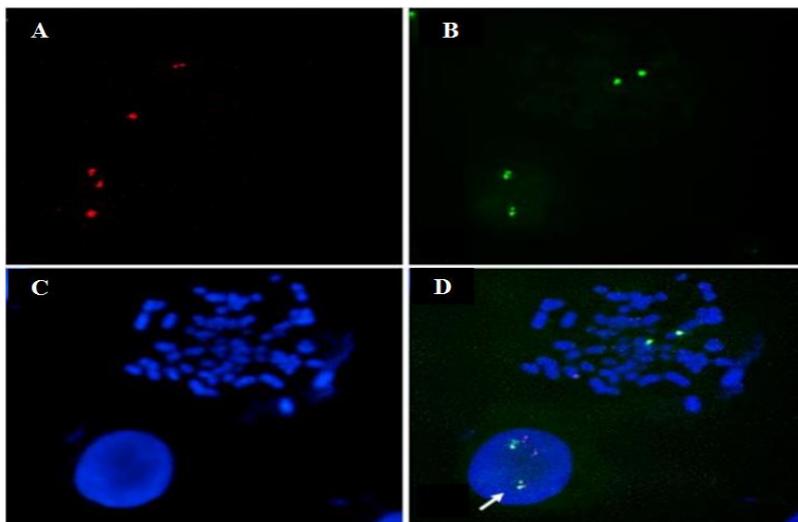
## 5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SINTÉTICOS E NATURAL SOBRE CÉLULAS NEOPLÁSICAS

A triagem dos 28 análogos sintéticos que contêm o grupo 3,4,5-trimetoxifenila, dos 38 derivados de tiossemicarbazonas e do composto natural AP1 foi realizada nas linhagens Jurkat e Daudi, por serem modelos de células linfóides em estágios imaturo e maduro, respectivamente. Em todos os ensaios de viabilidade celular utilizou-se, além do grupo controle composto de células sem tratamento, um segundo grupo contendo 1% de DMSO, e não foi observada diferença significativa na viabilidade celular entre os dois grupos.

Para fins didáticos, os resultados das triagens foram apresentados por grupos de compostos seguidos dos resultados obtidos nas curvas de concentração e tempo resposta, ambos utilizados para a seleção dos compostos mais promissores, baseado na citotoxicidade dos mesmos em

células Daudi e Jurkat. Dessa forma, foram selecionados os compostos mais promissores após avaliação da  $CI_{50}$  de 24, 48 e 72 h.

Figura 16 - Sonda de FISH em preparações de células em interfase e cromossomos em metáfase da amostra de células Daudi.

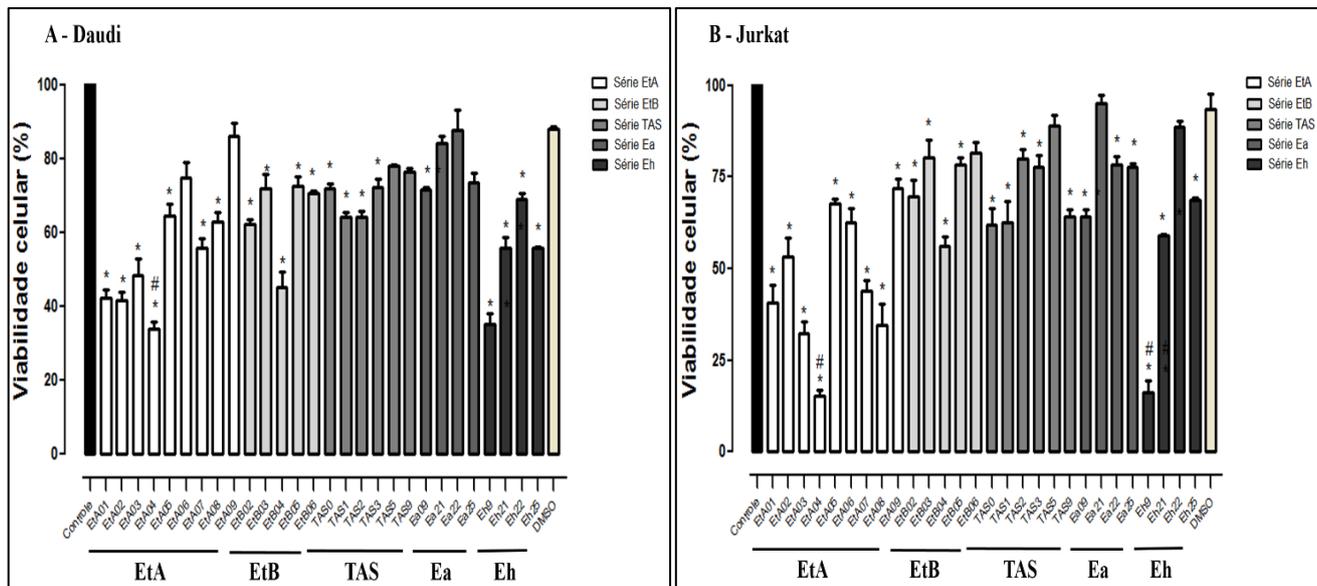


Em A pode-se observar a sonda MYC (8q24.21) em vermelho; em B a sonda IgH (14q32.33) em verde; em C núcleo em interfase e cromossomos em metáfase evidenciados pelo uso do 6-Diamidino-2-Fenilindol em azul; em D foi realizada a sobreposição das imagens demonstrando uma metáfase normal com dois sinais vermelhos e dois verdes separados e um núcleo interfásico com um sinal verde, dois vermelhos e uma co-localização de sinais verde e vermelho (seta), indicativo da t(8;14). Fonte: SIEGEL, 2016.

### 5.2.1 Triagem e determinação das curvas concentração e tempo resposta dos análogos sintéticos que contêm o grupo 3,4,5-trimetoxifenila

Inicialmente foi avaliada a citotoxicidade dos 28 análogos sintéticos que contêm o grupo 3,4,5-trimetoxifenila pertencente às séries EtA, EtB, TAS, Ea e Eh. Como pode ser observado na Figura 17, os compostos **EtA04** e **Eh09** foram os que apresentaram maior redução da viabilidade celular quando comparadas aos grupos controle (células sem tratamento) nas linhagens de células Daudi e Jurkat.

Figura 17 - Triagem dos compostos com o grupo 3,4,5-trimetoxifenila em células Daudi e Jurkat.

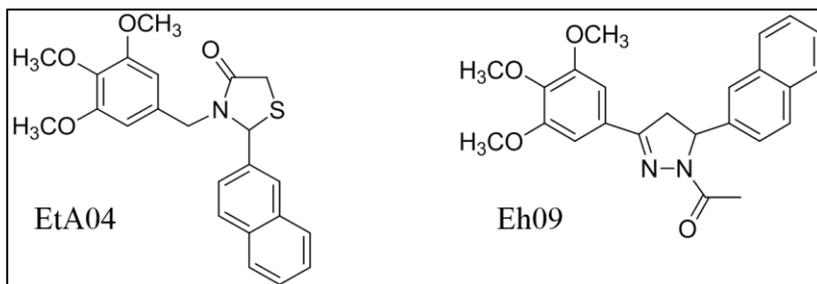


As células Daudi (A) ( $5 \times 10^4$  células/poço) e Jurkat (B) ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram incubadas com os análogos sintéticos que contêm o grupo 3,4,5-trimetoxifenila na concentração de  $100 \mu\text{M}$  por 24 h e a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. \* Diferença significativa em relação ao grupo controle (células sem tratamento). # Diferença estatística em relação ao grupo controle e aos demais tratamentos,  $p \leq 0,05$ . ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Tukey.

Os compostos EtA04 e Eh09 (Figura 18) foram selecionados para serem avaliados em diferentes concentrações (10 – 100  $\mu\text{M}$ ) nas linhagens Daudi e Jurkat em 24, 48 e 72 h. Como pode ser observado na Figura 19, ambos os compostos foram citotóxicos para as duas linhagens avaliadas, pois reduziram significativamente a viabilidade celular de forma dependente da concentração e do tempo de incubação. Os valores de  $\text{CI}_{50}$  calculados para os compostos estão demonstrados na Tabela 1.

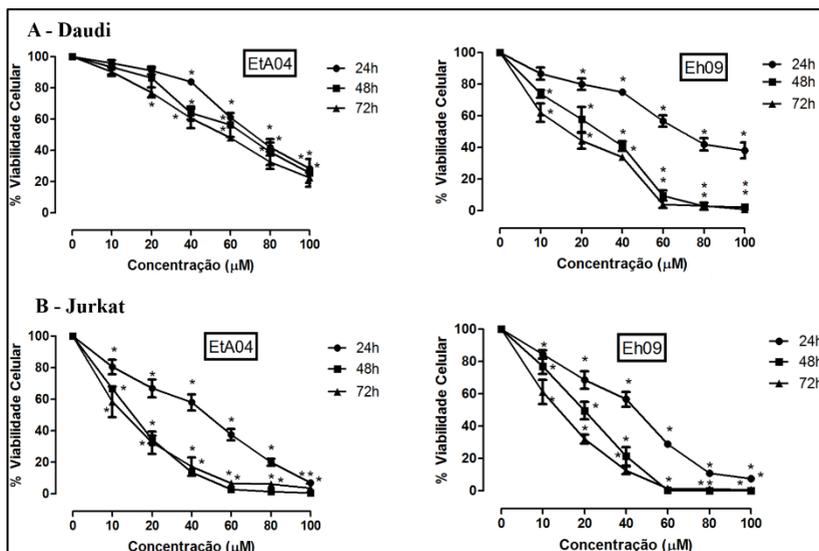
Os dois compostos selecionados apresentaram valores de  $\text{CI}_{50}$  elevados na linhagem de neoplasia linfóide madura Daudi, principalmente após 24 h de incubação. Já na linhagem de neoplasia linfóide imatura Jurkat, os compostos EtA04 e Eh09 apresentaram valores de  $\text{CI}_{50}$  iguais a  $33,2 \pm 1,1$  e  $35,2 \pm 1,2$   $\mu\text{M}$  após 24 h de incubação e, por isso, optou-se por dar continuidade aos experimentos apenas na linhagem Jurkat.

Figura 18 - Estrutura química dos compostos EtA04 e Eh09.



Fonte: A AUTORA.

Figura 19 - Curvas de concentração e tempo resposta dos compostos EtA04 e Eh09 nas linhagens Daudi (A) e Jurkat (B).



As células Daudi (A) e Jurkat (B) foram incubadas com os compostos selecionados nas concentrações 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µM por 24, 48 e 72 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa média ± EPM de três experimentos independentes. \* Diferença significativa em relação ao grupo controle (células sem tratamento),  $p \leq 0,05$ . ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Tabela 1 - Valores de  $CI_{50}$  (µM) calculados para as células Daudi e Jurkat após 24, 48 e 72 h de incubação com os compostos EtA04 e Eh09.

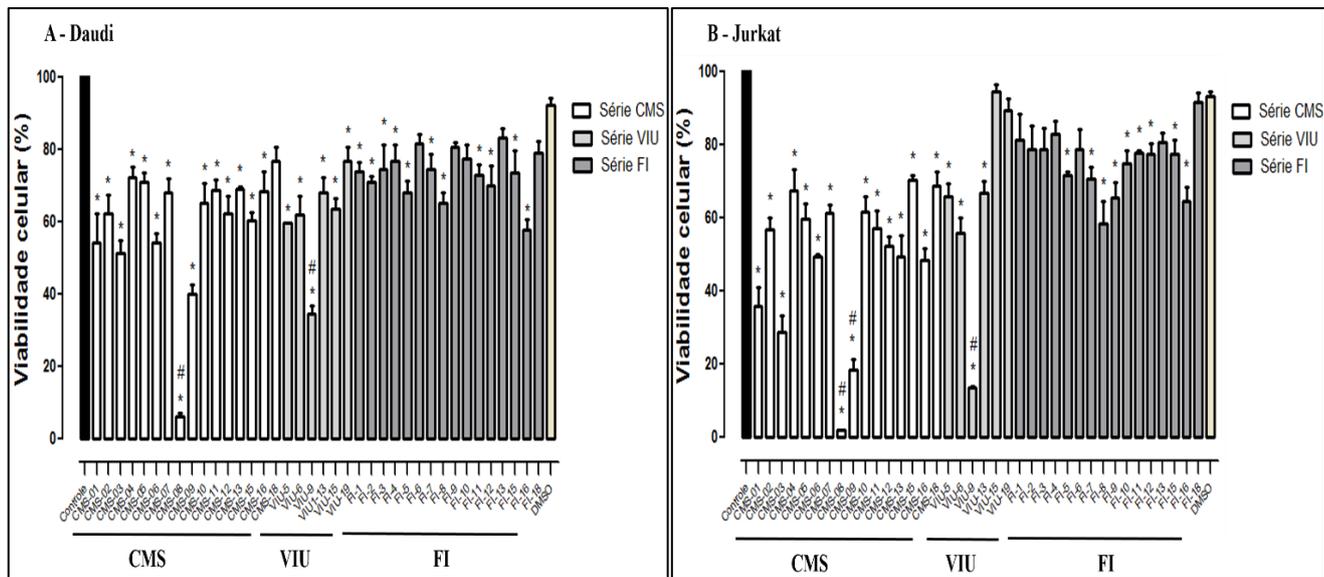
	Daudi		Jurkat	
	EtA04	Eh09	EtA04	Eh09
<b>24 h</b>	83,7 ± 2,6	74,4 ± 1,2	33,2 ± 1,1	35,2 ± 1,2
<b>48 h</b>	62,0 ± 1,6	17,6 ± 1,1	10,2 ± 0,6	13,8 ± 1,0
<b>72 h</b>	38,2 ± 0,6	13,4 ± 0,6	9,0 ± 0,5	9,8 ± 0,6

### 5.2.2 Triagem e determinação das curvas de concentração e tempo resposta das três séries de tiossemicarbazonas

Foi avaliado também o efeito citotóxico de 38 derivados de tiossemicarbazonas pertencentes às séries CMS, VIU e FI. Como pode ser

observado na Figura 20, os compostos CMS-08, CMS-09 e VIU-09 foram os que apresentaram maior redução da viabilidade celular em ambas as linhagens testadas quando comparados ao grupo controle (células sem tratamento). Os compostos **CMS-08** e **VIU-09** foram selecionados para serem testados em diferentes concentrações (1 – 100  $\mu$ M) nas linhagens Daudi e Jurkat, pois apresentaram reduções significativas da viabilidade celular nas duas linhagens celulares.

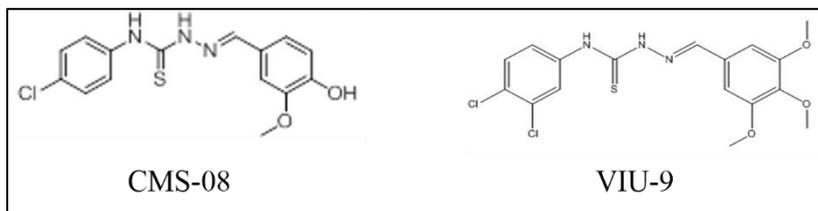
Figura 20 - Triagem dos derivados de tiossemicarbonos em células Daudi e Jurkat.



As células Daudi (A) ( $5 \times 10^4$  células/poço) e Jurkat (B) ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram incubadas com os derivados sintéticos na concentração de  $100 \mu\text{M}$  por 24 h e a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. \* Diferença significativa em relação ao grupo controle (células sem tratamento). # Diferença estatística em relação ao grupo controle e aos demais tratamentos,  $p \leq 0,05$ . ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Tukey.

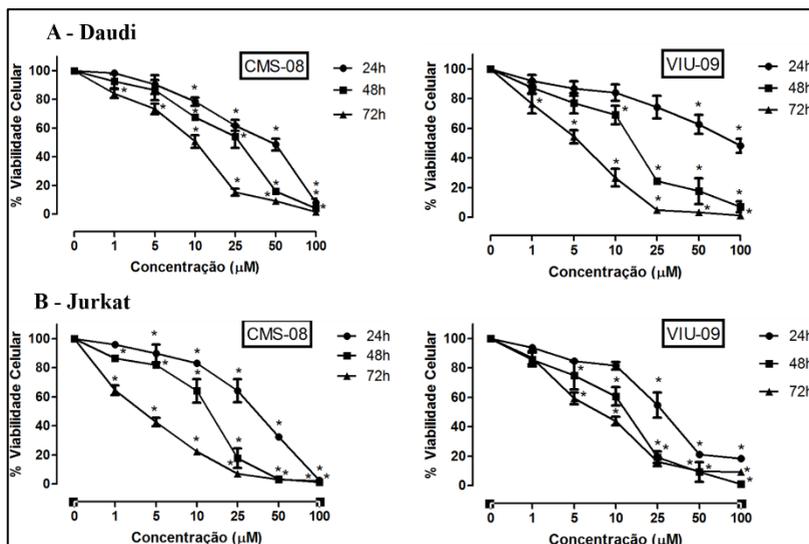
Os dois compostos selecionados, CMS-08 e VIU-09 (Figura 21), foram citotóxicos para as linhagens Daudi e Jurkat após 24, 48 e 72 h de incubação, pois reduziram significativamente a viabilidade celular de forma dependente da concentração e do tempo de incubação nas duas linhagens (Figura 22). Os valores de  $CI_{50}$  calculados para os dois compostos estão demonstrados na Tabela 2. Dos compostos avaliados, o **CMS-08** foi o que apresentou maior redução da viabilidade celular e valores mais baixos de  $CI_{50}$  nas duas linhagens celulares (Tabela 2) e, por isso, optou-se por dar continuidade somente à investigação desse composto referente à classe das tiossemicarbazonas.

Figura 21 - Estrutura química dos compostos CMS-08 e VIU-09.



Fonte: A AUTORA.

Figura 22 - Curvas de concentração e tempo resposta dos compostos CMS-08 e VIU-09 nas linhagens Daudi e Jurkat.



As células Daudi (A) e Jurkat (B) foram incubadas com os compostos selecionados, nas concentrações 1, 5, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$  por 24, 48 e 72 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa media  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \* Diferença significativa em relação ao grupo controle (células sem tratamento),  $p \leq 0,05$ . ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Tabela 2 - Valores de  $\text{CI}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) calculados nas células Daudi e Jurkat após 24, 48 e 72 h de incubação com os compostos CMS-08 e VIU-09.

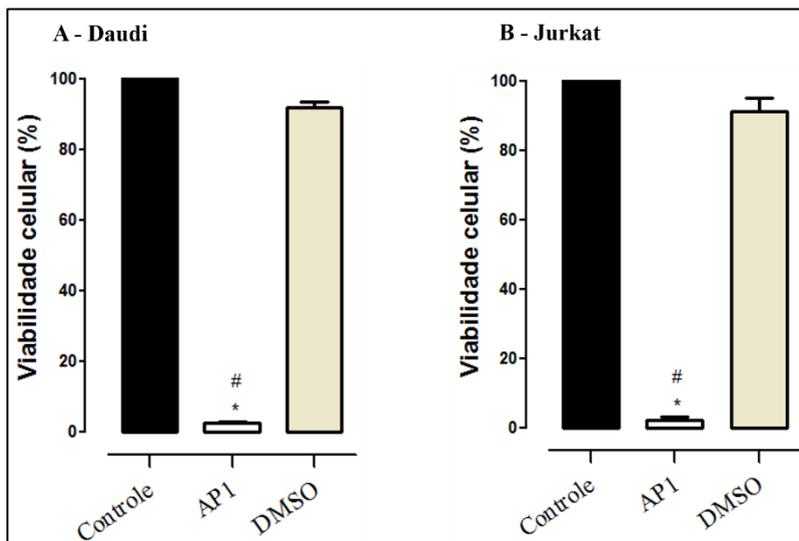
	Daudi		Jurkat	
	CMS-08	VIU-09	CMS-08	VIU-09
<b>24 h</b>	34,4 $\pm$ 1,1	79,5 $\pm$ 1,8	27,8 $\pm$ 1,4	25,3 $\pm$ 0,8
<b>48 h</b>	19,3 $\pm$ 0,8	13,9 $\pm$ 0,6	10,9 $\pm$ 0,8	10,2 $\pm$ 0,6
<b>72 h</b>	8,5 $\pm$ 0,4	4,0 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,2	7,0 $\pm$ 0,2

### 5.2.3 Triagem e determinação das curvas de concentração e tempo resposta do composto natural API

O efeito citotóxico do composto **API** (100  $\mu\text{M}$ ) foi inicialmente investigado em células de neoplasias linfoides Daudi e Jurkat (Figura 23),

e foi observada redução da viabilidade celular em ambas as linhagens celulares.

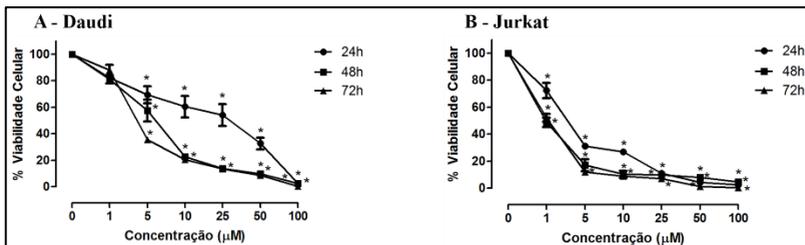
Figura 23 - Triagem do composto natural AP1 em células Daudi e Jurkat.



As células Daudi (A) ( $5 \times 10^4$  células/poço) e Jurkat (B) ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram incubadas com o composto natural AP1 na concentração de  $100 \mu\text{M}$  por 24 h e a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. \* Diferença significativa em relação ao grupo controle (células sem tratamento). # Diferença estatística em relação ao grupo controle e aos demais tratamentos,  $p \leq 0,05$ . ANOVA *one-way* seguida de teste post-hoc de Tukey.

Devido ao fato de o composto AP1 (Figura 9) ter causado elevadas reduções na viabilidade das células Daudi e Jurkat, as curvas de concentração e tempo resposta foram realizadas utilizando-se menores concentrações desse composto. Após análise dos resultados obtidos, observou-se redução da viabilidade celular de maneira dependente do tempo e da concentração e valores de  $\text{CI}_{50}$  baixos, principalmente em células Jurkat, na qual foi observada uma diferença significativa em relação ao grupo controle a partir de  $1 \mu\text{M}$  (Figura 24). Os valores de  $\text{CI}_{50}$  para as células Daudi e Jurkat estão descritos na Tabela 3.

Figura 24 - Curvas de concentração e tempo resposta do composto AP1 nas linhagens Daudi e Jurkat.



As células Daudi (A) e Jurkat (B) foram incubadas com o composto natural AP1, nas concentrações 1, 5, 10, 25, 50 e 100 µM por 24, 48 e 72 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa média ± EPM de três experimentos independentes. \* Diferença significativa em relação ao grupo controle (células sem tratamento), \* Diferença significativa em relação ao grupo controle (células sem tratamento),  $p \leq 0,05$ . ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Tabela 3 - Valores de  $CI_{50}$  (µM) calculados nas células Daudi e Jurkat após 24, 48 e 72 h de incubação com o composto AP1.

	Daudi	Jurkat
	AP1	
<b>24 h</b>	17,5 ± 0,8	2,7 ± 0,2
<b>48 h</b>	4,7 ± 0,3	1,0 ± 1,3
<b>72 h</b>	3,4 ± 0,2	0,9 ± 1,1

### 5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS EM CÉLULAS DO SP

#### 5.3.1 Investigação do efeito hemolítico induzido pelos compostos selecionados em eritrócitos humanos

O efeito dos compostos selecionados (EtA04, Eh09, CMS-08 e AP1) sobre eritrócitos de indivíduos considerados saudáveis foi avaliado pelo teste de hemólise e as taxas de hemólise obtidas estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Taxa de hemólise (%) provocada pelos compostos EtA04, Eh9, CMS-08 e AP1 nas concentrações de específicas.

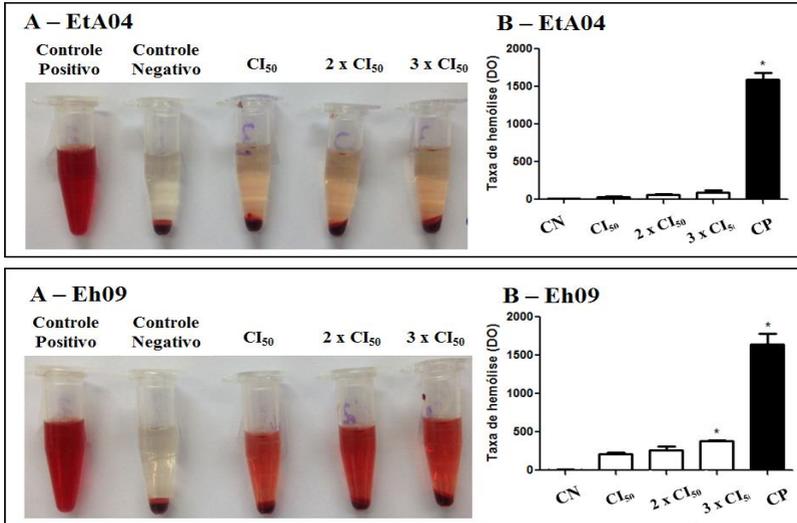
<b>Composto</b>	<b>CI<sub>50</sub></b>	<b>2 x CI<sub>50</sub></b>	<b>3 x CI<sub>50</sub></b>
<b>EtA04</b>	1,6 ± 1,0	3,4 ± 2,1	5,7 ± 3,3
<b>Eh09</b>	9,6 ± 5,5	14,2 ± 5,2	21,5 ± 6,5*
<b>CMS-08</b>	3,2 ± 1,6	3,6 ± 1,1	4,0 ± 0,4
<b>AP1</b>	1,1 ± 0,6	1,7 ± 0,1	2,4 ± 0,1

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

Para a avaliação dos compostos EtA04 e Eh09 foram utilizadas concentrações respectivas às suas CI<sub>50</sub>, dobro da CI<sub>50</sub> e triplo da CI<sub>50</sub> encontrada nas células Jurkat. Como pode ser observado na Figura 25, o composto EtA04 não provocou hemólise significativa quando comparado ao controle negativo. O composto Eh09 apresentou taxa de hemólise igual a 9,6%, 14,2% e 21,5%, o que caracteriza um efeito hemolítico significativo sobre os eritrócitos após a incubação com o triplo da CI<sub>50</sub>. Assim, considerando também que este composto apresentou valores mais elevados de CI<sub>50</sub> em células neoplásicas, optou-se por dar continuidade ao estudo apenas do composto EtA04 como representante dos análogos sintéticos que contêm o grupo 3,4,5-trimetoxifenila.

Para a avaliação do efeito dos compostos CMS-08 e AP1 nas células eritrocitárias, utilizaram-se três concentrações diferentes de cada composto (de uma até três vezes a CI<sub>50</sub> encontrada para as células Daudi por ser a maior CI<sub>50</sub> encontrada). Como pode ser observado na Figura 26, a incubação com CMS-08 e AP1 não resultou em hemólise significativa.

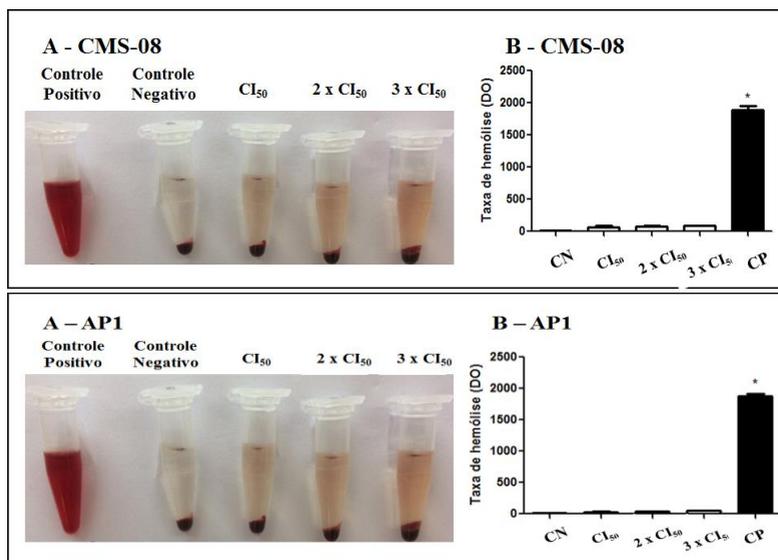
Figura 25 - Efeito dos compostos EtA04 e Eh09 sobre os eritrócitos do SP.



Em (A) pode-se observar uma imagem representativa da suspensão de hemácias após o tratamento com água destilada (controle positivo), salina (controle negativo) e com as três diferentes concentrações dos compostos EtA04 e Eh09. Em (B), a taxa de hemólise representada pela densidade óptica (DO) após tratamentos com os compostos. \*  $p \leq 0,05$ , ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Tukey.

Nota: CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo.

Figura 26 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 sobre os eritrócitos do SP.



Em (A) pode-se observar uma imagem representativa da suspensão de hemácias após o tratamento com água destilada (controle positivo), salina (controle negativo) e com as três diferentes concentrações dos compostos CMS-08 e AP1. Em (B), a taxa de hemólise representada pela densidade óptica (DO) após tratamentos com os compostos. \*  $p \leq 0,05$ , ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Tukey.

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo.

### 5.3.2 Efeito citotóxico dos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 em células mononucleadas de SP

A fim de investigar o efeito dos compostos selecionados em células não neoplásicas, foram utilizadas como modelo células mononucleadas de SP de seis indivíduos considerados saudáveis. Como pode ser observado na Figura 27, os compostos EtA04 e CMS-08, nas suas respectivas concentrações de CI<sub>50</sub> de 24 h, reduziram apenas cerca de 8% e 5% da viabilidade celular das células mononucleadas, respectivamente, ou seja, não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle (células sem tratamento). Já o composto AP1 levou a uma redução significativa da viabilidade das células

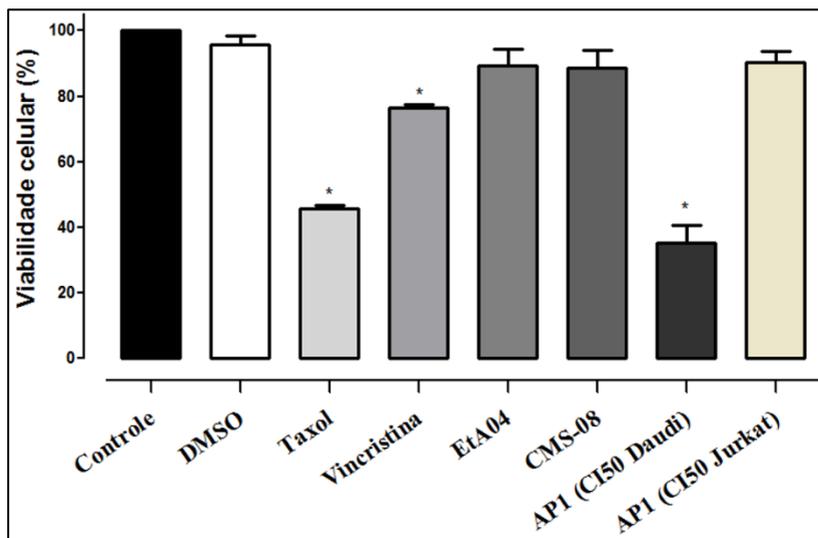
mononucleadas de SP (restaram  $35,4 \pm 9,0\%$  de células viáveis) quando incubados com a concentração referente à  $CI_{50}$  calculada para as células Daudi. No entanto, ao incubar as células mononucleadas com o composto AP1 na concentração da  $CI_{50}$  encontrada para as células Jurkat, semelhante à  $CI_{50}$  em células Daudi após incubação por 48 h, não foi observada redução significativa da viabilidade celular, pois o composto reduziu apenas cerca de 10% da quantidade de células viáveis.

Para fins de comparação com quimioterápicos utilizados na clínica, foi calculada a  $CI_{50}$  do fármaco vincristina em células Daudi e Jurkat e os valores encontrados foram utilizados para avaliação da citotoxicidade em células mononucleadas. Como resultado da curva concentração e tempo resposta utilizando a linhagem celular Daudi e o fármaco vincristina, obteve-se o valor de  $CI_{50}$  de 24 h de  $88,8 \pm 3,1 \mu\text{M}$ . O valor de  $CI_{50}$  de 24 h da vincristina em células Jurkat foi avaliado previamente no laboratório, corresponde a  $125,8 \pm 2,1 \mu\text{M}$  e foi utilizado para avaliação da toxicidade (STEFANES, 2018). A incubação com vincristina reduziu a viabilidade celular das células mononucleadas para  $76,6 \pm 2,2\%$ . Além disso, o tratamento com taxol ( $10 \mu\text{M}$ ) gerou uma redução na viabilidade celular para  $45,9 \pm 2,7\%$ . Após o tratamento com o veículo DMSO, na máxima concentração utilizada nos experimentos, observou-se  $97,3 \pm 2,1\%$  de células viáveis.

#### 5.4 EFEITO CITOTÓXICO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS SOBRE OUTRAS CÉLULAS DE LINHAGENS DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Devido à heterogeneidade encontrada nas doenças hematológicas, o efeito citotóxico dos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 foi avaliado em outras duas linhagens de células de neoplasias linfoides (Molt-4 e Namalwa), em uma linhagem de neoplasia mieloide (K562) e uma linhagem de MM (MM.1S).

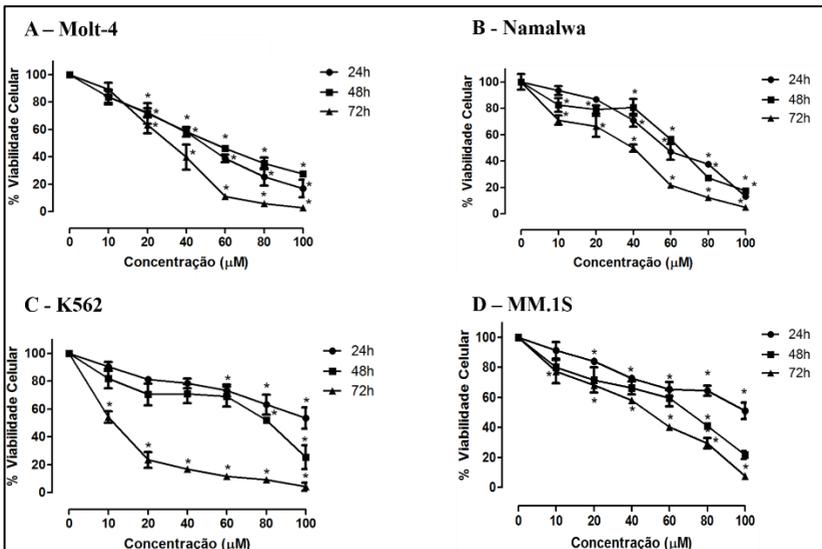
Figura 27 - Efeito citotóxico dos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 sobre células mononucleadas em comparação com os controles positivos (taxol e vincristina) e negativos (células sem tratamento e tratadas com DMSO 1%).



As células mononucleadas ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram incubadas por 24 h com os compostos EtA04, CMS-08 e AP1 nas suas  $CI_{50}$ . Foram utilizados os fármacos taxol e vincristina para fins de comparação, além do veículo DMSO na maior concentração utilizada nos experimentos. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT e a densidade óptica do grupo controle (células sem tratamento) foi definida como 100% de viabilidade celular. \*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $p \leq 0,05$ , ANOVA *one way* seguido de teste *post-hoc* de Tukey.

Conforme pode ser observado na Figura 28, o composto EtA04 reduziu significativamente a viabilidade celular das linhagens avaliadas de forma dependente da concentração e do tempo de incubação quando comparado ao grupo controle. Foi observada uma redução significativa da viabilidade celular em 24 h a partir de  $10 \mu\text{M}$  na linhagem Molt-4, a partir de  $40 \mu\text{M}$  nas linhagens MM.1S e Namalwa e a partir de  $60 \mu\text{M}$  na linhagem K562. Já em 72 h de incubação, o efeito citotóxico foi observado de forma significativa a partir de  $10 \mu\text{M}$  e  $20 \mu\text{M}$ , variando conforme o tipo celular. Os valores de  $CI_{50}$  encontrados para cada linhagem celular estão descritos na Tabela 5.

Figura 28 - Efeito citotóxico do composto EtA04 sobre células de neoplasias hematológicas.

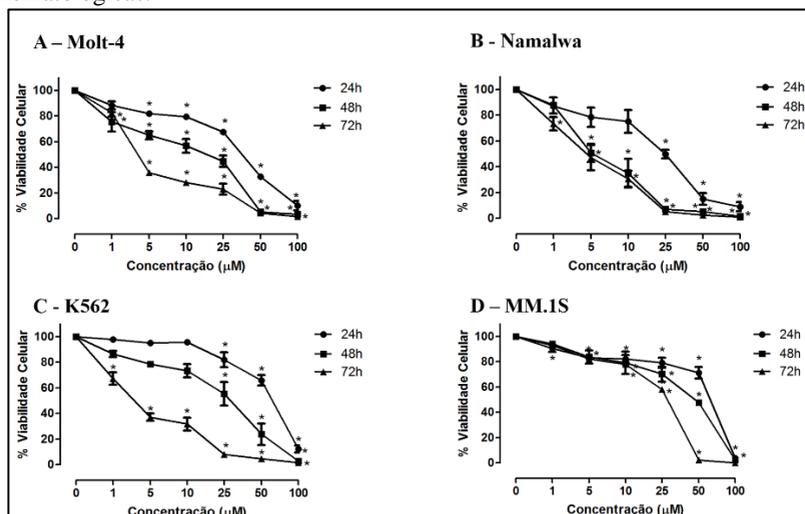


As células Molt-4, Namalwa, K562 e MM.1S foram incubadas com o composto EtA04 nas concentrações 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µM por 24, 48 e 72 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \* Diferença significativa em relação ao grupo controle (células sem tratamento). ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Após o tratamento com o composto CMS-08, pode-se observar uma redução significativa da viabilidade celular em 24 h a partir de 5 µM na linhagem Molt-4 e a partir de 25 µM nas linhagens Namalwa, K562 e MM.1S. Já em 72 h de incubação, o efeito citotóxico foi observado de forma significativa a partir de 1 µM em todas as linhagens (Figura 29).

Por fim, o composto AP1 também causou uma redução significativa da viabilidade celular dependente da concentração e do tempo de incubação quando comparado ao grupo controle nas três linhagens de células avaliadas (Figura 30). Foi observada uma redução significativa da viabilidade celular em todas as linhagens celulares, tanto em 24 h, como em 48 h e 72 h.

Figura 29 - Efeito citotóxico do composto CMS-08 sobre células de neoplasias hematológicas.

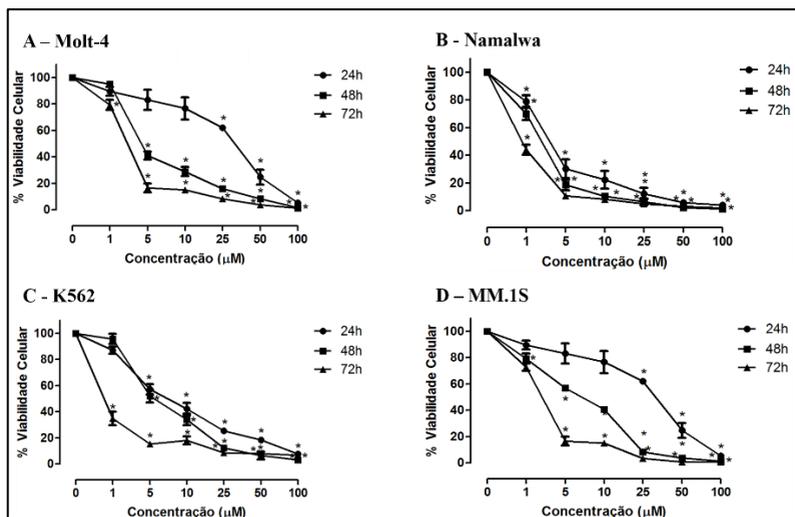


As células Molt-4, Namalwa, K562 e MM.1S foram incubadas com o composto CMS-08 nas concentrações 1, 5, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$  por 24, 48 e 72 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \* Diferença significativa em relação ao grupo controle (células sem tratamento). ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Tabela 5 - Valores de  $\text{CI}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) calculados nas células Molt-4, Namalwa, K562 e MM.1S após 24, 48 e 72 h de incubação com os compostos EtA04, CMS-08 e API.

	Molt-4	Namalwa	K562	MM.1S
<b>EtA04</b>				
<b>24 h</b>	48,3 $\pm$ 0,6	52,4 $\pm$ 2,0	> 100	97,7 $\pm$ 2,1
<b>48 h</b>	39,3 $\pm$ 1,0	45,5 $\pm$ 1,8	73,1 $\pm$ 2,7	67,6 $\pm$ 2,3
<b>72 h</b>	22,1 $\pm$ 1,6	24,3 $\pm$ 1,0	8,6 $\pm$ 0,4	36,7 $\pm$ 1,3
<b>CMS-08</b>				
<b>24 h</b>	25,9 $\pm$ 1,3	19,0 $\pm$ 0,8	61,9 $\pm$ 2,8	51,5 $\pm$ 3,0
<b>48 h</b>	10,8 $\pm$ 0,7	4,8 $\pm$ 0,3	20,6 $\pm$ 1,1	34,4 $\pm$ 1,9
<b>72 h</b>	3,7 $\pm$ 0,3	3,6 $\pm$ 0,3	2,9 $\pm$ 0,2	18,8 $\pm$ 1,6
<b>API</b>				
<b>24 h</b>	24,5 $\pm$ 1,3	2,8 $\pm$ 0,2	7,5 $\pm$ 0,2	12,3 $\pm$ 1,1
<b>48 h</b>	4,5 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,3	5,4 $\pm$ 0,3	4,8 $\pm$ 0,5
<b>72 h</b>	2,0 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,5

Figura 30 - Efeito citotóxico do composto AP1 sobre células de neoplasias hematológicas.



As células Molt-4, Namalwa, K562 e MM.1S foram incubadas com o composto AP1 nas concentrações 1, 5, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$  por 24, 48 e 72 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa media  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

## 5.5 CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

O IS dos compostos EtA-04, CMS-08 e AP1 foi obtido dividindo-se a  $CI_{50}$  de 24 h das linhagens de células K562 e MM.1S pela  $CI_{50}$  de 24 h das linhagens de neoplasias linfoides (Jurkat, Molt-4, Daudi e Namalwa). Como pode ser observado na Tabela 6, não foi possível calcular o IS do composto EtA04 com as células K562 pois o valor encontrado de  $CI_{50}$  de 24 h extrapolou a linearidade da curva ( $> 100 \mu\text{M}$ ). O composto EtA04 apresentou índice de seletividade moderado para as células de neoplasias linfoides imaturas (Jurkat e Molt-4) quando comparado à linhagem MM.1S e baixo para as neoplasias linfoides maduras (Daudi e Namalwa).

Tabela 6 - Índice de seletividade para os compostos EtA04, CMS-08 e AP1.

	EtA04		CMS-08		AP1	
	K562	MM.1S	K562	MM.1S	K562	MM.1S
<b>Jurkat</b>	--	2,9	2,2	1,8	2,8	4,5
<b>Molt-4</b>	--	2,0	2,1	1,7	0,3	0,5
<b>Daudi</b>	--	1,2	1,8	1,5	0,4	0,7
<b>Namalwa</b>	--	1,9	3,3	2,7	2,7	4,4

## 5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR

### 5.6.1 Efeito dos compostos no ciclo celular

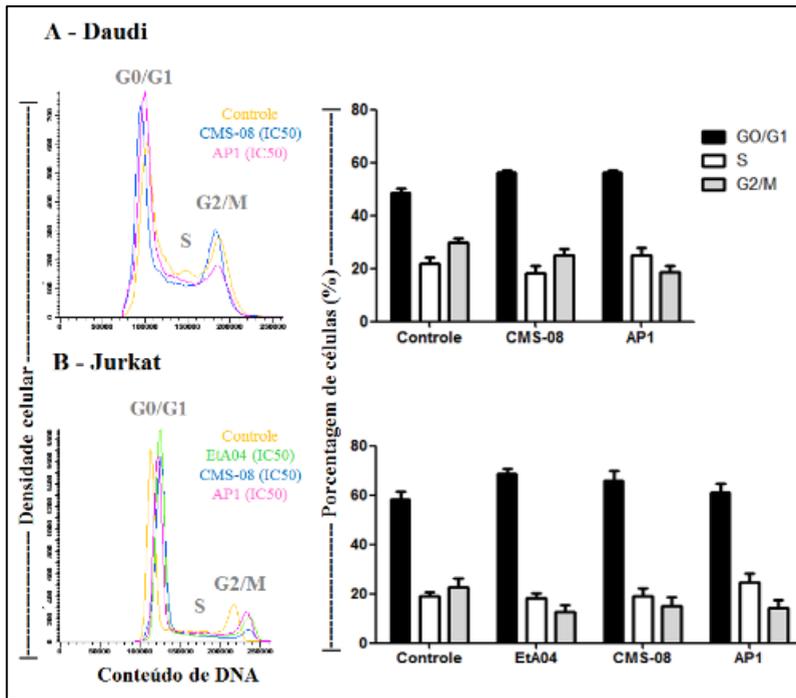
O efeito de EtA04, CMS-08 e AP1 na progressão do ciclo celular das linhagens Daudi e Jurkat foi avaliado após 24 h de incubação com os compostos com as respectivas  $CI_{50}$  de 24 h e os resultados estão descritos na Tabela 7. Em comparação com o grupo controle, os compostos EtA04, CMS-08 e AP1 causaram um aumento significativo na proporção de células na fase sub G0/G1 nas duas linhagens celulares, o que confirma o aumento da morte celular induzida pelos compostos. Como pode ser observado na Figura 31, não foram observadas diferenças na quantidade de células nas fases do ciclo celular após o tratamento com os compostos EtA04, CMS-08 e AP1 nas linhagens de células Daudi e Jurkat.

Tabela 7 - Efeito dos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 nas fases do ciclo celular de células Daudi e Jurkat.

	Células em ciclo celular			Células mortas
	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	SubG0/G1(%)
<b>Daudi</b>				
<b>Controle</b>	48,6 ± 1,5	21,7 ± 2,4	29,7 ± 1,9	11,8 ± 1,2
<b>CMS-08</b>	56,5 ± 0,4	18,4 ± 2,7	25,2 ± 2,2	38,5 ± 1,0*
<b>AP1</b>	53,4 ± 0,5	25,0 ± 2,7	18,6 ± 2,4	44,5 ± 2,2*
<b>Jurkat</b>				
<b>Controle</b>	58,2 ± 3,2	18,9 ± 1,9	22,8 ± 3,6	19,7 ± 4,6
<b>EtA04</b>	68,9 ± 2,0	18,3 ± 2,0	12,8 ± 2,5	43,5 ± 2,8*
<b>CMS-08</b>	65,8 ± 4,0	19,2 ± 3,1	15,0 ± 3,6	54,2 ± 5,2*
<b>AP1</b>	61,0 ± 3,8	24,7 ± 3,7	14,3 ± 3,1	48,9 ± 8,2*

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

Figura 31 - Efeitos dos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 nas células Daudi e Jurkat sobre o ciclo celular.



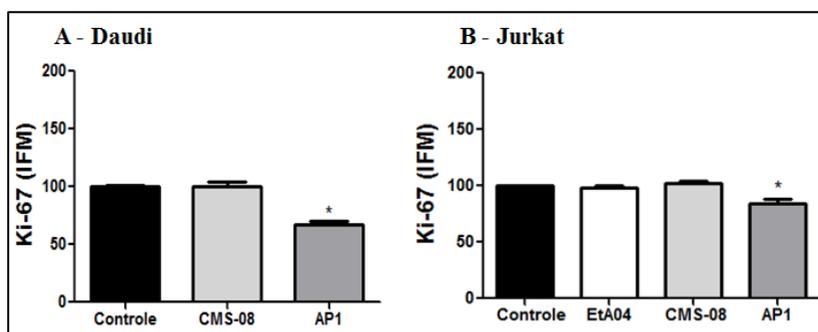
As células Daudi e Jurkat ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com os compostos EtA04, CMS-08 e AP1 nas respectivas  $CI_{50}$  por 24 h e os grupos controle correspondem às células sem tratamento. As fases estão representadas por G0/G1, S e G2/M. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II e avaliadas pelo software Infinicity versão 1.7 (Cytognos®). O histograma é ilustrativo de um experimento e os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes,  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle, ANOVA *one-way*, seguida de teste post-hoc de Bonferroni.

### 5.6.2 Efeito dos compostos sobre a proteína Ki-67

As células Daudi e Jurkat foram incubadas por 24 h com os compostos EtA04, CMS-08 e AP1 nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h, com o objetivo de investigar os seus efeitos na expressão da proteína Ki-67 por CF. Para a análise dos resultados, foi utilizado o valor da intensidade de fluorescência média (IFM) e o valor observado para o grupo controle

(células sem tratamento) foi considerado como 100%. Como pode ser observado na Figura 32, nas células Daudi, o composto CMS-08 não induziu diferença significativa na expressão de Ki-67 ( $100,5 \pm 3,5\%$ ), enquanto que o composto natural AP1 diminuiu de forma significativa a expressão dessa proteína ( $67,5 \pm 2,5\%$ ). Já nas células Jurkat, os compostos EtA04 e CMS-08 não alteraram a expressão de Ki-67 ( $98,4 \pm 1,6\%$  e  $102,3 \pm 2,2\%$ , respectivamente), enquanto que o composto AP1 também demonstrou uma redução significativa na expressão dessa proteína ( $84,3 \pm 3,8\%$ ).

Figura 32 - Efeito dos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 na expressão da proteína Ki-67 em células Daudi e Jurkat.



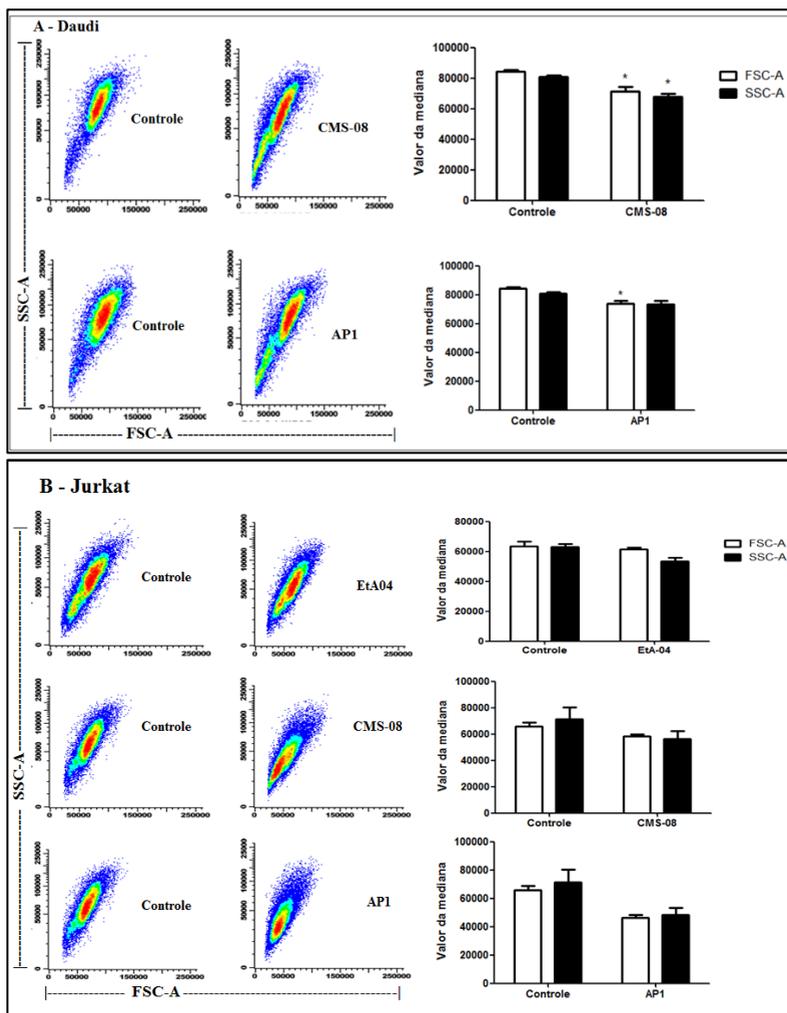
As células Daudi (A) e Jurkat (B) ( $1 \times 10^6$  células/poço), foram incubadas por 24 h na ausência, grupo controle, e na presença dos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h. A IFM foi determinada por CF após a marcação com o anticorpo anti-Ki-67 conjugado a FITC. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo software Infinicyt versão 1.7 (Cytognos®). IFM: Intensidade de fluorescência média. \* Diferença estatística em relação ao grupo controle,  $p \leq 0,05$ , teste t de *Student*.

## 5.7 DETERMINAÇÃO DA INDUÇÃO DA APOPTOSE

### 5.7.1 Análise da morfologia celular por CF após incubação com os compostos selecionados

Para avaliar o tamanho e a complexidade interna das células por CF após tratamento com EtA04, CMS-08 e AP1, as células Daudi e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com os compostos nas suas  $CI_{50}$  por 24 h. Como é possível observar no Painel A da Figura 33, as células Daudi apresentaram uma diminuição significativa na média de tamanho após o tratamento com CMS-08 e com AP1, e também na complexidade interna após o tratamento com CMS-08. Já com relação às células Jurkat (Figura 33 - Painel B), não foram observadas alterações no tamanho e na complexidade interna das células após o tratamento com EtA04, CMS-08 e AP1.

Figura 33 - Características de tamanho (FSC) e complexidade interna (SSC) das células Daudi e Jurkat após o tratamento com os compostos EtA04, CMS-08 e AP1.

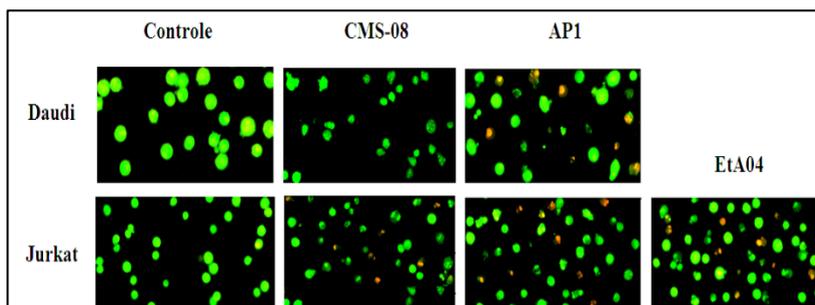


Para avaliar a morfologia celular por CF, as células Daudi (A) e Jurkat (B) ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram tratadas com os compostos EtA04, CMS-08 e AP1 nas suas  $CI_{50}$  de 24 h. Foram adquiridos um total de 50.000 eventos para cada amostra no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e os resultados foram analisados no software Infinicyt versão 1.7 (Cytognos®).

### 5.7.2 Avaliação da morfologia celular por microscopia de fluorescência com BE e LA

Para avaliar se a morte celular induzida pelos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 em células Daudi e Jurkat apresenta características morfológicas sugestivas de apoptose, foi realizada primeiramente a observação celular por microscopia de fluorescência após coloração com BE e LA. Após 18 h de incubação, as células viáveis apresentaram tamanho e coloração verde uniformes. Ao mesmo tempo, todas as linhagens celulares avaliadas demonstraram, após o tratamento com os compostos selecionados, características morfológicas típicas de células em apoptose tardia, como a formação de corpos apoptóticos e a perda de integridade da membrana plasmática (indicada pela fluorescência alaranjada) (Figura 34). O tratamento da linhagem celular Daudi com o composto CMS-08 apresentou principalmente células em apoptose em fase inicial, caracterizadas pela membrana plasmática íntegra (indicada pela fluorescência verde) com condensação da cromatina.

Figura 34 - Avaliação morfológica das células Daudi e Jurkat após tratamento com os compostos CMS-08, AP1 e EtA04.



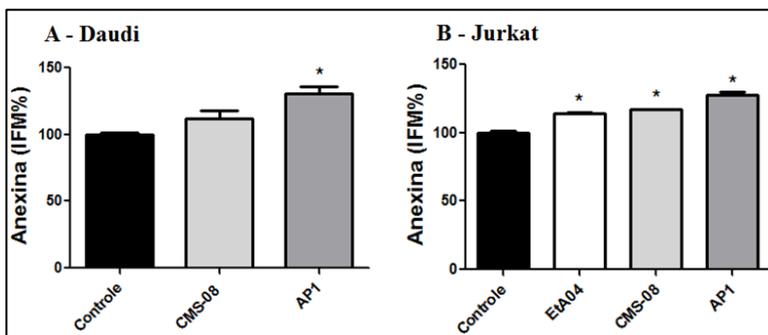
As células Daudi e Jurkat ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com os compostos na sua  $CI_{50}$  de 24 h por 18 h e então coradas com uma solução 1:1 de BE e LA. O grupo controle corresponde às células sem tratamento. As células foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX41) e campos representativos foram fotografados com câmera digital (Olympus BX40). Podem-se observar células em apoptose inicial ou tardia. As imagens são representativas de pelo menos dois experimentos independentes.

### 5.7.3 Detecção da externalização dos resíduos de fosfatidilserina por CF

A quantificação da exposição dos resíduos de fosfatidilserina foi realizada em células Daudi e Jurkat incubadas com os compostos EtA04, CMS-08 e AP1 por 18 e 24 h.

Como pode ser observado na Figura 35, o composto EtA04, nas células Jurkat, induziu um aumento significativo na exposição dos resíduos de fosfatidilserina de  $14,1 \pm 0,7\%$  em relação ao grupo controle. O composto AP1, nas células Daudi, induziu um aumento na exposição dos resíduos de fosfatidilserina de  $30,8 \pm 4,7\%$  em relação ao grupo controle e nas células Jurkat, de  $27,8 \pm 1,8\%$ . Com relação ao tratamento com o composto CMS-08, nas células Daudi não foi observado um aumento significativo da porcentagem de células positivas para anexina V quando comparado ao grupo controle ( $112,2 \pm 5,6\%$ ), já nas células Jurkat houve um aumento significativo de  $16,8 \pm 0,3\%$

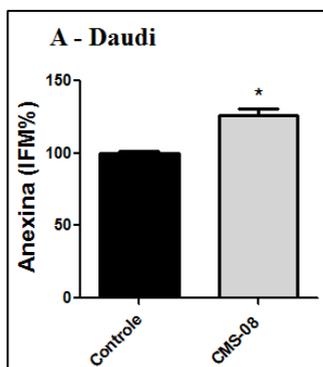
Figura 35 - Efeito dos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 na exposição dos resíduos de fosfatidilserina em células Daudi e Jurkat pelo método da anexina V conjugada a FITC após 18 h de incubação.



As células Daudi (A) e Jurkat (B) ( $1 \times 10^6$  células/poço), foram incubadas por 18 h na ausência (grupo controle) e na presença do composto EtA-04, CMS-08 e AP1 nas suas  $CI_{50}$  de 24 h. A exposição dos resíduos de fosfatidilserina foi determinada pela marcação com anexina V-FITC. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II e avaliadas pelo *software* *Infinicyt* versão 1.7. A IFM do grupo controle foi considerada como 100%. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, teste t de *Student*.

A fim de verificar se o tempo de incubação das células Daudi com o composto CMS-08 é um fator determinante na exposição dos resíduos de fosfatidilserina, foram realizados novos experimentos nessa linhagem celular, nas mesmas condições anteriores, porém com 24 h de incubação com o composto. Na Figura 36 pode-se observar que, nas células Daudi, o composto CMS-08 provocou um aumento significativo de  $25,8 \pm 4,6\%$  na porcentagem de células positivas para anexina V quando comparado ao grupo controle após 24 h de incubação.

Figura 36 - Efeito do composto CMS-08 na exposição dos resíduos de fosfatidilserina em células Daudi pelo método da anexina V conjugada a FITC após 24 h de incubação.

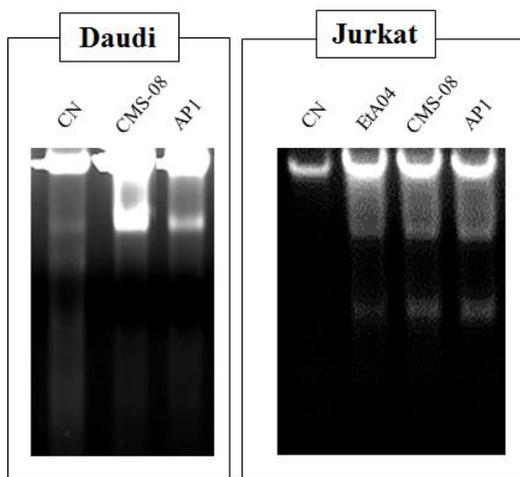


As células Daudi (A) ( $1 \times 10^6$  células/poço), foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença do composto CMS-08 na sua  $CI_{50}$  de 24 h. A exposição dos resíduos de fosfatidilserina foi determinada pela marcação com Anexina V-FITC. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7. A IFM do grupo controle foi considerada como 100%. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, teste t de *Student*.

#### 5.7.4 Avaliação da Apoptose pelo Método de Fragmentação do DNA

Para avaliar a fragmentação do DNA, as células Daudi e Jurkat ( $3,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com os compostos selecionados nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h. Na Figura 37 é possível observar o padrão de fragmentação “em escada” característico de células em apoptose para ambas as linhagens tratadas com EtA04, CMS-08 e AP1.

Figura 37 - Efeito dos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 na fragmentação do DNA de células Daudi e Jurkat.



As células Daudi e Jurkat ( $3 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com os compostos EtA04, CMS-08 e AP1 na  $CI_{50}$  de 24 h. O controle negativo (CN) representa as células sem tratamento. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e o DNA foi extraído e separado por eletroforese em gel de agarose 2% e corado com brometo de etídio ( $1 \mu\text{g/mL}$ ). Por fim, foram visualizados e fotografados sob iluminação UV de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT® Biosystems).

## 5.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS SOBRE A MITOCÔNDRIA

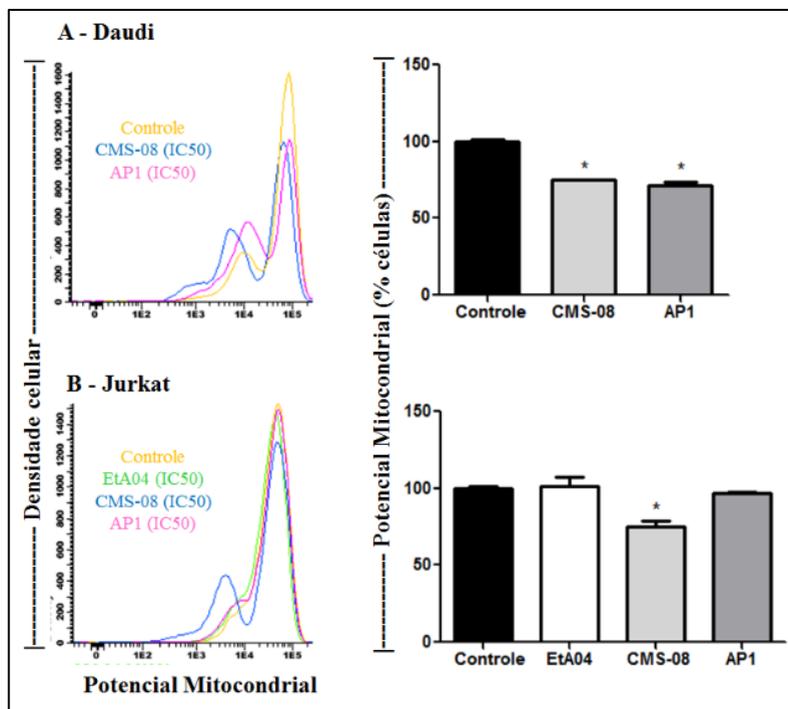
### 5.8.1 Avaliação do comprometimento do potencial mitocondrial

Com o objetivo de avaliar se a morte celular causada pelos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 está relacionada à apoptose intrínseca, o  $\Delta\Psi_m$  das células Daudi e Jurkat foi analisado após 18 e 24 h de tratamento com cada composto selecionado nas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h.

Como pode ser observado na Figura 38, após 18 h de tratamento, o composto CMS-08 reduziu de forma significativa a porcentagem de células com o  $\Delta\Psi_m$  intacto na linhagem celular Daudi ( $75,3 \pm 0,1\%$ ) e nas células Jurkat ( $74,9 \pm 3,7$ ). O composto AP1 levou a uma redução significativa ( $71,1 \pm 2,8\%$ ) na porcentagem de células com  $\Delta\Psi_m$  intacto

na linhagem celular Daudi, porém a diminuição não foi significativa ( $96,6 \pm 1,2$ ) nas células Jurkat. E, por fim, o composto EtA-04 não reduziu ( $101,2 \pm 6,0\%$ ) a porcentagem de células Jurkat com o  $\Delta\Psi_m$  intacto.

Figura 38 - Efeito dos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 no  $\Delta\Psi_m$  de células Daudi e Jurkat após incubação por 18 h.

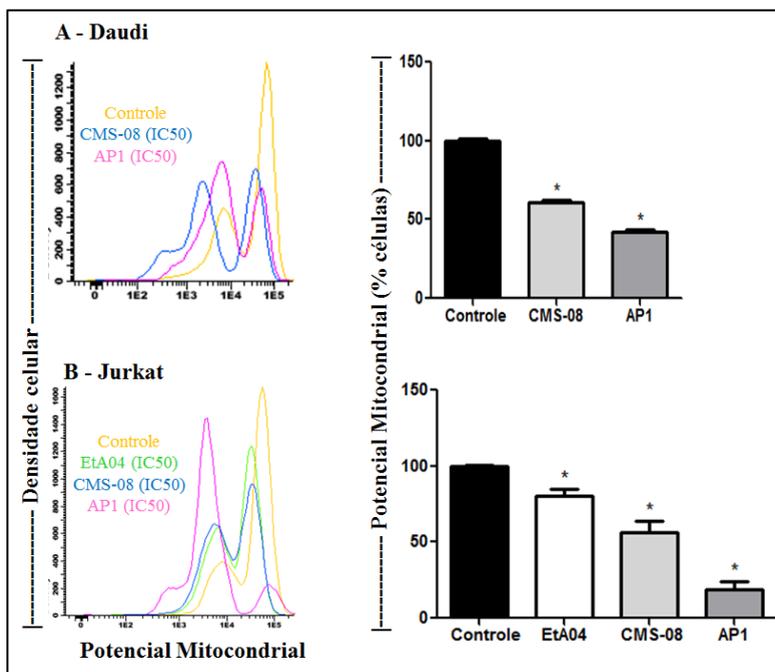


As células Daudi e Jurkat ( $1 \times 10^6$  células/poço), foram incubadas por **18 h** na ausência, grupo controle (gráfico preto), e na presença do composto EtA04, CMS-08 e AP1 nas suas  $CI_{50}$  de 24 h. O percentual de células com o  $\Delta\Psi_m$  intacto foi determinado por CF após a utilização do kit *MitoView* 633. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo software Infinicity 1.7 (Cytognos®). O histograma é ilustrativo de um experimento e os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes. \* Diferença significativa em relação ao grupo controle,  $p \leq 0,05$ , teste t de Student.

O experimento também foi realizado com o tempo de incubação de 24 h e, nesse caso, como pode ser observado na Figura 39, após o

tratamento com CMS-08, foi observada uma redução significativa na porcentagem de células com  $\Delta\Psi_m$  intacto nas linhagens celulares Daudi (61,2  $\pm$  1,3%) e Jurkat (56,2  $\pm$  7,4). O composto AP1 também reduziu de forma significativa a porcentagem de células com  $\Delta\Psi_m$  intacto na linhagem Daudi (42,3  $\pm$  1,1%) e Jurkat (18,6  $\pm$  5,6%). Além disso, pode-se observar que o composto EtA04 também reduziu de forma significativa (80,2  $\pm$  4,3%) a quantidade de células Jurkat com o  $\Delta\Psi_m$  intacto.

Figura 39 - Efeito dos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 no  $\Delta\Psi_m$  de células Daudi e Jurkat após incubação por 24 h.



As células Daudi e Jurkat ( $1 \times 10^6$  células/poço), foram incubadas por **24 h** na ausência, grupo controle (gráfico preto), e na presença do composto EtA04, CMS-08 e AP1 nas suas  $CI_{50}$  de 24 h. O percentual de células com o  $\Delta\Psi_m$  intacto foi determinado por CF após a utilização do kit *MitoView* 633. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo software InFinicity 1.7 (Cytognos®). O histograma é ilustrativo de um experimento e os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes. \* Diferença significativa em relação ao grupo controle,  $p \leq 0,05$ , teste t de *Student*.

## 5.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA MORTE CELULAR

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos anteriores, optou-se por dar continuidade aos estudos apenas com os compostos CMS-08 e AP1, pois foram considerados como os mais promissores. Além disso, padronizou-se o tempo de incubação de 24 h, pois foi aquele no qual as alterações induzidas pelos compostos em células neoplásicas foram mais bem evidenciadas.

### 5.9.1 Investigação do efeito dos compostos CMS-08 e AP1 sobre proteínas envolvidas na apoptose intrínseca

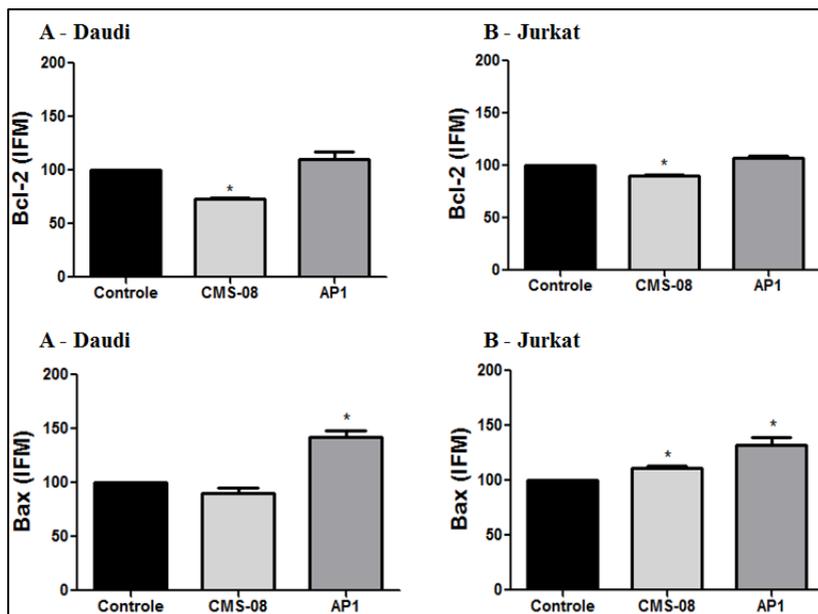
#### 5.9.1.1 Efeito dos compostos sobre a proteína antiapoptótica Bcl-2 e sobre a proteína pró-apoptótica Bax

Como pode ser observado na Figura 40, após 24 h de tratamento, o composto CMS-08 reduziu significativamente a expressão de Bcl-2 nas células Daudi ( $73,0 \pm 1,2\%$ ) e nas células Jurkat ( $90,0 \pm 1,2\%$ ). Já o composto AP1 não causou diferença significativa na expressão de Bcl-2 nas células Daudi ( $110,2 \pm 6,8\%$ ) e Jurkat ( $107,0 \pm 2,5\%$ ), quando comparados aos respectivos controles sem tratamento (100%).

Com relação à proteína Bax, a Figura 40 mostra que o composto CMS-08 não causou alteração significativa na expressão dessa proteína nas células Daudi ( $90,4 \pm 4,3\%$ ), mas aumentou de forma significativa nas células Jurkat ( $111,7 \pm 1,3\%$ ) após 24 h de tratamento. Em contrapartida, o composto AP1 causou um aumento significativo na expressão de Bax em ambas as linhagens Daudi ( $142,3 \pm 6,2\%$ ) e Jurkat ( $132,3 \pm 6,3\%$ ).

Quando analisada a razão entre os valores de IFM encontrados para a proteína antiapoptótica Bcl-2 e para a proteína pró-apoptótica Bax (Tabela 8), pode-se observar que há o predomínio da expressão da proteína Bax em relação à proteína Bcl-2 em todas as linhagens celulares tratadas com a tiossemicarbazona CMS-08 ou com a plastoquinona AP1.

Figura 40 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 na expressão das proteínas Bcl-2 e Bax em células Daudi e Jurkat.



As células Daudi (A) e Jurkat (B) ( $1 \times 10^6$  células/poço), foram incubadas por 24 h na ausência, grupo controle, e na presença dos compostos CMS-08 e AP1 nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h. A IFM foi determinada por CF após a marcação com o anticorpo anti-Bcl-2 conjugado a FITC e anti-Bax conjugado a PercP. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo software Infinicyt versão 1.7 (Cytognos®). IFM: Intensidade de fluorescência média. \*Diferença estatística em relação ao grupo controle,  $p \leq 0,05$ , teste t de *Student*.

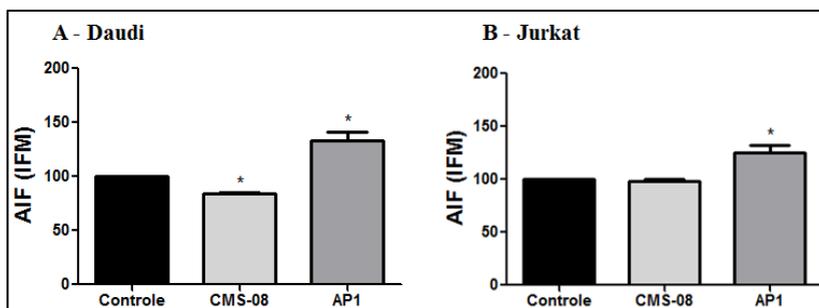
Tabela 8 - Razão entre a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e a proteína pró-apoptótica Bax.

Compostos	Células	Razão Bcl-2/Bax
CMS-08	Daudi	0,8
	Jurkat	0,7
AP1	Daudi	0,8
	Jurkat	0,8

### 5.9.1.2 Efeito dos compostos sobre a proteína pró-apoptótica AIF

Na Figura 41, após 24 h de incubação com o composto CMS-08, pode-se observar uma diminuição na expressão de AIF nas células Daudi (84,0%  $\pm$  1,3%), mas não houve diferença estatística em relação ao grupo controle nas células Jurkat (98,0%  $\pm$  2,5%). Já o composto AP1 aumentou significativamente a expressão de AIF em 33,3%  $\pm$  8,1% e 25,7%  $\pm$  6,9% nas células Daudi e Jurkat, respectivamente.

Figura 41 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 na expressão da proteína AIF em células Daudi e Jurkat.



As células Daudi (A) e Jurkat (B) ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência, grupo controle, e na presença dos compostos CMS-08 e AP1 nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h. A IFM foi determinada por CF após a marcação com o anticorpo anti-AIF conjugado a FITC. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo software Infinicyt versão 1.7 (Cytognos®). IFM: Intensidade de fluorescência média. \*Diferença estatística em relação ao grupo controle,  $p \leq 0,05$ , teste t de Student.

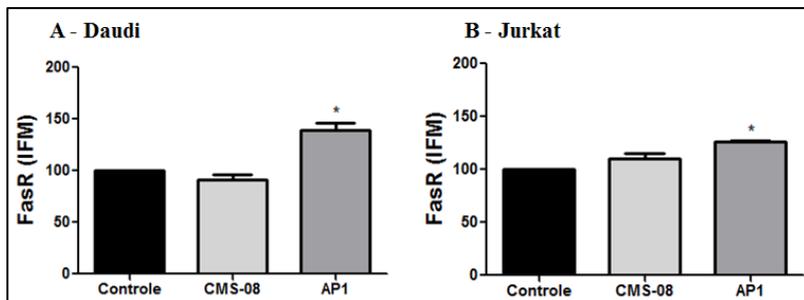
## 5.9.2 Investigação do efeito dos compostos CMS-08 e AP1 sobre proteínas envolvidas na apoptose extrínseca

### 5.9.2.1 Efeito dos compostos sobre o receptor de membrana Fas

Como pode ser observado na Figura 42, após 24 h de incubação com o composto CMS-08, não houve diferença significativa na expressão do receptor Fas em células Daudi (91,7  $\pm$  5,0%) e Jurkat (110,0  $\pm$  4,9%).

No entanto, houve um aumento significativo na expressão de FasR em ambas as linhagens celulares incubadas com o composto AP1, com acréscimo de  $39,5\% \pm 7,1\%$  e  $26,0\% \pm 1,0\%$  em relação ao grupo controle nas células Daudi e Jurkat, respectivamente.

Figura 42 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 na expressão da proteína FasR em células Daudi e Jurkat.

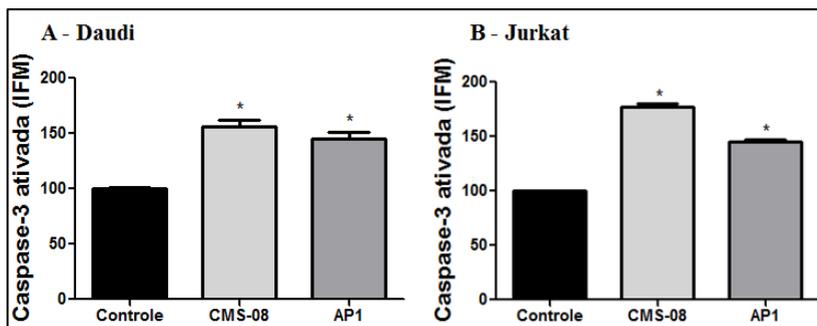


As células Daudi (A) e Jurkat (B) ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência, grupo controle, e na presença dos compostos CMS-08 e AP1 nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h. A IFM foi determinada por CF após a marcação com o anticorpo anti-FasR conjugado a PE. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo software Infinicyt versão 1.7 (Cytognos®). IFM: Intensidade de fluorescência média. \*Diferença estatística em relação ao grupo controle,  $p \leq 0,05$ , teste t de *Student*.

### 5.9.3 Investigação do efeito dos compostos CMS-08 e AP1 sobre a caspase-3 ativada

Como pode ser observado na Figura 43, o composto CMS-08 aumentou significativamente a expressão de caspase-3 ativada em  $56,0\% \pm 6,0\%$  nas células Daudi e em  $77,0\% \pm 3,5\%$  nas células Jurkat quando comparados aos grupos controle (sem tratamento). Com relação ao composto AP1, também foram observados aumentos significativos na expressão de caspase-3 ativada para ambas as linhagens celulares, com um aumento de  $45,5\% \pm 5,5\%$  para a Daudi e de  $45,0\% \pm 2,0\%$  para a Jurkat.

Figura 43 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 na expressão da proteína caspase-3 ativada em células Daudi e Jurkat.

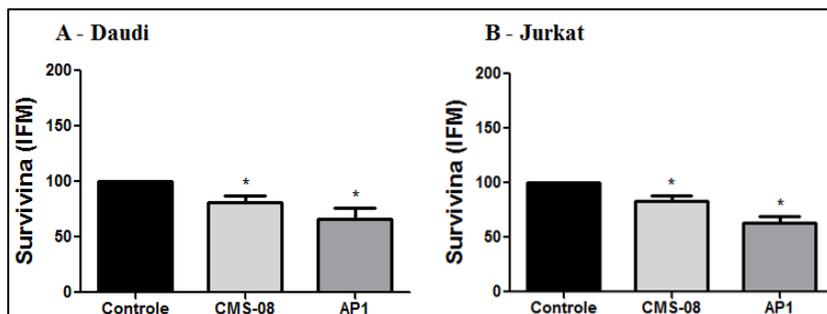


As células Daudi (A) e Jurkat (B) ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência, grupo controle, e na presença dos compostos CMS-08 e AP1 nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h. A IFM foi determinada por CF após a marcação com o anticorpo anti-caspase-3 ativada conjugado a V450. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo software Infinicyt versão 1.7 (Cytognos®). IFM: Intensidade de fluorescência média. \*Diferença estatística em relação ao grupo controle,  $p \leq 0,05$ , teste t de *Student*.

#### 5.9.4 Efeito dos compostos sobre a proteína antiapoptótica survivina

Como pode ser observado na Figura 44, após 24 h de incubação com o composto CMS-08 houve uma redução significativa na expressão de survivina nas células Daudi ( $81,0\% \pm 6,43\%$ ) e nas células Jurkat ( $83,3 \pm 4,6\%$ ). O tratamento com o composto AP1 também causou uma redução significativa na expressão de survivina nas células Daudi ( $66,0\% \pm 9,9\%$ ) e Jurkat ( $63,1 \pm 6,0\%$ ).

Figura 44 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 na expressão da proteína survivina em células Daudi e Jurkat.

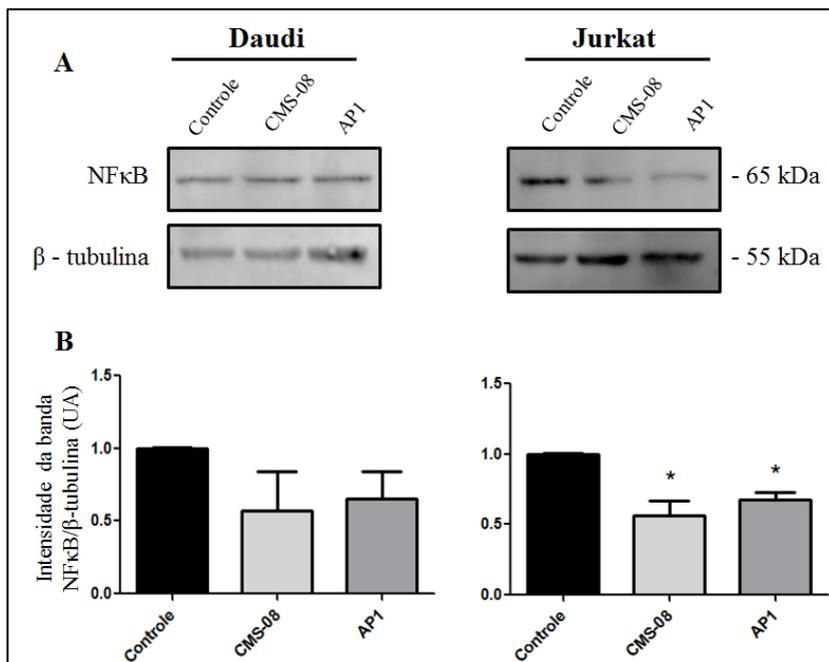


As células Daudi (A) e Jurkat (B) ( $1 \times 10^6$  células/poço), foram incubadas por 24 h na ausência, grupo controle, e na presença dos compostos CMS-08 e AP1 nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h. A IFM foi determinada por CF após a marcação com o anticorpo anti-survivina conjugado a PE. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo software Infinicyt versão 1.7 (Cytognos®). IFM: Intensidade de fluorescência média. \*Diferença estatística em relação ao grupo controle,  $p \leq 0,05$ , teste t de *Student*.

### 5.9.5 Investigação do efeito dos compostos CMS-08 e AP1 sobre o NF $\kappa$ B

Conforme demonstrado na Figura 45, os compostos CMS-08 e AP1 causaram uma redução significativa na expressão da proteína NF $\kappa$ B na linhagem Jurkat. Em células Daudi, foi observada uma tendência à redução da expressão de NF $\kappa$ B após incubação com ambos os compostos, porém não foi significativa.

Figura 45 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 na expressão da proteína NFκB nas células Daudi e Jurkat.

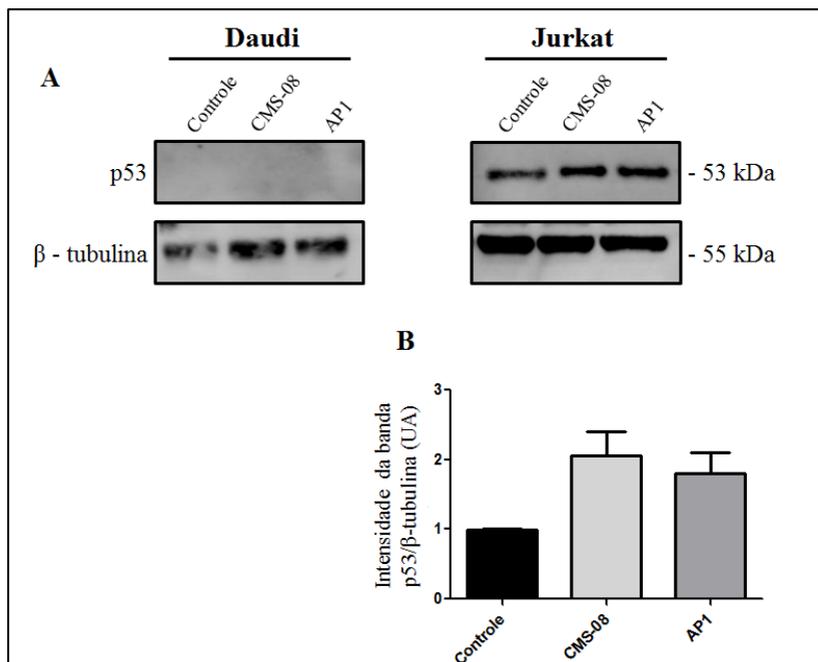


As células Daudi e Jurkat ( $4 \times 10^6$  células) foram incubadas por 24 h na ausência, grupo controle, e na presença dos compostos CMS-08 e AP1 nas  $CI_{50}$  de 24 h. A avaliação da expressão de NFκB foi realizada por WB e a proteína β-tubulina foi utilizada como controle da reação. Em (A) estão demonstradas imagens representativas e, em (B) os resultados da quantificação de proteínas que representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes. UA: Unidades arbitrárias. \* Diferença estatística em relação ao grupo controle,  $p \leq 0,05$ , teste t de Student.

### 5.9.6 Investigação do efeito dos compostos CMS-08 e AP1 sobre a expressão de p53

Conforme demonstrado na Figura 46, não foi observada banda compatível com a proteína p53 em células Daudi. Na linhagem Jurkat, apesar de ter sido observada uma tendência ao aumento da expressão de p53 após incubação com os compostos CMS-08 e AP1, esse não foi significativo.

Figura 46 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 na expressão da proteína p53 nas células Daudi e Jurkat.



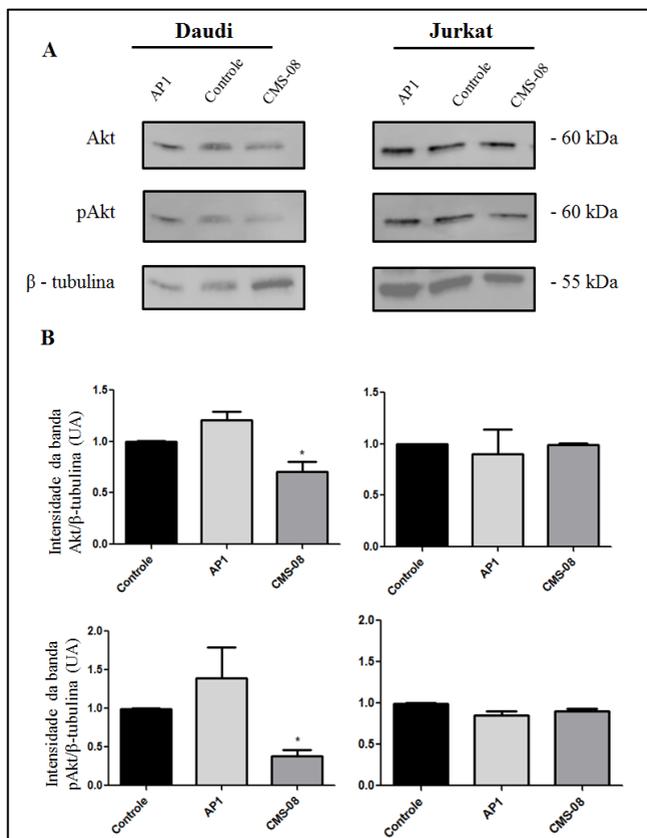
As células Daudi e Jurkat ( $4 \times 10^6$  células), foram incubadas por 24 h na ausência, grupo controle, e na presença dos compostos CMS-08 e AP1 nas  $CI_{50}$  de 24 h. A avaliação da expressão de p53 foi realizada por WB e a proteína  $\beta$ -tubulina foi utilizada como controle da reação. Em (A) estão demonstradas imagens representativas e, em (B) os resultados da quantificação de proteínas que representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes com a linhagem celular Jurkat. UA: Unidades arbitrárias. \* Diferença estatística em relação ao grupo controle,  $p \leq 0,05$ , teste t de Student.

### 5.9.7 Investigação do efeito dos compostos CMS-08 e AP1 sobre a via PI3K/Akt/mTOR pela expressão de Akt1/2/3 e pAkt1/2/3

Após a incubação com o composto CMS-08, pode-se observar uma redução na expressão das proteínas Akt e pAkt na linhagem de células Daudi ( $0,70 \pm 0,10$  e  $0,38 \pm 0,08$ , respectivamente) com relação ao controle sem tratamento, mas o mesmo não foi observado em células

Jurkat. Já o composto AP1 não induziu um aumento significativo na expressão dessas proteínas em nenhuma das duas linhagens celulares avaliadas (Figura 47).

Figura 47 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 na expressão das proteínas Akt e pAkt nas células Daudi e Jurkat.

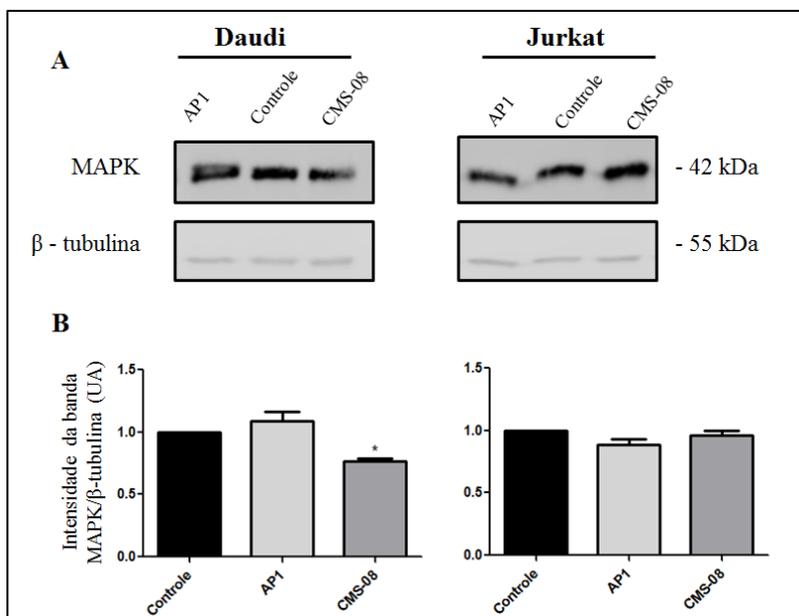


As células Daudi e Jurkat ( $4 \times 10^6$  células), foram incubadas por 24 h na ausência, grupo controle, e na presença dos compostos CMS-08 e AP1 nas  $CI_{50}$  de 24 h. A avaliação da expressão de Akt e pAkt foi realizada por WB e a proteína  $\beta$ -tubulina foi utilizada como controle da reação. Em (A) estão demonstradas imagens representativas e, em (B) os resultados da quantificação de proteínas que representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes. UA: Unidades arbitrárias. \* Diferença estatística em relação ao grupo controle,  $p \leq 0,05$ , teste t de Student.

### 5.9.8 Investigação do efeito dos compostos CMS-08 e AP1 sobre a via MAPK/ERK pela expressão de MAP cinase/ERK2

Após incubação com o composto CMS-08, pode-se observar uma redução significativa na expressão da proteína MAP cinase/ERK2 na linhagem de células Daudi ( $0,77 \pm 0,02$ ) com relação ao controle sem tratamento, porém o mesmo não ocorreu em células Jurkat. Já o composto AP1 não alterou a expressão de MAP cinase/ERK2 em ambas as linhagens avaliadas (Figura 48).

Figura 48 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 na expressão da proteína MAP cinase/ERK2 nas células Daudi e Jurkat.

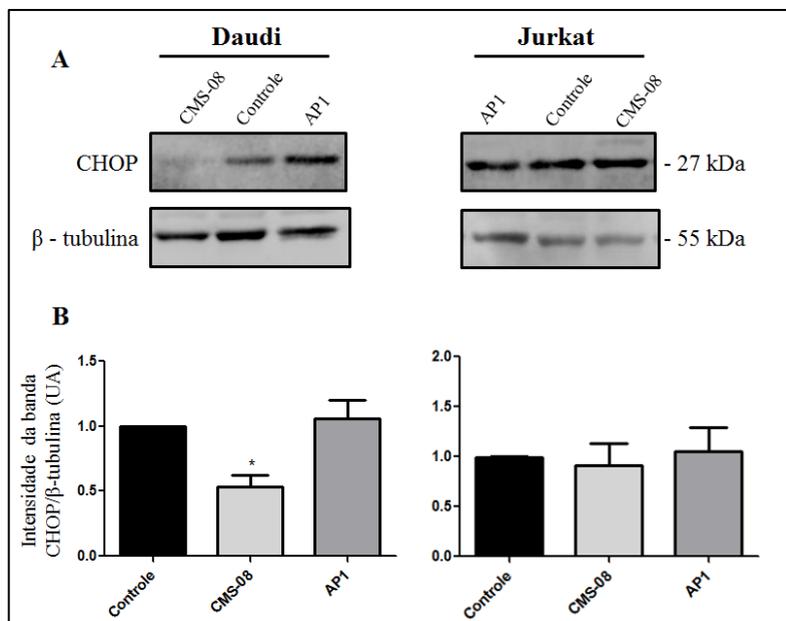


As células Daudi e Jurkat ( $4 \times 10^6$  células), foram incubadas por 24 h na ausência, grupo controle, e na presença dos compostos CMS-08 e AP1 nas  $CI_{50}$  de 24 h. A avaliação da expressão de MAP cinase ERK2 foi realizada por WB e a proteína  $\beta$ -tubulina foi utilizada como controle da reação. Em (A) estão demonstradas imagens representativas e, em (B) os resultados da quantificação de proteínas que representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes. UA: Unidades arbitrárias. \* Diferença estatística em relação ao grupo controle,  $p \leq 0,05$ , teste t de Student.

### 5.9.9 Investigação do efeito dos compostos CMS-08 e AP1 sobre o RE pela expressão de CHOP

Após a incubação com o composto CMS-08, pode-se observar uma redução significativa na expressão da proteína CHOP na linhagem de células Daudi ( $0,54 \pm 0,08$ ), porém o composto não alterou a expressão dessa proteína em células Jurkat. De forma semelhante, o composto AP1 não foi capaz de modular a expressão de CHOP nas linhagens avaliadas (Figura 49).

Figura 49 - Efeito dos compostos CMS-08 e AP1 na expressão da proteína CHOP nas células Daudi e Jurkat.



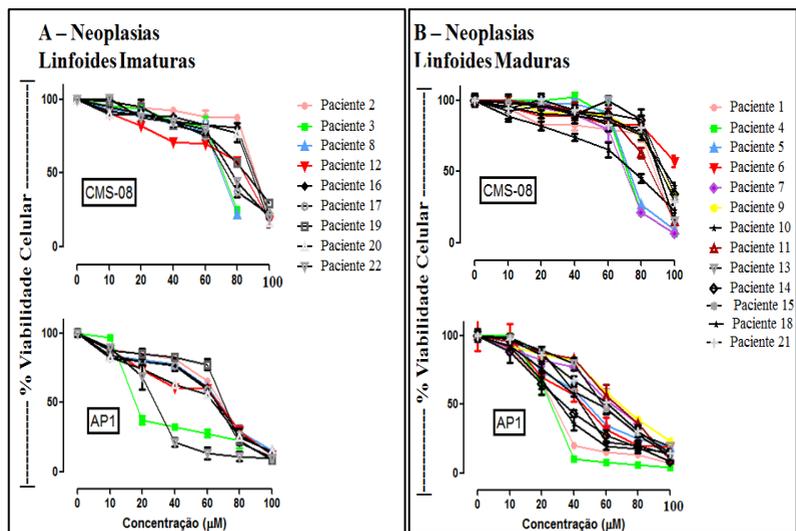
As células Daudi e Jurkat ( $4 \times 10^6$  células), foram incubadas por 24 h na ausência, grupo controle, e na presença dos compostos CMS-08 e AP1 nas  $CI_{50}$  de 24 h. A avaliação da expressão de CHOP foi realizada por WB e a proteína  $\beta$ -tubulina foi utilizada como controle da reação. Em (A) estão demonstradas imagens representativas e, em (B) os resultados da quantificação de proteínas que representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes. UA: Unidades arbitrárias. \* Diferença estatística em relação ao grupo controle,  $p \leq 0,05$ , teste t de *Student*.

## 5.10 CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS SELECIONADOS EM CÉLULAS DE PACIENTES COM NEOPLASIAS LINFÓIDES

O efeito dos compostos CMS-08 e AP1 foi investigado sobre células mononucleadas de SP e MO de pacientes com neoplasias linfóides atendidos no HU/UFSC. De acordo com a Tabela 9, dos vinte e dois pacientes avaliados, catorze eram do gênero feminino e oito do gênero masculino, e a mediana de idade foi de 62 anos. A porcentagem de células patológicas em cada amostra variou entre 14,4 e 81,0%, com mediana de 50,6%. O diagnóstico foi realizado segundo os critérios da OMS (2016) e foram incluídos no estudo pacientes com neoplasias linfóides de células precursoras (LLA-B e -T) e de células maduras (LDGCB, LF, LZME, LCM, LB, LLC-B, tricoleucemia variante e um tipo de linfoma que não pode ser classificado e foi considerado LCB CD5+).

Como pode ser observado na Figura 50, os compostos CMS-08 e AP1, após 24 h de incubação, reduziram a viabilidade das células mononucleadas dos vinte e dois pacientes portadores de neoplasias linfóides. A  $CI_{50}$  encontrada para as amostras pode ser observada na Tabela 10.

Figura 50 - Efeito citotóxico dos compostos CMS-08 e AP1 sobre células mononucleadas de pacientes portadores de neoplasias linfoides.



Em (A) estão representadas as neoplasias linfoides de células imaturas e em (B) de células maduras. As células separadas por *Ficoll-Hypaque* ( $5,0 \times 10^5$  células/poço) foram incubadas com os compostos CMS-08 e AP1 por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (células sem tratamento) foi definida como 100% de viabilidade celular. \* Diferença significativa em relação ao grupo controle,  $p \leq 0,05$ , ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Tabela 9 - Características e valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) observados para as amostras de pacientes portadores de neoplasias linfoides.

Paciente	Gênero	Idade	Amostra	Diagnóstico	Leucócitos / $\text{mm}^3$	Células Patológicas (%)	$IC_{50}$ (24 h)	
							CMS-08 ( $\mu\text{M}$ )	AP1 ( $\mu\text{M}$ )
1	F	40	SP	LDGCB	29.510	43,8	59,9 $\pm$ 3,1	5,7 $\pm$ 0,4
2	M	28	SP	LLA-B comum	12.780	53,4	92,4 $\pm$ 5,9	30,5 $\pm$ 1,2
3	F	81	SP	LLA-T de células precursoras iniciais	20.760	75,7	89,4 $\pm$ 5,1	10,6 $\pm$ 0,9
4	M	57	SP	Recidiva de LF	35.010	74,0	41,8 $\pm$ 3,1	4,9 $\pm$ 0,6
5	F	62	SP	LZME	11.490	22,7	44,3 $\pm$ 2,8	15,4 $\pm$ 0,9
6	F	72	SP	LCM	5.320	17,5	149,6 $\pm$ 3,7	13,0 $\pm$ 0,5
7	M	47	SP	LB	6.710	17,0	47,1 $\pm$ 3,0	22,4 $\pm$ 0,7
8	F	70	MO	Recidiva de LLA-B comum (Ph+ - P190)	--	14,4	87,4 $\pm$ 5,0	24,4 $\pm$ 1,0
9	M	75	SP	LDGCB	145.650	75,6	94,3 $\pm$ 2,5	34,2 $\pm$ 0,4
10	F	77	SP	LDGCB	26.110	51,2	36,0 $\pm$ 0,9	8,0 $\pm$ 0,3
11	F	71	SP	LCB CD5+	65.410	72,5	66,5 $\pm$ 3,0	29,2 $\pm$ 0,8
12	M	25	MO	LLA pró-B	--	67,9	41,9 $\pm$ 1,6	20,7 $\pm$ 0,9
13	F	63	SP	Tricoleucemia variante	31.550	50,0	93,4 $\pm$ 7,2	25,8 $\pm$ 0,6
14	M	63	SP	LLC-B	18.880	69,4	114,32 $\pm$ 5,4	8,8 $\pm$ 0,3
15	F	84	MO	MM	--	14,3	92,8 $\pm$ 3,1	19,8 $\pm$ 0,5
16	M	17	MO	LLA-B comum	--	65,0	78,0 $\pm$ 3,4	23,4 $\pm$ 1,2
17	F	63	SP	LLA-B comum	3.010	22,1	41,4 $\pm$ 1,9	24,9 $\pm$ 1,1
18	F	78	SP	LLC-B	14.920	28,7	99,5 $\pm$ 2,4	12,0 $\pm$ 0,4
19	M	34	MO	LLA-B comum (Ph+ - P210)	--	28,0	59,7 $\pm$ 2,5	31,0 $\pm$ 1,7
20	F	35	MO	LLA-B	--	30,5	68,6 $\pm$ 3,3	19,5 $\pm$ 0,8
21	F	54	MO	MM	--	51,7	92,0 $\pm$ 3,5	23,3 $\pm$ 0,4
22	F	33	MO	LLA-B comum	--	81,0	46,0 $\pm$ 1,2	5,9 $\pm$ 0,4

Nota: LDGCB: Linfoma Difuso de Grandes Células B; LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda; LF: Linfoma Folicular; LZME: Linfoma da Zona Marginal Esplênica; LCM: Linfoma de Células do Manto; LB: Linfoma de Burkitt; LCB: Linfoma de Células B; Ph+: Presença do cromossomo Filadélfia; LLC-B: Leucemia Linfocítica Crônica B; MM: Mieloma múltiplo.

## 5.11 SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Para compreensão geral deste estudo, a Tabela 10 apresenta um sumário dos resultados obtidos.

Tabela 10 - Sumário de resultados.

	<b>EtA04</b>	<b>CMS-08</b>		<b>AP1</b>	
<b>Linhagem celular</b>	<b>Jurkat</b>	<b>Daudi</b>	<b>Jurkat</b>	<b>Daudi</b>	<b>Jurkat</b>
<b>CI<sub>50</sub> (uM) – 24 horas</b>	33,2 ± 1,1	34,4 ± 1,1	27,8 ± 1,4	17,5 ± 0,8	2,7 ± 0,2
<b>Bloqueio do ciclo celular</b>	--	--	--	--	--
<b>Ki-67</b>	--	--	--	↓	↓
<b>Morfologia celular em BE/LA</b>	Apoptose	Apoptose	Apoptose	Apoptose	Apoptose
<b>Externalização dos resíduos de fosfatidilserina</b>	↑	↑	↑	↑	↑
<b>Fragmentação de DNA</b>	Apoptose	Apoptose	Apoptose	Apoptose	Apoptose
<b>Potencial de membrana mitocondrial</b>	↓	↓	↓	↓	↓
<b>Bcl-2</b>	Não realizado	↓	↓	--	--
<b>Bax</b>	Não realizado	--	↑	↑	↑
<b>AIF</b>	Não realizado	↓	--	↑	↑
<b>FasR</b>	Não realizado	--	--	↑	↑
<b>Caspase-3 ativada</b>	Não realizado	↑	↑	↑	↑
<b>Survivina</b>	Não realizado	↓	↓	↓	↓
<b>NFκB p65</b>	Não realizado	--	↓	--	↓
<b>p53</b>	Não realizado	Ausente	--	Ausente	--
<b>Akt 1/2/3</b>	Não realizado	↓	--	--	--
<b>pAkt 1/2/3</b>	Não realizado	↓	--	--	--
<b>MAP cinase ERK2</b>	Não realizado	↓	--	--	--
<b>CHOP</b>	Não realizado	↓	--	--	--

## 6 DISCUSSÃO

As neoplasias hematológicas de células linfoides compreendem um grupo heterogêneo de doenças que inclui a LLA-T e o LB, as quais foram avaliadas neste estudo. O tratamento convencional para essas doenças ainda é baseado em altas doses de fármacos combinados entre si que apresentam alta citotoxicidade não específica, o que provoca importantes efeitos colaterais e elevada morbidade (NOWAK, STEWART & KOEFFLER, 2009; CARDOSO, 2015; DURINCK et al, 2015). Dessa forma, é clara a necessidade da busca por novos fármacos eficientes, seguros e que apresentem maior especificidade para células tumorais.

Nesse sentido e baseado em estudos prévios (MAIORAL et al, 2013; MAIORAL et al, 2016; MAIORAL et al, 2017; PERONDI, 2018), neste trabalho foi avaliado o efeito citotóxico de compostos sintéticos com o grupo 3,4,5-trimetoxifenila e de derivados de tiossemicarbazonas em células de neoplasias linfoides imaturas e maduras. Esses compostos inéditos foram sintetizados para o presente estudo com o objetivo de aperfeiçoar o potencial citotóxico previamente relatado para moléculas das mesmas classes. Além disso, investigou-se também a possível atividade citotóxica de uma plastoquinona extraída da alga *Desmarestia menziesii*, nos mesmos modelos de neoplasias hematológicas.

Inicialmente, foi realizada a imunofenotipagem por CF para caracterizar o fenótipo e, conseqüentemente, o estágio de maturação das células de neoplasias linfoides incluídas no estudo. Conforme demonstrado na Figura 14 para as linhagens imaturas, as células Jurkat apresentam um fenótipo sugestivo de LLA-T madura e as células Molt-4, de uma LLA pró-T. Com relação às células maduras, pode-se observar na Figura 15, que as células Daudi apresentaram diferenças fenotípicas em relação às células Namalwa, como a expressão mais fraca de CD19, CD20 e CD10. Por isso, demonstrou-se a presença da t(8;14) nas células Daudi (Figura 16) e foi possível certificar que essas células são de LB.

As neoplasias linfoides são caracterizadas por apresentarem células em diferentes estágios de maturação e, por isso, é comum a observação de grande heterogeneidade entre as doenças (SWERDLOW et al, 2017). Os resultados obtidos corroboram um estudo da literatura que demonstra diferenças entre linhagens de células consideradas como LLA-T. Após a análise molecular dessas células, que incluem Jurkat e Molt-3,

o estudo observou a ativação aberrante de vias de sinalização de sobrevivência, como a Akt, p38, S6K ou ERK, em distintos graus entre as linhagens celulares estudadas. Dessa forma, sugeriu-se que as diferentes células de LLA-T apresentam mutações específicas que desencadeiam a ativação de vias de sinalização distintas (MOHARRAM, SHAH & KAZI, 2017). Essas informações podem justificar diferenças de sensibilidade encontradas entre as linhagens celulares de uma mesma doença para um mesmo composto ou fármaco.

O efeito citotóxico dos 28 compostos com o grupo 3,4,5-trimetoxifenila, 38 derivados de tiossemicarbazonas e do composto natural API foi avaliado em células humanas de neoplasias linfóides imatura (Jurkat) e madura (Daudi) como triagem, por meio do tratamento com os compostos na concentração de 100  $\mu\text{M}$  por 24 h e, posteriormente, a avaliação da viabilidade celular pelo método do MTT. Segundo a literatura, os ensaios de triagem *in vitro* devem ser simples, rápidos e de baixo custo, além de permitirem a identificação de moléculas que possuam efeitos citotóxicos combinados a outros critérios capazes de definir quais compostos podem progredir para os próximos estágios no desenvolvimento de novos fármacos (KUMAR; BAJAJ; BODLA, 2016). Seguindo essa linha, o MTT é um método altamente sensível, de rápida execução e com protocolo simples (MOSMANN, 1983) que tem sido amplamente utilizado na triagem de novos compostos, na comparação entre linhagens celulares e na avaliação da combinação de diferentes fármacos, pois permite que um grande número de amostras sejam avaliadas simultaneamente (MAIORAL, 2017; PERONDI, 2018).

Dentre os compostos com o grupo 3,4,5-trimetoxifenila analisados neste estudo, os compostos EtA04 e Eh09 foram os que apresentaram maior redução da viabilidade celular quando comparados aos grupos controle nas linhagens de células Daudi e Jurkat (Figura 17), por isso, foram selecionados para a realização das curvas de concentração e tempo resposta. Os compostos selecionados foram considerados citotóxicos para ambas as linhagens celulares, pois reduziram significativamente a viabilidade celular de forma dependente da concentração e do tempo de incubação (Figura 19). Porém, os dois compostos apresentaram valores de  $\text{CI}_{50}$  elevados na linhagem de células Daudi (Tabela 1). Como EtA04 e Eh09 demonstraram menores valores de  $\text{CI}_{50}$  nas células Jurkat (Tabela 1), com valores de  $\text{CI}_{50}$  entre  $9,0 \pm 0,5 \mu\text{M}$  (72 h) e  $35,2 \pm 1,2 \mu\text{M}$  (24 h),

optou-se por dar continuidade aos experimentos com esses compostos apenas na linhagem de células Jurkat.

Como mencionado anteriormente, a colchicina (Figura 7) é amplamente utilizada como protótipo na geração de novos fármacos antineoplásicos em potencial, e inúmeros análogos foram sintetizados a fim de se obter perfis farmacológicos mais favoráveis e com menor toxicidade (KUMAR, SHARMA & MONDHE, 2017). No campo científico, há grande interesse em explorar os análogos sintéticos da colchicina, pois se trata de uma molécula estruturalmente simples, disponível na natureza, fácil de ser manipulada e que apresenta a capacidade de regular de forma negativa enzimas do citocromo P450 (COSENTINO et al, 2012). A colchicina se liga à tubulina por meio do grupo trimetoxifenila e leva à despolimerização dos microtúbulos. Os inibidores de microtúbulos que se ligam ao local de ligação da colchicina apresentam vantagens terapêuticas sobre o taxol e os alcaloides de vinca, pois podem ser administrados por via oral devido à maior solubilidade em água e, além disso, são menos propensos ao desenvolvimento de resistência a múltiplos fármacos. Atualmente, não há fármacos aprovados pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) que se liguem especificamente ao sítio de ligação da colchicina à tubulina e, por isso, muitos compostos com o grupo trimetoxifenila têm sido estudados (LI et al, 2018).

Os compostos avaliados neste estudo foram sintetizados tendo como base estudos prévios que relataram a atividade antineoplásica de derivados metoxilados (YE et al, 2005; DUCKI et al, 2009). De acordo com os resultados obtidos nos testes de triagem, pode-se sugerir que a presença de um grupamento 2-naftil localizado no lado oposto do anel trimetoxilado pode levar a um aumento da capacidade citotóxica desses compostos, devido ao observado para EtA04 e Eh09.

Muitos estudos avaliaram o efeito de análogos sintéticos da colchicina em células de diferentes neoplasias e, em geral, demonstraram valores baixos de  $CI_{50}$ . Um estudo realizado por Thomopoulou e colaboradores (2015) avaliou a atividade citotóxica de análogos da colchicina pela técnica de ATP-bioluminescência e demonstrou uma atividade antineoplásica significativa em células de LLA-T (Jurkat) e de leucemia monocítica aguda (THP-1). Os valores de  $CI_{50}$  ficaram entre 2,9 e 84,2 nM para Jurkat (48 h) e 4,1 e 139,8 nM para THP-1 (24 h), no entanto, não foi relatado o número de células plaqueadas em cada poço

para a realização dos testes. No mesmo estudo, os compostos mais citotóxicos foram selecionados para serem avaliados em células de tumores sólidos, como carcinoma cervical (HeLa), câncer de pulmão (A549, MES1 e H1975) e de mama (MDA-MB-231), e também apresentaram  $CI_{50}$  baixas (2 a 3  $\mu$ M em 48 h). Os autores observaram que os análogos mais promissores continham uma porção lipofílica (fenil, terc-butil ou éster benzílico) a uma distância específica do anel A da molécula (THOMOPOULOU et al, 2015). Por fim, foi encontrado apenas um estudo na literatura que avaliou a atividade citotóxica desses compostos em células de LB (BJAB) e, nele, foi demonstrada a importância da utilização de lipossomas para reduzir a citotoxicidade e aumentar a atividade antitumoral dessas moléculas (KUZNETSOVA et al, 2013). Além disso, foram observadas atividades citotóxicas após o tratamento de células neoplásicas com compostos constituídos de uma porção de colchicina e um fragmento de outro inibidor de microtúbulos ou inibidores de histona desacetilases (VILANOVA et al, 2014; ZHANG et al, 2015).

A atividade citotóxica de compostos trimetoxilados sobre células de neoplasias hematológicas já foi demonstrada em diversos estudos (MAIORAL, 2017; STEFANES, 2018). De forma geral, não foi possível a comparação entre os resultados de  $CI_{50}$  obtidos neste trabalho e os relatados na literatura, pois além das diferenças estruturais entre os compostos avaliados (MARZO-MAS et al, 2017), os estudos apresentaram diferenças entre as técnicas utilizadas para avaliar a citotoxicidade dos compostos. Até mesmo quando se trata da mesma técnica (MTT), foram observadas diferenças nas quantidades de células plaqueadas e nos tempos de incubação das células com os compostos e reagentes. Outro fator que pode influenciar no resultado do teste do MTT é a capacidade de adesão das células ao poço da placa, pois, de certa forma, quando se trabalha com células em suspensão, as chances de perdas celulares inerentes à técnica utilizada são maiores, mesmo que os devidos cuidados de centrifugação e pipetagem sejam tomados.

Dos 38 derivados de tiossemicarbazonas avaliados no presente estudo, os compostos CMS-08 e VIU-09 (Figura 21) foram aqueles que apresentaram reduções significativas da viabilidade celular nas duas linhagens celulares avaliadas, Daudi e Jurkat, em relação ao grupo controle e aos demais compostos (Figura 20). Assim, esses compostos foram selecionados para a realização das curvas de concentração e tempo

resposta. Em termos estruturais, diferentemente da série FI, os compostos das séries CMS e VIU apresentam grupamentos cloro ligados a um dos anéis fenil. O composto VIU-09 também apresenta o grupamento 3,4,5-trimetoxifenil, o que pode contribuir para a sua atividade citotóxica. Já o composto CMS-08 apresenta o grupo 3-metoxi-4-hidroxi-fenil, e foi selecionado para ser o representante da classe das tiossemicarbazonas visto que apresentou redução significativa da viabilidade celular e valores baixos de  $CI_{50}$  nas duas linhagens celulares em todos os tempos avaliados (Figura 22).

O potencial antitumoral das tiossemicarbazonas também tem sido amplamente estudado na literatura, porém, embora dois compostos dessa classe estejam em estudos de fase clínica, seus mecanismos de ação ainda não estão completamente elucidados (MACKENZIE et al, 2007; JANSSON et al, 2015). Como citado anteriormente, há indícios de que a inibição da enzima ribonucleotídeo redutase seja responsável pelo efeito antiproliferativo desses compostos (FINCH et al, 2000; SHAO et al, 2006). No entanto, sugere-se que a mobilização dos íons de ferro da célula, assim como a formação de EROs também sejam importantes (MALARZ et al, 2018).

O primeiro estudo que relatou o efeito citotóxico das tiossemicarbazonas em neoplasias hematológicas utilizou um modelo murino com células de leucemia de linhagem linfoblástica aguda L1210 (LIU, LIN, SARTORELLI, 1992). Mais recentemente, um grupo de pesquisadores brasileiros demonstrou a citotoxicidade de derivados de tiossemicarbazonas em diferentes linhagens de células neoplásicas, como a K562. Os valores de  $CI_{50}$  encontrados para essa linhagem celular foram de 0,9 a 1,6  $\mu\text{M}$ , em 48 h utilizando-se  $5 \times 10^4$  células por poço (DE OLIVEIRA et al, 2015). Um estudo prévio realizado por Perondi (2018) também demonstrou a atividade citotóxica de derivados de tiossemicarbazonas em células de leucemias agudas de linhagem linfóide e mieloide (LLA-T e K562). Nesse estudo, foram plaqueadas  $1 \times 10^5$  células por poço e o composto LAP17 apresentou  $CI_{50}$  de 24 h igual a 25,3  $\mu\text{M}$  para as células Jurkat e 34,7  $\mu\text{M}$  para as células K562. Esses resultados são semelhantes aos encontrados no presente trabalho para a linhagem de células Jurkat. Por fim, foi demonstrada a atividade antitumoral das tiossemicarbazonas com valores de  $CI_{50}$  altos após 24 h de incubação com células de LMA (K562 e HL-60) e que variaram entre 3,7 e 17,8  $\mu\text{M}$  em 72 h (DE SANTANA et al, 2018).

Outros estudos exploraram a capacidade desses compostos em formar complexos metálicos com paládio, e demonstraram atividade citotóxica em células de leucemias (Jurkat, HL-60 e células de linhagem monocítica THP-1) com  $CI_{50}$  de 48 h inferiores a 2  $\mu$ M (FERRAZ, 2009). A complexação com o íon índio resultou em um aumento da citotoxicidade em células Jurkat, HL-60 e THP-1 (OLIVEIRA et al, 2017), e pode ser considerada uma estratégia para o aperfeiçoamento dos compostos avaliados no presente estudo.

Não foi encontrado nenhum relato na literatura sobre o efeito citotóxico dos derivados de tiossemicarbazonas em células de linhagens de LB, como a Daudi, e os resultados encontrados para a linhagem de células Jurkat foram semelhantes aos observados neste trabalho. No entanto, como citado anteriormente, deve-se atentar às condições observadas em cada estudo a fim de realizar comparações fidedignas dos resultados obtidos.

Também foi avaliado o efeito citotóxico do composto AP1 (Figura 9), uma plastoquinona extraída da alga parda *Desmarestia menziesii*, em células de neoplasias linfoides Daudi e Jurkat. Conforme pode ser observado na Figura 23, esse composto causou uma redução significativa da viabilidade celular em ambas as linhagens. Essa redução ocorreu de maneira dependente do tempo de incubação e da concentração (Figura 24) e, os valores de  $CI_{50}$  variaram de 3,4  $\mu$ M em 72 h a 17,5  $\mu$ M em 24 h para as células Daudi, e de 0,9  $\mu$ M em 72 h a 2,7  $\mu$ M em 24 h para as células Jurkat (Tabela 3).

As quinonas são compostos fenólicos de origem natural com uma vasta gama de propriedades farmacológicas, e são utilizadas no tratamento de diversas doenças, inclusive o câncer. Com relação à atividade citotóxica, segundo a literatura, esses compostos podem induzir a formação de EROs e a inibição das topoisomerases que levam a célula à apoptose. A citotoxicidade das quinonas pode estar relacionada à propriedade química intrínseca na unidade quinonoídica, associada a outros fatores estruturais (SILVA et al, 2003). Um estudo realizado por Efferth e colaboradores, publicado em 1996, demonstrou a atividade antitumoral de quatro tipos de quinonas sobre células de LMA (KG-1a). Os valores de  $CI_{50}$  encontrados na linhagem KG-1a foram inferiores aos observados no presente estudo, porém é importante destacar que, em Effert (1996) a  $CI_{50}$  foi calculada após 10 dias de tratamento com as quinonas. Assim, como as condições dos experimentos apresentam

diferenças, a comparação entre os estudos é prejudicada, porém os baixos valores de  $CI_{50}$  para API em células Jurkat e Daudi nesse estudo corroboram os dados apresentados por Effert. Em outro estudo, que avaliou a atividade antineoplásica de quinonas sobre células de carcinoma hepatocelular (Hep G2), foi observado um valor de  $CI_{50}$  igual a  $13,7 \mu\text{M}$  em 24 h de incubação, no qual foram incubadas  $1 \times 10^4$  células por poço (MATZNO et al, 2008).

O efeito citotóxico de quinonas foi demonstrado em células Jurkat e parece estar relacionado a alterações mitocondriais e à apoptose extrínseca relacionada ao receptor Fas (LAUX & NEL, 2001). Foi relatada a atividade citotóxica de plastoquinonas em células de leucemia (P-388) e de adenocarcinoma de cólon (26-L5), ambas de origem murina (NUMATA et al, 1992; MORI et al, 2005). Foi demonstrado que a primina e o acetato de miconidina, derivados de hidroquinonas extraídas de plantas, foram citotóxicos para células de leucemias agudas e de MM. As plastoquinonas, investigadas nesses trabalhos, pertencem à família das quinonas e possuem atividades importantes na cadeia respiratória e na fotossíntese das algas (BIGOLIN, 2016; MAIORAL, 2017).

O interesse por um novo composto para o tratamento das neoplasias hematológicas baseia-se não apenas em sua capacidade de induzir as células tumorais à morte, mas também na sua seletividade, de forma a afetar minimamente as células não neoplásicas. Essa é uma estratégia importante para uma possível diminuição dos efeitos adversos normalmente relacionados à morbidade e mortalidade sofrida pelos pacientes que fazem uso dos tratamentos, mesmo aqueles envolvendo quimioterápicos com baixos valores de  $CI_{50}$  (HOIJAT-FARSANGI, 2015; VASEKAR et al, 2016). Assim, inicialmente, foi investigado o efeito dos compostos sintéticos selecionados e do composto natural API sobre eritrócitos saudáveis pelo teste de hemólise. Seu princípio baseia-se no fato de que, quando a membrana externa do eritrócito é lisada, a hemoglobina presente no interior da célula é liberada e, dessa forma, é possível realizar uma estimativa da quantidade de eritrócitos destruídos por meio da quantificação da hemoglobina presente na amostra (MACÍAS-MARTÍNEZ et al, 2016). O teste de hemólise é um ensaio sensível que desempenha um papel importante na predição da biossegurança de um composto e na possibilidade de administração do futuro medicamento por via endovenosa, a qual é uma preocupação crítica para o uso *in vivo* de novos compostos (POPESCU et al, 2017).

O presente estudo demonstrou que os compostos EtA04, CMS-08 e AP1 não induziram a lise de eritrócitos, mesmo em concentrações três vezes superiores às respectivas  $CI_{50}$  (Figuras 25 e 26). Já o composto Eh09 apresentou efeito hemolítico significativo em relação ao controle negativo, com taxa de hemólise de 21,5% após a incubação com concentração referente ao triplo da  $CI_{50}$  (Tabela 4). Segundo a literatura, um agente quimioterápico que induz a lise de eritrócitos em baixas concentrações, por maior que seja a sua efetividade, tem a sua aplicação terapêutica comprometida (MOCAN, 2013). Assim, devido à importância do teste de hemólise e ao resultado obtido para o composto Eh09 nesse ensaio, optou-se por excluir o mesmo do presente trabalho. Dessa forma, o composto EtA04 foi escolhido como único representante dos compostos com o grupo 3,4,5-trimetoxifenila para o seguimento do estudo, juntamente com o derivado de tiossemicarbazonas CMS-08 e com a quinona AP1 de origem natural.

Na literatura, há relatos da baixa capacidade hemolítica de compostos derivados das tiossemicarbazonas e de tipos específicos de quinonas (LUPESCU et al, 2014; BIGOLIN, 2016; DE SANTANA et al, 2018). Apesar de ser um ensaio preliminar, esse resultado encontrado no teste de hemólise sugere que os compostos EtA04, CMS-08 e AP1 possuem baixa toxicidade sobre células não neoplásicas e não causam dano significativo às membranas eritrocitárias, o que indica a possibilidade de administração dos mesmos por via endovenosa. Porém, para afirmar que os compostos de fato não causam hemólise de forma sistêmica, seria necessária a realização de experimentos com modelos *in vivo*.

Posteriormente, com o objetivo de avaliar a toxicidade dos compostos selecionados EtA04, CMS-08 e AP1 em células não neoplásicas, foram utilizadas amostras de SP obtidas de voluntários considerados saudáveis. Os resultados apresentados demonstraram que os compostos EtA04 e CMS-08 não reduziram a viabilidade de células mononucleadas de forma significativa (Figura 27). Esse resultado vai ao encontro de outros estudos da literatura que avaliaram o efeito dessas classes de compostos em fibroblastos humanos normais e em células de SP, e mostraram baixa toxicidade para células não neoplásicas (LAROCQUE et al, 2014; DE SANTANA et al, 2018; PERONDI, 2018). Esse é um resultado importante, pois sugere uma possível seletividade

desses compostos para células neoplásicas e uma provável diminuição dos efeitos adversos *in vivo*.

Por outro lado, o composto AP1, na concentração da  $CI_{50}$  de 24 h calculada para as células Daudi (17,5  $\mu\text{M}$ ), reduziu de forma significativa a viabilidade de células mononucleadas (35,4  $\pm$  9,0%), com citotoxicidade semelhante à do quimioterápico taxol (45,9  $\pm$  2,7%). Porém, na concentração da  $CI_{50}$  de 24 h das células Jurkat (2,7  $\mu\text{M}$ ), a qual foi semelhante à de 48 h em células Daudi, (4,7  $\mu\text{M}$ ) a redução da viabilidade não foi significativa (Figura 27). Esse resultado corrobora estudos anteriores que demonstraram uma redução na viabilidade de células mononucleadas de SP de indivíduos saudáveis após o tratamento com esses compostos naturais (BIGOLIN, 2016; MAIORAL, 2017).

Também foi avaliado nessas células o efeito da vincristina, um fármaco comumente utilizado na clínica para o tratamento de neoplasias hematológicas. Esse quimioterápico induziu uma redução significativa da viabilidade celular de células mononucleadas, o que sugere uma menor seletividade do mesmo em células não neoplásicas. Dessa forma, apesar de não ser um resultado ideal, a redução na viabilidade celular induzida pelo composto AP1 não é um fator que inviabiliza a continuidade dos experimentos, pois foi semelhante àquela observada para quimioterápicos já utilizados na clínica e, posteriormente, poderiam ser consideradas estratégias para minimizar a toxicidade em células não neoplásicas, como nanocápsulas e lipossomas.

Como visto anteriormente, as neoplasias de células linfóides são doenças heterogêneas e, por esse motivo, ensaios *in vitro* exigem a investigação do maior número possível de linhagens celulares (KUMAR; BAJAJ; BODLA, 2016). Assim, o efeito citotóxico dos compostos selecionados EtA04, CMS-08 e AP1 foi avaliado em mais uma linhagem de LLA-T (Molt-4) e de LB (Namalwa), e também em uma linhagem de MM (MM.1S), um tipo de NCP caracterizado pela expansão clonal de células plasmocitárias, que é resistente a todos os tratamentos disponíveis atualmente (SWERDLOW et al, 2017). Foi incluído neste estudo, ainda, um modelo de neoplasia hematológica de linhagem mieloide, a K562. Essa linhagem de LMA foi originalmente obtida a partir da amostra de um paciente com LMC em crise blástica BCR/ABL positiva, a qual é uma doença de prognóstico bastante desfavorável e que está associada a resistência ao tratamento (KOEFLER & GOLDE, 1980).

Os resultados apresentados demonstram que os três compostos selecionados foram citotóxicos para as linhagens avaliadas e que a morte celular ocorreu de forma dependente da concentração e do período de incubação (Figuras 28, 29 e 30). No entanto, o composto EtA04 apresentou valores de  $CI_{50}$  superiores a  $30 \mu M$  após 24 e 48 h de incubação em todas as linhagens de neoplasias hematológicas avaliadas. O resultado obtido com células Molt-4 ( $48,3 \pm 0,6 \mu M$ ) foi superior àquele encontrado com as células Jurkat ( $33,2 \pm 1,1 \mu M$ ) em 24 h, assim como a  $CI_{50}$  em células Daudi ( $83,7 \pm 2,6 \mu M$ ) foi superior à das células Namalwa ( $52,4 \pm 2,0 \mu M$ ). Já os valores de  $CI_{50}$  observados para as linhagens MM.1S e K562 foram bastante elevados, ou seja, de  $97,7 \pm 2,1 \mu M$  e maior que  $100 \mu M$ , respectivamente. Esses resultados sugerem baixa citotoxicidade desse composto nas linhagens de neoplasias avaliadas.

Em relação ao composto CMS-08, foram observados valores de  $CI_{50}$  muito semelhantes entre as linhagens de células de LLA-T ( $25,9 \pm 1,3 \mu M$  em células Molt-4 e  $27,8 \pm 1,4$  na linhagem celular Jurkat após 24 h de incubação); valores superiores para as células Daudi ( $34,4 \pm 1,1 \mu M$ ) quando comparados às células Namalwa ( $19,0 \pm 0,8 \mu M$ ) e, os valores de  $CI_{50}$  de 24 h igual a  $51,5 \pm 3,0 \mu M$  em células MM.1S e  $61,9 \pm 2,8 \mu M$  em K562. Esse resultado pode indicar uma maior efetividade do composto CMS-08 em linhagens de neoplasias linfoides quando comparado a outras neoplasias hematológicas. Já o composto AP1 apresentou baixos valores de  $CI_{50}$  de 24 h para todas as linhagens celulares avaliadas, o que sugere uma ação mais ampla em diferentes tipos de neoplasias malignas (Tabela 5).

Os valores de  $CI_{50}$  observados nas diferentes linhagens celulares podem ser explicados pelas particularidades de cada subtipo de neoplasia. Considerando as diferenças entre as neoplasias de células linfoides imaturas, pode-se observar que, na linhagem Jurkat, os três compostos apresentaram valores de  $CI_{50}$  inferiores aos encontrados na linhagem Molt-4. Esses resultados corroboram estudos da literatura que demonstram que a célula Jurkat é uma célula mais sensível a diferentes tratamentos quando comparado às células Molt-4 (LONETTI et al, 2014; PEREIRA et al, 2015). Com relação às neoplasias de células maduras, observou-se que sobre as células Namalwa, os compostos apresentaram valores inferiores aos encontrados para as células Daudi, o que vai de encontro a outro estudo que demonstrou valores de  $IC_{50}$  muito

semelhantes após tratamento das células Daudi e Namalwa com um composto inibidor da via PI3K/Akt/mTOR (PEREIRA et al, 2015).

Além disso, diante dos resultados obtidos, os compostos aparentemente apresentam valores de  $CI_{50}$  semelhantes para as células Daudi e MM.1S. Isso pode ser justificado pelo fato de ambas as linhagens celulares citadas serem de origem linfóide B madura. Não foi possível comparar os resultados obtidos com estudos da literatura, pois, até o momento, não foram encontrados trabalhos que avaliaram os efeitos das classes de compostos estudadas sobre as células Daudi e MM1S. Foi demonstrada a atividade citotóxica de outras quinonas sobre células MM.1S com  $CI_{50}$  de 24 h que variam entre 5,2 e 5,9  $\mu\text{M}$  (BIGOLIN, 2016; MAIORAL, 2017), o qual é semelhante ao relatado no presente estudo ( $12,3 \pm 1,1 \mu\text{M}$ ).

A incubação das células K562 com os compostos EtA04 e CMS-08 resultou em altos valores de  $CI_{50}$ , o que demonstra resistência dessas células aos compostos avaliados. Conforme citado anteriormente, essas células costumam ser resistentes e muitos trabalhos utilizam-nas como modelo para a triagem de novos compostos potencialmente citotóxicos (BIGOLIN, 2016; MAIORAL, 2017; PERONDI, 2018). Em um estudo foi demonstrado que outros compostos derivados de tiossemicarbazonas apresentaram valores de  $CI_{50}$  de 24 h inferiores aos obtidos neste trabalho (PERONDI, 2018). Com relação à classe das quinonas, estudos prévios demonstraram valores  $CI_{50}$  de 24 h semelhantes aos obtidos para o composto AP1 (BIGOLIN, 2016; MAIORAL, 2017).

Todos os três compostos avaliados (EtA04, CMS-08 e AP1) apresentaram IS inferiores a 5 em células de neoplasias linfóides imaturas (Jurkat e Molt-4) e maduras (Daudi e Namalwa) quando comparado às células de MM (MM.1S) e de LMA (K562) (Tabela 6). O IS é um cálculo que permite estimar a eficiência de um composto em induzir morte celular em uma determinada linhagem e não ser citotóxico para outro tipo celular. Os parâmetros de seletividade variam em diferentes estudos. Awang e colaboradores (2015) sugerem que alta seletividade seja considerada quando o IS é superior a 3. No entanto, estudos mais criteriosos recomendam a utilização de valores mais altos, superiores a 10 (MAIORAL, 2017). Dessa forma, pode-se considerar que os compostos avaliados neste estudo não apresentam alta seletividade entre as neoplasias hematológicas analisadas. No entanto, é importante considerar que os esquemas quimioterápicos utilizados atualmente para o tratamento

de neoplasias hematológicas são compostos por vários fármacos e que um mesmo agente é frequentemente utilizado para o tratamento de mais de uma neoplasia. Ao analisar por essa perspectiva, as chances de produção de um fármaco que seja eficaz para mais de uma doença é maior, quando comparado a um que seja utilizado apenas para uma doença específica. Assim, considerando que os compostos EtA04, CMS-08 e AP1 apresentaram citotoxicidade significativa sobre diversas linhagens de neoplasias linfoides sem apresentar toxicidade expressiva em modelos normais, os três compostos foram considerados promissores e deu-se continuidade aos experimentos a fim de investigar os seus principais mecanismos de ação.

Conforme citado anteriormente, em condições fisiológicas, o bloqueio do ciclo celular tem a finalidade de reparar o DNA frente a situações de estresse, impedindo a progressão de mutações que possam resultar em morte celular ou na manutenção de um fenótipo alterado (KIM et al, 2005). Sabe-se que a citotoxicidade de muitos compostos antineoplásicos está relacionada à interrupção da progressão do ciclo celular e, conseqüentemente, à indução de apoptose (BOSE; GRANT, 2015, ZHANG et al, 2015). Diante dessa perspectiva, realizou-se a investigação dos efeitos dos três compostos selecionados no ciclo celular de células Daudi e Jurkat por CF (FURIA, PELICCI & FARETTA, 2014).

Como pode ser observado na Figura 31, não foram observadas diferenças significativas na quantidade de células em cada fase do ciclo celular após o tratamento com os compostos EtA04, CMS-08 e AP1. Esses resultados são diferentes de outros que relacionam os compostos trimetoxilados relacionados à colchicina ao bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, induzido pela inibição da formação dos microtúbulos (KUMAR; BAJAJ; BODLA, 2016; SHCHEGRAVINA et al, 2017). No entanto, um estudo recente relata que a atividade citotóxica dessa classe de compostos, em concentrações inferiores àquelas que causariam bloqueio no ciclo celular, está relacionada à autofagia mediada por EROs em células de câncer de pulmão (BHATTACHARYA et al, 2016). Além disso, alterações na molécula da colchicina podem gerar citotoxicidade seletiva e mediada por mecanismos de ação que não apresentam relação com a capacidade de ligação à tubulina. Isso significa que o mecanismo mais importante envolvido na citotoxicidade da colchicina e de seus análogos ainda não está claro, visto que afetam as vias lisossômica, endossômica e autofágica, além de induzir o estresse no RE e na

mitocôndria e serem capazes de inibir a síntese proteica pelo complexo de Golgi (LAROCQUE et al, 2014).

Em relação aos derivados de tiossemicarbazonas, os resultados descritos na literatura são bastante controversos. Alguns estudos demonstram que o tratamento com esses compostos induz o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M (CABRERA et al, 2015; PERONDI, 2018). Malarz e colaboradores (2018), demonstraram que derivados de tiossemicarbazonas são capazes de gerar EROs e desregular o potencial antioxidante de células MCF-7 e, foram observadas alterações nos genes responsáveis pela capacidade antioxidante, o que levou à indução de apoptose e bloqueio do ciclo celular, o que justifica a seletividade particularmente alta que eles apresentam sobre as células normais, que geralmente têm um equilíbrio redox mais robusto. Por outro lado, há estudos que afirmam que a citotoxicidade dessa classe é independente do bloqueio no ciclo celular (DE OLIVEIRA et al, 2015).

Os resultados obtidos para o composto natural AP1 corroboram estudos que não observaram bloqueio no ciclo celular das células leucêmicas após tratamento com primina (EFFERTH et al, 1996; BIGOLIN, 2016). Hoyt (2010) também não detectou influência nas fases do ciclo celular das células U-937, SK-MEL-5 (melanoma), MCF-7 e HeLa após o tratamento por 16 h com a quinona heterocíclica cribrostatina 6. Dessa forma, os resultados sugerem que as quinonas não atuam sobre a progressão do ciclo celular, apesar de haver relatos na literatura que afirmam que a exposição a certos tipos de quinonas está relacionada a um aumento na produção de EROs e também ao bloqueio celular na fase G2/M, um efeito atribuído, provavelmente, à interrupção da montagem dos microtúbulos (COULTER, O'DRISCOLL & BRESSLER, 2013). Além disso, outro estudo que avaliou o efeito citotóxico de uma naftoquinona em células NB4, de leucemia promielocítica aguda, demonstrou um bloqueio na fase G0/G1 (SHAN et al, 2017).

Segundo a literatura, a proliferação descontrolada é uma das principais características das células neoplásicas e, nesse contexto, a proteína Ki-67 é considerada um importante marcador de proliferação celular, utilizado na clínica como fator prognóstico (YANG et al, 2018). Sabe-se que a superexpressão desse marcador está relacionada à presença de neoplasias malignas, incluindo o LB (HASHMI et al, 2014). Nessa linha de investigação, foi avaliado o efeito dos compostos EtA04, CMS-

08 e AP1 sobre a expressão da proteína Ki-67 nas células Daudi e Jurkat. Conforme pode ser observado na Figura 32, os compostos EtA04 e CMS-08 não causaram alterações na expressão dessa proteína, enquanto que o composto AP1, induziu uma redução significativa da sua expressão em ambas as linhagens avaliadas. Até o presente momento, não foram encontrados estudos relacionando o efeito das classes de compostos avaliados na expressão dessa proteína. No entanto, pode-se sugerir que, como a proliferação celular descontrolada é considerada um dos principais mecanismos biológicos envolvidos na oncogênese, a diminuição de Ki-67 pelo composto AP1 é um resultado promissor e indica que o composto também possui efeitos citostáticos. Além disso, resultados que relacionam Ki-67 à proliferação sem efeito no ciclo celular, sugerem que, em humanos, a influência dessa proteína no ciclo celular possa ser específica de cada tipo de célula (SUN & KAUFMAN, 2018).

Sabe-se que a diminuição da viabilidade de células neoplásicas como resultado do tratamento com compostos citotóxicos naturais ou sintéticos é o resultado da ativação de vias de sinalização que podem induzir morte celular por mecanismos rigorosamente controlados (BOSE & GRANT, 2015; GALLUZI et al, 2018). O entendimento dos mecanismos de morte celular é fundamental na investigação de compostos para a identificação de novos alvos na terapia antitumoral. Dentre os diversos tipos de MCR, a apoptose é a mais bem estudada na literatura (HUNTER; LACASSE; KORNELUK, 2007; LI & DEWSON, 2015), e por isso, no presente estudo, foram utilizados três métodos diferentes para avaliar se a citotoxicidade estimulada pelo tratamento com EtA04, CMS-08 e AP1 em células Daudi e Jurkat ocorreu pela ativação da apoptose.

O primeiro método utilizado para avaliar o tipo de morte celular induzida pelos compostos EtA04, CMS-08 e AP1 foi a observação do tamanho e da complexidade interna das células por CF e da morfologia celular por microscopia de fluorescência utilizando BE e LA. Estudos demonstram que células que sofreram bloqueio no ciclo celular e serão induzidas à apoptose apresentam alteração no tamanho e na complexidade interna (TAHARA et al, 2013; CAMPESTRINI, 2017). O presente estudo demonstrou que as células Daudi apresentaram uma diminuição significativa do tamanho, avaliado pelo FSC, após 24 h de tratamento com CMS-08 e com AP1, e também na complexidade interna, avaliada pelo

SSC, após o tratamento com CMS-08. Já para as células Jurkat, não foram observadas alterações no tamanho e na complexidade interna das células após o tratamento com os três compostos selecionados (Figura 33). Esses resultados podem ser justificados pelo fato de que, após 24 h de tratamento com os compostos, pode-se observar uma quantidade considerável de células pequenas não viáveis e fragmentos celulares que ficam localizados à esquerda do eixo x e abaixo no eixo y dos gráficos. Além disso, as células Jurkat apresentam tamanho inferior ao das células Daudi (característica visível na avaliação morfológica por microscopia e por CF) e, por isso, a diferença pode não ter sido significativa.

Com relação à marcação das células com BE e LA e posterior visualização em microscópio de fluorescência, pode-se observar que as células Daudi e Jurkat apresentaram mudanças na morfologia celular quando comparadas com o grupo controle (Figura 34). Após 18 h de incubação com os compostos selecionados, todas as linhagens celulares avaliadas demonstraram características morfológicas típicas de células em apoptose. A apoptose em fase inicial é caracterizada pela membrana íntegra (indicada pela fluorescência verde) com condensação da cromatina e, a fase tardia, pela diminuição do volume celular, formação de *blebs* e corpos apoptóticos, além da perda de integridade da membrana (indicada pela fluorescência alaranjada). Diferente do que ocorreu com as células Jurkat após o tratamento com os compostos EtA04, CMS-08 e AP1, onde foram visualizadas células em apoptose em fases inicial e tardia, após a incubação da linhagem celular Daudi com o composto CMS-08, foram observadas predominantemente células em apoptose em fase inicial. No tratamento das células Daudi com o composto AP1, também foi possível a visualização de células com características de apoptose inicial e tardia quando comparadas ao controle sem tratamento, no qual as células viáveis apresentaram tamanho homogêneo e coloração verde uniforme. De forma geral, os resultados sugerem que a linhagem celular Daudi, por apresentar maior quantidade de células em apoptose inicial, apresenta características de maior resistência ao tratamento e, esse resultado corrobora os obtidos anteriormente que demonstraram uma maior  $CI_{50}$  após o tratamento com os compostos quando comparada à linhagem de células Jurkat.

Uma característica de alguns tipos de morte celular como a apoptose é a perda de assimetria da membrana citoplasmática, com a consequente externalização dos resíduos de fosfatidilserina (GALLUZZI,

et al, 2018). Assim, a apoptose também foi avaliada pelo método da Anexina V conjugada a FITC. A anexina liga-se especificamente a esses resíduos e, como está conjugada ao fluorocromo FITC, permite identificar e quantificar as células em apoptose por CF (VERMES et al, 1995).

As células foram tratadas com os compostos EtA04, CMS-08 e AP1 por 18 h e, conforme demonstrado na Figura 35, induziram um aumento significativo na exposição dos resíduos de fosfatidilserina em relação ao grupo controle (células sem tratamento) na linhagem Jurkat. No entanto, na linhagem celular Daudi, apenas o composto AP1 causou um aumento significativo da quantidade de células positivas para anexina V. Essas informações confirmam o resultado previamente obtido na avaliação da morfologia celular por BE e LA, os quais demonstram o tratamento com o composto CMS-08 apresenta um perfil apoptótico mais tardio do que o encontrado para o AP1. Por isso, optou-se pela realização da avaliação da exposição dos resíduos de fosfatidilserina em células Daudi após o tratamento com o composto CMS-08 com um tempo de incubação de 24 h. Assim, na Figura 36, pode-se observar um aumento significativo na exposição dos resíduos de fosfatidilserina em células Daudi após incubação mais prolongada com CMS-08. De Oliveira e colaboradores (2015), ao avaliarem a exposição de resíduos de fosfatidilserina induzidos pelo tratamento com um derivado de tiossemicarbazonas, também demonstraram que o processo de morte celular é dependente do tempo de incubação com o composto em questão.

Por fim, a apoptose foi confirmada por meio do ensaio de fragmentação do DNA em gel de agarose após o tratamento das células Jurkat com EtA04, CMS-08 e AP1 por 24 h e, das células Daudi, com CMS-08 e AP1. Segundo a literatura, uma das consequências da cascata de sinalização da apoptose é a degradação do DNA celular em fragmentos de cerca de 180 pares de bases de comprimento (MATASSOV et al, 2004). Como pode ser observado na Figura 37, houve a clivagem do DNA nos padrões condizentes com apoptose nas duas linhagens tratadas com os compostos EtA04, CMS-08 e AP1. Dessa forma, o conjunto de resultados apresentados sugere que os compostos avaliados induzem apoptose em ambas as linhagens celulares, Daudi e Jurkat, e corroboram dados encontrados na literatura sobre os análogos de colchicina (KUMAR; BAJAJ; BODLA, 2016; SHCHEGRAVINA et al, 2017), derivados de tiossemicarbazonas (FERRAZ et al, 2009; DE OLIVEIRA

et al, 2015; CABRERA et al, 2015; PERONDI, 2018) e quinonas (BAIGI et al, 2008; HOYT, 2010; BIGOLIN, 2016; MAIORAL, 2017).

De acordo com as evidências que sugerem que os compostos selecionados são capazes de induzir as células de neoplasias linfoides à apoptose, realizou-se, em seguida, a avaliação dos efeitos de EtA04, CMS-08 e AP1 no comprometimento do  $\Delta\Psi_m$ , a fim de avaliar o envolvimento da apoptose intrínseca. Segundo a literatura, o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, em função das proteínas da família Bcl-2, resulta na perda do  $\Delta\Psi_m$  e, conseqüentemente, na liberação de proteínas pró-apoptóticas, as quais, por sua vez, ativam diretamente as caspases efetoras e induzem a célula à apoptose (ADAMS, 2007; GOLDAR et al, 2015; SONG et al, 2015; GALLUZZI et al, 2018). Os três compostos avaliados levaram a uma redução significativa e dependente do tempo de exposição na quantidade de células com  $\Delta\Psi_m$  intacto nas linhagens celulares Daudi e Jurkat (Figuras 38 e 39). Esses resultados corroboram dados obtidos da literatura que relatam que análogos de colchicina (THOMOPOULOU et al, 2015; SHCHEGRAVINA et al, 2017), derivados de tiossemicarbazonas (CABRERA et al, 2015) e quinonas (BIGOLIN, 2016; MAIORAL, 2017) são capazes de aumentar a permeabilidade mitocondrial, desencadear perturbações no  $\Delta\Psi_m$  e induzir as células à apoptose intrínseca. Nessa linha, um estudo de Ni Chonghaile e colaboradores (2011) avaliou a resposta ao tratamento em pacientes com neoplasias hematológicas e demonstrou que, quando há envolvimento mitocondrial, as células apresentam maior propensão a sofrer apoptose.

Após análise crítica dos resultados obtidos até o momento, todos os experimentos passaram a ser realizados com o tempo de incubação com os compostos igual a 24 h. Além disso, optou-se por descontinuar os estudos com o composto EtA04, pois o mesmo não se mostrou promissor quando comparado com CMS-08 e AP1. No entanto, acredita-se que devem ser realizadas análises futuras a fim de avaliar a capacidade do EtA04 em inibir a formação dos microtúbulos e produzir EROs. Além de estudar alternativas de modificações nas moléculas para aumentar o potencial citotóxico frente a células tumorais.

O aumento da resistência à apoptose é um mecanismo oncogênico presente em várias neoplasias hematológicas e, pode estar relacionado à superexpressão da proteína Bcl-2. Essa proteína faz parte da família Bcl-2, a qual é responsável pelo controle da integridade da membrana externa

das mitocôndrias, e é composta por membros capazes de induzir ou impedir a apoptose. O equilíbrio entre as proteínas dessa família mantém a célula viva e funcional, enquanto que a inversão na proporção de fatores pró-apoptóticos e antiapoptóticos é responsável por induzir alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial que leva à perda do  $\Delta\psi_m$  e, conseqüentemente, à morte celular (PERLMAN et al, 1999; CORY & ADAMS, 2002; NI CHONGHAILE et al, 2011; GALLUZZI et al, 2018; PERINI et al, 2018). Com a finalidade de confirmar o envolvimento da apoptose intrínseca no mecanismo de ação dos compostos CMS-08 e AP1, avaliou-se a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e da proteína pró-apoptótica Bax em células de linhagem celular Daudi e Jurkat. Como pode ser observado na Figura 40, o composto CMS-08 reduziu significativamente a expressão de Bcl-2 nessas células e não causou alteração significativa na expressão de Bax nas células Daudi, mas levou a um aumento significativo dessa proteína nas células Jurkat. O resultado obtido vai ao encontro de diversos estudos descritos na literatura que avaliam a expressão de Bcl-2 após o tratamento com tiossemicarbazonas (ZHU et al, 2017; CABRERA et al, 2015; BALACHANDRAN et al, 2018; DAR et al, 2018; PERONDI, 2018). A redução de Bcl-2 induzida pelo composto CMS-08 em células de neoplasias hematológicas é de grande relevância, tendo em vista que a inibição dessa proteína é um importante alvo terapêutico utilizado no tratamento de alguns LCB (STILGENBAUER et al, 2016).

Já o composto AP1 não causou diferença significativa na expressão de Bcl-2 nas células Daudi e Jurkat, mas induziu aumento significativo na expressão de Bax em ambas as linhagens celulares. Estudos da literatura relatam o aumento na expressão de Bcl-2 após tratamento de células de MM com uma quinona natural e diminuição em células Jurkat, além de aumento na expressão de Bax em ambas as linhagens celulares (BIGOLIN, 2016; TANG et al, 2016; MAIORAL, 2017). Dessa forma, como o controle da via é baseado no equilíbrio entre ambas as proteínas, pode-se concluir que, nas duas linhagens celulares tratadas com a tiossemicarbazona CMS-08 ou com a plastoquinona AP1, há o predomínio da expressão da proteína Bax em relação à proteína Bcl-2, o que, segundo a literatura, resulta na indução do sinal pró-apoptótico.

Também foi avaliada a expressão de AIF e os resultados apresentados demonstram que o composto CMS-08 diminuiu a expressão dessa proteína em células Daudi e não causou alteração significativa nas

células Jurkat (Figura 41). A inversão da relação Bax/Bcl-2 induzida por CMS-08 e AP1 em células Daudi e Jurkat resulta na perda do  $\Delta\Psi_m$  e na consequente liberação de fatores pró-apoptóticos da mitocôndria para o citosol, como é o caso do AIF. Esse fator, assim como o citocromo c e a endonuclease G, é liberado da mitocôndria e migra diretamente ao núcleo, onde induz a condensação e a fragmentação do DNA de forma independente da ativação de caspases (SEVRIOUKOVA, 2011). Estudos sugerem que a quantidade de EROs regula positivamente a liberação de AIF para o citoplasma e, por isso, testes adicionais seriam necessários para justificar o resultado obtido com o composto CMS-08, visto que foi observada uma perda do  $\Delta\Psi_m$  induzida por esse composto sem aumento na expressão de AIF (NORBERG; ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY, 2010; BANO & PREHN, 2018). O composto AP1, aumentou a expressão de AIF em ambas as linhagens celulares. Esse resultado corrobora outros estudos descritos na literatura (BIGOLIN, 2016; MAIORAL, 2017) e sugere uma relação direta com o extenso dano mitocondrial manifestado pela perda do  $\Delta\Psi_m$  em mais de 50%, e no envolvimento da apoptose intrínseca.

Neste trabalho, o envolvimento da apoptose extrínseca no mecanismo de morte induzido pelos compostos CMS-08 e AP1 em células de neoplasias hematológicas também foi avaliado. A apoptose extrínseca é um tipo de MCR que se inicia devido a perturbações no microambiente extracelular após a transmissão de sinais que ativam receptores de membrana, como o FasR (GALLUZZI et al, 2018). Dessa forma, pode-se observar que não houve diferença na expressão do receptor Fas em células Daudi e Jurkat após o tratamento com o composto CMS-08 (Figura 42). Esse resultado diverge do relatado por Perondi (2018), que demonstrou um aumento significativo da expressão de FasR em células Jurkat, e sugere que o efeito citotóxico do derivado de tiossemicarbonas avaliado no presente estudo não apresenta ativação da apoptose extrínseca mediada por esse receptor. No entanto, como citado anteriormente, outros receptores de membrana, os quais não foram avaliados, estão relacionados à ativação da apoptose extrínseca. Por outro lado, houve aumento significativo na expressão de FasR em ambas as linhagens celulares incubadas com o composto AP1, o que confirma o demonstrado em outros estudos descritos na literatura (BIGOLIN, 2016; MAIORAL, 2017) e sugere, nesse caso, o envolvimento da apoptose extrínseca. Dessa forma, mais estudos são necessários a fim de elucidar o

possível envolvimento da apoptose extrínseca na citotoxicidade de ambos os compostos, como a avaliação de outros receptores de membrana e outras proteínas dessa via de sinalização.

Sabe-se que a ativação das caspases efetoras, como a caspase-3, é um fator crucial para a execução da apoptose (SARASTE & PULKKI, 2000; ELMORE, 2007; GOLDAR et al, 2015; GALLUZZI et al, 2018) e, dessa forma, a expressão da caspase-3 ativada foi avaliada em células Daudi e Jurkat após o tratamento com os compostos CMS-08 e AP1. Como pode ser observado na Figura 43, os dois compostos levaram a um aumento significativo da expressão dessa proteína essencial na propagação do sinal apoptótico em ambas as linhagens de neoplasias hematológicas investigadas e corrobora diversos resultados descritos na literatura que afirmam que compostos dessas classes induzem as células à apoptose de forma dependente de caspases (MARKOVIĆ et al, 2013; WANG et al, 2013; CABRERA et al, 2015; TANG et al, 2016; ZHU et al, 2017; BALACHANDRAN et al, 2018; DAR et al, 2018).

A apoptose também pode estar relacionada à diminuição da expressão de proteínas que inibem a cascata das caspases, como a proteína survivina, cuja expressão costuma estar aumentada em células tumorais. Segundo a literatura, o seu efeito antiapoptótico está relacionado ao estresse celular, à divisão celular e à inibição direta das caspases efetoras. Além disso, a diminuição da expressão dessa proteína está relacionada à indução da célula tumoral à apoptose e a uma melhor resposta ao tratamento de pacientes na clínica (PARK et al, 2011; CHEN et al, 2016; LI, HU & LI; 2018). Não foram encontrados estudos avaliando a expressão de survivina após o tratamento com tiossemicarbazonas, no entanto, para as quinonas, existem relatos divergentes sobre a expressão em células Jurkat (BIGOLIN, 2016; MAIORAL, 2017). Neste trabalho foi demonstrado que os compostos CMS-08 e AP1 induziram a diminuição da expressão de survivina nas células Daudi e Jurkat (Figura 44), o que pode potencializar o seu efeito citotóxico e a indução das células tumorais à apoptose.

A fim de investigar o envolvimento de outras vias de sinalização que desencadeiam MCR, avaliou-se a expressão do fator de transcrição NFκB nas células Daudi e Jurkat após o tratamento com os compostos CMS-08 e AP1, devido à sua importância na resistência celular e na indução de apoptose. Conforme demonstrado na Figura 45, pode ser observada uma redução significativa na expressão de NFκB induzida

pelos compostos CMS-08 e AP1 em células Jurkat. Esse resultado é interessante visto que as vias de NFκB apresentam-se constitutivamente ativadas em neoplasias, o que garante a sobrevivência das células neoplásicas por inibir a apoptose e aumentar a proliferação celular (KORDES et al, 2000; VILIMAS et al, 2007; GASPARINI et al, 2014). Com relação às células de LB (Daudi), a não modulação de NFκB pelos dois compostos avaliados era um resultado esperado, visto que se acredita que a via do NFκB não está relacionada a essa doença (GASPARINI et al, 2014).

Ao avaliar os efeitos dos compostos CMS-08 e AP1 sobre a expressão da proteína supressora de tumor p53, observou-se que essa proteína está ausente em células de linhagem Daudi e que houve um aumento não significativo na sua expressão em células Jurkat após incubação com ambos os compostos (Figura 46). Os resultados obtidos em células Daudi são condizentes com estudos da literatura que relatam a presença de mutações na proteína p53 em casos de LB, as quais resultam na diminuição da expressão dessa proteína e, possivelmente, na resistência das células neoplásicas à apoptose (GAIDANO et al, 1991). Com relação à linhagem celular Jurkat, não se pode afirmar que a apoptose gerada pelos compostos CMS-08 e AP1 apresenta relação com a atividade de p53, visto que os resultados obtidos não foram significativos. No entanto, sabe-se que essa proteína é capaz de estimular o processo de apoptose por mecanismos distintos em neoplasias hematológicas, como, por exemplo, a modulação de membros da família Bcl-2 e o bloqueio do ciclo celular (ODA et al, 2000; ABBAS & DUTTA, 2009, GALLUZZI et al, 2018). De fato, sabe-se que a proteína p53 atua no primeiro *checkpoint* do ciclo celular (ABBAS & DUTTA, 2009) e, conforme demonstrado anteriormente, não foram observadas alterações no ciclo celular das linhagens avaliadas após o tratamento com os dois compostos (Figura 31), o que poderia justificar a ausência de modulação dessa proteína.

Foi avaliada também a influência dos compostos CMS-08 e AP1 nas vias PI3K/Akt/mTOR e MAPK/ERK, que estão ativadas de forma aberrante na LLA-T e no LB e são responsáveis pela proliferação, sobrevivência e mobilidade das células neoplásicas (MENDOZA, ER & BLENIS, 2011). Observou-se uma redução significativa na expressão das proteínas Akt, pAkt e MAP cinase/ERK2 nas células Daudi após o tratamento com o composto CMS-08 (Figuras 47 e 48). Essa redução

pode estar relacionada à indução da apoptose devido à diminuição da inibição causada por mTOR e estímulo pela proteína pró-apoptótica BAD e pela via de NF $\kappa$ B (MENDOZA, ER & BLENIS, 2011). Conforme demonstrado em outros estudos, a modulação dessas vias já é foco de estudo em neoplasias hematológicas, tendo em vista a sua relevância para o prognóstico e tratamento dessas doenças (KAWAUCHI et al, 2009; SPENDER & INMAN, 2012; EVANGELISTI et al, 2014; BERTACCHINI et al, 2015, LI et al, 2015; PARK, SIM & LEE K, 2016). No entanto, não foram observadas diferenças na expressão dessas proteínas em células Daudi tratadas com AP1 ou em células Jurkat tratadas com ambos os compostos (Figuras 47 e 48). Esses resultados divergem dos relatados por Zhao e colaboradores (2015) que demonstraram a inibição da via ERK/PI3K/Akt por uma naftoquinona, denominada shikonina, em células de LLA-T.

Por fim, foi investigado o envolvimento da via UPR na indução da apoptose pelos compostos CMS-08 e AP1 nas células Daudi e Jurkat. Segundo a literatura, a via UPR pode estar envolvida na patogênese das neoplasias hematológicas e sugere-se que, devido à heterogeneidade dessas doenças, sua ativação seja dependente de diferentes oncogenes. Além disso, agentes que interferem nessa via estão em fase pré-clínica de estudos para o tratamento dessas neoplasias (KHARABI MASOULEH et al, 2015). No presente estudo, observou-se uma redução significativa na expressão da proteína CHOP em células Daudi após o tratamento com o composto CMS-08, mas não foram observadas diferenças significativas na expressão dessa proteína em células Daudi tratadas com AP1 ou em células Jurkat tratadas com ambos os compostos (Figura 49). Segundo a literatura, as células Daudi são caracterizadas pela expressão do oncogene *MYC* que, de forma paradoxal, é capaz de ativar a proliferação celular e a apoptose. Estudos demonstraram maior ativação da via UPR em neoplasias que apresentam superexpressão de *MYC* em comparação com tecidos normais (HART et al, 2012; HUITING et al, 2018). Dessa forma, a diminuição da expressão de CHOP em células Daudi pelo composto CMS-08 é uma estratégia promissora para inibição da via UPR visto que essa via pode apresentar um papel intensificador da transformação induzida por *MYC*.

Como os resultados da citotoxicidade dos compostos CMS-08 e AP1 sobre as linhagens de neoplasias linfoides foram promissores, foi avaliado o efeito desses compostos *ex vivo* sobre células mononucleadas

de SP e MO de pacientes portadores dessas neoplasias (Tabela 9). Os resultados mostram que os dois compostos foram capazes de reduzir a viabilidade das células mononucleadas dos vinte e dois pacientes portadores de neoplasias linfoides incluídos neste estudo de forma dependente da concentração (Figura 50). Os diferentes valores de  $CI_{50}$  obtidos (Tabela 09) podem ser explicados pela heterogeneidade dessas doenças, fato amplamente discutido na literatura (SWERDLOW et al, 2017).

O composto AP1 mostrou-se mais eficiente do que o composto CMS-08 em todos os casos analisados, semelhante ao que foi observado *in vitro* com as células Daudi e Jurkat. O único caso de LLA-T incluído no estudo (Paciente 3) apresentou valores de  $CI_{50}$  superiores aos encontrados nas células Jurkat. No entanto, acredita-se que não seja possível realizar uma comparação fidedigna entre os dois modelos devido à diferença no estágio de maturação dessas células, visto que as células Jurkat apresentam fenótipo sugestivo de LLA-T madura. Além disso, a LLA-T de células precursoras iniciais é um subtipo raro e extremamente agressivo que apresenta a expressão de marcadores da linhagem mieloide (BOROWITZ et al, 2017 c).

O caso de LB (Paciente 7) apresentou resultados de  $CI_{50}$  próximos aos encontrados na linhagem Daudi de LB. Com relação aos outros pacientes, foram avaliados oito casos de LLA-B (Pacientes 2, 8, 12, 16, 17, 19, 20 e 22), uma neoplasia de células precursoras comprometidas com a linhagem de células B, que apresenta prognóstico pouco favorável em adultos (SWERDLOW et al, 2017). Apesar de nenhuma linhagem de LLA-B ter sido incluída no estudo, os dois compostos avaliados reduziram a viabilidade celular das amostras de forma dependente da concentração, o que permite sugerir que os compostos também sejam efetivos para esse tipo de leucemia. Os valores de  $CI_{50}$  mais baixos observados para os Pacientes 12 e 22 podem ser justificados pelo fato de a amostra ser quase em sua totalidade constituída por blastos leucêmicos (67,9 e 81%, respectivamente), o que sugere que possa haver um interferente nos ensaios, pois os compostos não reduzem a viabilidade das células não neoplásicas presentes em maiores quantidades nas outras amostras.

Foram avaliados dez casos de LCB, que inclui LDGCB, LF, LZME, LCM, tricoleucemia variante, LLC-B e um tipo de linfoma que não pode ser classificado e foi considerado LCB  $CD5^+$ . Todos os casos

analisados foram provenientes de amostras de SP e, por isso, tratam-se de linfomas leucemizados. Com exceção da LLC-B, apenas uma pequena parte dos LCB apresenta infiltração em SP no momento do diagnóstico, o que garante às doenças um prognóstico desfavorável (DELFA, 2011). Todos os pacientes que foram diagnosticados com doenças agressivas (LDGCB, LB e recidiva de LF) em amostras de SP evoluíram para o óbito. Já em casos de doenças indolentes, como a de LLC-B (Pacientes 14 e 18), devem ser consideradas outras características como a idade do paciente e a leucometria no momento do diagnóstico para estabelecer o prognóstico.

Além disso, foram avaliados dois casos de MM (Pacientes 15 e 21) que apresentaram valores de  $CI_{50}$  muito semelhantes entre si, porém superiores aos observados para as células MM.1S. Os resultados obtidos são promissores, visto que se trata de uma doença agressiva e incurável (SWERDLOW et al, 2017). Por fim, não foi possível avaliar nenhum caso de neoplasia de célula linfóide T madura, pois nenhum diagnóstico foi realizado no setor de Onco-hematologia da Unidade de Análises clínicas do HU/UFSC durante o período do estudo, tendo em vista que essa é uma doença rara.

É importante salientar ainda que nem todas as amostras com diagnóstico de neoplasias de células linfóides maduras foram incluídas no estudo, pois foram avaliadas apenas amostras de SP e MO e, a maior parte delas correspondia a outros materiais, como aspirados e fragmentos de linfonodos. No entanto, pode-se demonstrar a maior quantidade de neoplasias linfóides de células B em comparação com as neoplasias linfóides de células T em adultos, o que corrobora, mais uma vez, os dados da literatura.

Dessa forma, não foi possível realizar correlações entre as doenças ou grau de maturação das células, visto que os resultados obtidos foram muito heterogêneos. No entanto, embora a amostragem tenha sido pequena, os resultados *ex vivo* confirmam aqueles observados para as linhagens de células de neoplasias linfóides e indicam que os compostos CMS-08 e API são moléculas bioativas com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos.

## 7 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- Dentre os 28 compostos com o grupo 3,4,5-trimetoxifenila analisados no teste de triagem, os compostos EtA04 e Eh09 foram selecionados. No entanto, o composto EH09 causou hemólise e, por isso, foi excluído do estudo. O composto EtA04 causou citotoxicidade de forma dependente da concentração e do tempo de incubação em células Jurkat, Namalwa, Molt-4, K562 e MM.1S. Além disso, não foi citotóxico para células não neoplásicas. Sugere-se que a morte celular induzida pelo composto EtA04 seja apoptose com perda do  $\Delta\Psi_m$ . No entanto, ele não induziu bloqueio no ciclo celular e nem alteração na expressão da proteína Ki-67.

- Dos 38 derivados de tiossemicarbazonas analisados, o composto CMS-08 foi selecionado por ser citotóxico para as células de neoplasias linfoides (provenientes de linhagens e de pacientes). Além disso, não foi citotóxico para células não neoplásicas. Sugere-se que a morte celular induzida por esse composto esteja relacionada à apoptose intrínseca, visto que o mesmo induziu uma inversão dos membros antiapoptóticos (Bcl-2) e pró-apoptóticos (Bax) da família Bcl-2, o que gerou perda do  $\Delta\Psi_m$  dependente do tempo. Houve um aumento na expressão de caspase-3 ativada. O composto CMS-08 diminuiu a expressão da proteína antiapoptótica survivina em ambas as linhagens celulares e reduziu a expressão de NF $\kappa$ B em células Jurkat. CMS-08 diminuiu a expressão de Akt, pAkt e MAP cinase/ERK2 em células Daudi, o que sugere o envolvimento das vias PI3K/Akt/mTOR e MAPK/ERK na morte celular. Finalmente, o composto induziu a diminuição na expressão do fator de transcrição CHOP em células de linhagem celular Daudi, o que sugere a regulação da via UPR (Figura 51).

- O composto natural AP1 reduziu a viabilidade de células Daudi, Namalwa, Jurkat, Molt-4, K562 e MM.1S, além de células isoladas de pacientes com neoplasias linfoides. AP1 não causou hemólise, mas reduziu a viabilidade das células mononucleadas de indivíduos considerados saudáveis de forma semelhante àquela causada por fármacos já utilizados para o tratamento de neoplasias. Esse composto reduziu a expressão da proteína Ki-67 e acredita-se que seus mecanismos de morte celular incluam a ativação da apoptose intrínseca devido à

desregulação do equilíbrio entre membros pró e antiapoptóticos (Bcl-2/Bax), redução do  $\Delta\psi_m$  e liberação de AIF. No entanto, a apoptose extrínseca também parece estar envolvida na morte celular, conforme demonstrado pelo aumento da expressão de FasR. Houve um aumento na expressão de caspase-3 ativada. O composto AP1 também reduziu a expressão de survivina em ambas as linhagens e de NF $\kappa$ B em células Jurkat (Figura 52).

Figura 51 - Esquema ilustrativo do mecanismo de ação do composto CMS-08 em células de neoplasias linfoides.

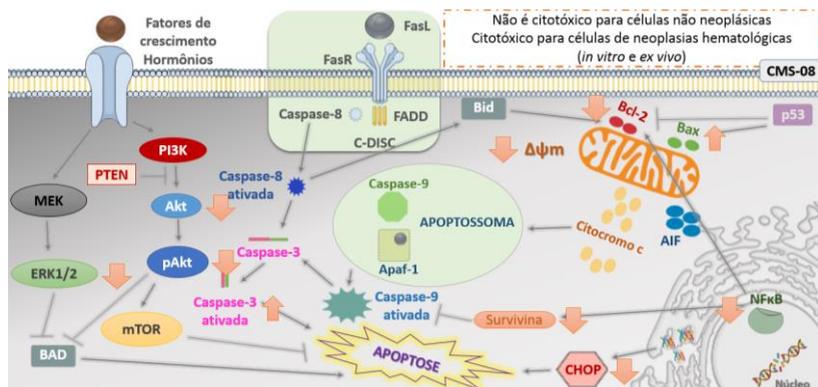
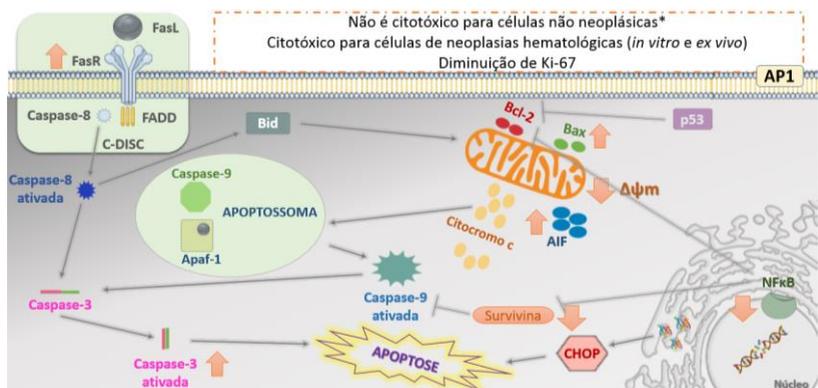


Figura 52 - Esquema ilustrativo do mecanismo de ação do composto AP1 em células de neoplasias linfoides.



## 8 PERSPECTIVAS

- Avaliar a capacidade dos compostos em induzir a produção mitocondrial de EROs e a atividade da glutatona;
- Avaliar o sinergismo com fármacos utilizados na clínica para neoplasias linfoides;
- Investigar a ação no citoesqueleto de células de neoplasias linfoides;
- Avaliar a expressão de outros fatores envolvidos na apoptose extrínseca, como, por exemplo, endonuclease G, citocromo c e outros receptores de membrana;
- Estudar estratégias para diminuir a toxicidade dos compostos;
- Analisar o efeito dos compostos em modelos *in vivo*.



## REFERÊNCIAS

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

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Cellular and Molecular Immunology: 8. ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2015.

ADAMS, J. M.; CORY, S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 5, p. 488 - 496, 2007.

ALGAEBASE. Disponível em: <http://www.algaebase.org>. Acesso em: 22 de janeiro de 2018.

ATTARD, G., GREYSTOKE, A., KAYE, S., DE BONO, J. Update on tubulin-binding agents. **Pathologie Biologie**, v. 54, n. 2, p. 72 - 84, 2006.

BHARTI, N.; SHAILENDRA, S.; SHARMA, S.; NAQVI, F.; AZAM, A. New palladium(II) complexes of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones: synthesis, spectral studies and In vitro anti-Amoebic activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 13, p. 2923 - 2929, 2003.

BAIGI, M. G.; BRAULT, L.; NÉGUESQUE, A.; BELEY, M.; HILALI, R. E.; GAÛZÈRE, F.; BAGREL, D. Apoptosis/necrosis switch in two different cancer cell lines: influence of benzoquinone- and hydrogen peroxide-induced oxidative stress intensity, and glutathione. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 6, p. 1547 - 1554, 2008.

BALACHANDRAN, C.; HARIBABU, J.; JEYALAKSHMI, K.; BHUVANESH, N. S. P.; KARVEMBU, R.; EMI, N.; AWALE, S. Nickel(II) bis(isatin thiosemicarbazone) complexes induced apoptosis through mitochondrial signaling pathway and G0/G1 cell cycle arrest in IM-9 cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 182, p. 208 - 221, 2018.

BANERJEE, S.; ARNST, K. E.; WANG, Y.; KUMAR, G.; DENG, S.; YANG, L.; LI, G.; YANG, J.; WHITE, S. W.; LI, W.; MILLER, D. D. Heterocyclic-fused pyrimidines as novel tubulin polymerization inhibitors targeting the colchicine binding site: structural basis and antitumor efficacy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, 1704e1718, 2018.

BANO, D.; PREHN, J. H. M. Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. **EBioMedicine**, v. 30, p. 29 – 37, 2018.

BASSAN, R., GATTA, G., TONDINI, C., WILLEMZE, R. Adult acute lymphoblastic leukaemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 50, n. 3, p. 223 - 261, 2004.

BERTACCHINI, J.; HEIDARI, N.; MEDIANI, L.; CAPITANI, S.; SHAHJAHANI, M.; AHMADZADEH, A.; SAKI, N. Targeting PI3K/AKT/mTOR network for treatment of leukemia. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 12, p. 2337 – 2347, 2015.

BHATTACHARYA, S.; DAS, A.; DATTA, S.; GANGULI, A.; CHAKRABARTI, G. Colchicine induces autophagy and senescence in lung cancer cells at clinically admissible concentration: potential use of colchicine in combination with autophagy inhibitor in cancer therapy. **Tumour Biology**, v. 37, n. 8, p. 10653 – 10664, 2016.

BIGOLIN, A. Investigação do mecanismo de morte celular induzido por compostos em células de linhagens de neoplasias hematológicas. 2016. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BISCEGLIE, F.; MUSIARI, A.; PINELLI, S.; ALINOVI, R.; MENOZZI, I.; POLVERINI, E.; TARASCONI, P.; TAVONE, M.; PELOSI, G. 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.

BLOOM, S.; SPITZ, H. Development of human lymphoid cells. **Annual Review of Immunology**, v. 24, p. 287-320, 2006.

BOROWITZ, M. J.; CHAN, J. C.; DOWNING, J. R.; LE BEAU, M. M.; ARBER, D. A. B-lymphoblast leukemia/lymphoma, not otherwise specified (NOS). In: The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. Lyon: IARC; p. 200-202, 2017.

BOROWITZ, M. J.; CHAN, J. C.; DOWNING, J. R.; LE BEAU, M. M.; ARBER, D. A. B-lymphoblast leukemia/lymphomawith recurrente genetic anomalies. In: The 2016 revision of the World Health Organization

(WHO) classification of lymphoid neoplasms. Lyon: IARC; p. 203-209, 2017a.

BOROWITZ, M. J.; BENÉ, M. C.; HARRIS, N. L.; PORWIT, A.; MATUTES, E.; ARBER, D. A. NK-lymphoblastic leukaemia/lymphoma. In: The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. Lyon: IARC; p. 213, 2017b.

BOROWITZ, M.J.; CHAN, J. C.; BENÉ, M. C.; ARBER, D. A. T-lymphoblastic leukaemia/lymphoma. In: The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. Lyon: IARC; p. 209-212, 2017c.

BOSE, P.; GRANT, S. Rational Combinations of Targeted Agents in AML. **Journal of Clinical Medicine**, v. 4, n. 4, p. 634 - 664, 2015.

BRANDÃO, H. N. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359 - 1369, 2010.

CABRERA, M.; GOMEZ, N.; REMES LENICOV, F.; ECHEVERRÍA, E.; SHAYO, C.; MOGLIONI, A.; FERNÁNDEZ, N.; DAVIO, C. G2/M Cell Cycle Arrest and Tumor Selective Apoptosis of Acute Leukemia Cells by a Promising Benzophenone Thiosemicarbazone Compound. **PLoS One**, v. 10, n. 9, e0136878, 2015.

CAMPESTRINI, J. Avaliação da ativação de mecanismos apoptóticos mediados pela via UPR (unfolded protein response) em células Jurkat estimuladas com a proteína Tat do HIV-1. 2015. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

CAMPO, E.; SWERDLOW, S. H.; HARRIS, N. L.; PILERI, S.; STEIN, H.; JAFFE, E. S. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. **Blood**, v. 117, n. 19, p. 5019-32, 2011.

CARDOSO, C. C. Neoplasias de células linfoides maduras B: avaliação dos casos diagnosticados e acompanhados no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina entre 2011 e 2014. 2015. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

CHANG, J. E.; MEDLIN, S. C.; KAHL, B. S.; LONGO, W. L.; WILLIAMS, E. C.; LIONBERGER, J.; KIM, K.; KIM, J.; ESTERBERG, E.; JUCKETT, M. B. Augmented and standard Berlin-Frankfurt-Munster chemotherapy for treatment of adult acute lymphoblastic leukemia.

**Leukemia & Lymphoma**, v. 49, n. 12, p. 2298 - 2307, 2008.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. S3 - 23, 2010.

CHEN, X.; DUAN, N.; ZHANG, C.; ZHANG, W. Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies.

**Journal of Cancer**, v. 7, n. 3, p. 314 - 323, 2016.

CHEN, X., WOOD, B. L. Monitoring minimal residual disease in acute leukemia: Technical challenges and interpretive complexities.

**Blood Reviews**, v. 31, p. 63 – 75, 2017.

COOPER, M. D. The early history of B cells. **Nature Reviews**

**Immunology**, v. 15, n. 3, p.191 - 197, 2015.

CORNELL, R. F.; PALMER, J. Adult acute leukemia. **Disease-a-Month**, v. 58, n. 4, 2012.

PILOZZI, E.; MULLER-HERMELINK, H. K.; FALINI, B.; DE WOLF-PEETERS, C.; FIDLER, C.; GATTER, K.; WAINSCOAT, J. Gene rearrangements in T-cell lymphoblastic lymphoma. **The Journal of**

**Pathology**, v. 188, n. 3, p. 267 – 270, 1999.

CORY, S.; ADAMS, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 9, p 647 – 56, 2002.

COSENTINO, L.; REDONDO-HORCAJO, M.; ZHAO, Y.; SANTOS, A. R.; CHOWDURY, K. F.; VINADER, V.; ABDALLAH, Q. M.; ABDEL-RAHMAN, H.; FOURNIER-DIT-CHABERT, J.; SHNYDER, S. D.; LOADMAN, P. M.; FANG, W. S.; DÍAZ, J. F.; BARASOAIN, I.; BURNS, P. A.; PORS, K. Synthesis and biological evaluation of colchicine B-Ring analogues tethered with halogenated benzylmoieties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 24, p. 11062 – 11066, 2012.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; EPIFANIO, R. A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 03 -716, 2009.

COULTER, J.B.; O'DRISCOLL, C.M.; BRESSLER, J.P. Hydroquinone Increases 5-Hydroxymethylcytosine Formation through Ten Eleven Translocation 1 (TET1) 5-Methylcytosine Dioxygenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 40, p. 28792-28800, 2013.

DANOVA, M.; GIORDANO, M.; MAZZINI, G.; RICCARDI, A. Expression of p53 protein during the cell cycle measured by flow cytometry in human leukemia. **Leukemia Research**, v. 14, n. 5, p. 417 – 422, 1990.

DAR, A. M.; NABI, R.; MIR, S.; GATOO, M. A.; SHAMSUZZAMAN.; LONE, S. H. Synthesis of steroidal imidazolidinethiones as potential apoptotic agents: Investigation by theoretical and experimental studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 79, p. 190 – 200, 2018.

DE AQUINO, T. M.; LIESEN, A. P.; DA SILVA, R. E.; LIMA, V. T.; CARVALHO, C. S.; DE FARIA, A. R.; DE ARAÚJO, J. M.; DE LIMA, J. G.; ALVES, A. J.; DE MELO, E. J.; GÓES, A. J. Synthesis, anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activities of benzaldehyde 4-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 MELOS, J. L.; TORRES-SANTOS, E. C.; FAIÕES, V. S.; DEL CISTIA, C. N.; SANT'ANNA, C. M.; RODRIGUES-SANTOS, C. E.; ECHEVARRIA, A. 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.; DA SILVA, A. L.; VENDRAMINI-COSTA, D. B.; DA CRUZ AMORIM, C. A.; CAMPOS, J. F.; RIBEIRO, A. G.; OLÍMPIO DE MOURA, R.; NEVES, J. L.; RUIZ, A. L.; ERNESTO DE CARVALHO, J.; ALVES DE LIMA, M. C. 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.

DE SANTANA, T. I.; BARBOSA, M. O.; GOMES, P. A. T. M.; DA CRUZ, A. C. N.; DA SILVA, T. G.; LEITE, A. C. L. Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 144, p. 874 – 886, 2018.

DELFA, S. B. Nuevas estrategias inmunofenotípicas aplicadas al diagnóstico y clasificación de síndromes linfoproliferativos crónicos. Tese de doutorado Departamento de Medicina, Universidade de Salamanca, Salamanca, 2011.

DUCKI, S.; RENNISON, D.; WOO, M.; KENDALL, A.; CHABERT, J. F.; MCGOWN, A. T.; LAWRENCE, N. J. Combretastatin-like chalcones as inhibitors of microtubule polymerization. Part 1: synthesis and biological evaluation of antivasular activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 22, p. 7698-710, 2009.

DUFEY, E.; SEPÚLVEDA, D.; ROJAS-RIVERA, D.; HETZ, C. Cellular Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Health and Disease. 1. An overview. **American Journal of Physiology**, v. 37, n. 7, p. 1152 - 1162, 2014.

DUNLEAVY, K., LITTLE, R. F., WILSON, W. H. Update on Burkitt Lymphoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 30, n. 6, p. 1333 - 1343, 2016.

DURINCK, K.; GOOSSENS, S.; PEIRS, S.; WALLAERT, A.; VAN LOOCKE, W.; MATTHIJSENS, F.; PIETERS, T.; MILANI, G.; LAMMENS, T.; RONDOU, P.; VAN ROY, N.; DE MOERLOOSE, B.; BENOIT, Y.; HAIGH, J.; SPELEMAN, F.; POPPE, B.; VAN VLIERBERGHE, P. Novel biological insights in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Experimental Hematology**, v. 43, n. 8, p. 625 - 639, 2015.

EFFERTH, T.; RÜCKER, G.; FALKENBERG, M.; MANNS, D.; OLBRICH, A.; FABRY, U.; OSIEKA, R. Detection of apoptosis in KG-1a leukemic cells treated with investigational drugs. **Arzneimittelforschung**, v. 46, n. 2, p. 196 - 200, 1996.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495 - 516, 2007.

ESPÍNDOLA, J. W.; CARDOSO, M. V.; FILHO, G. B.; OLIVEIRA E SILVA, D. A.; MOREIRA, D. R.; BASTOS, T. M.; SIMONE, C. A.; SOARES, M. B.; VILLELA, F. S.; FERREIRA, R. S.; CASTRO, M. C.; PEREIRA, V. R.; MURTA, S. M.; SALES JUNIOR, P. A.; ROMANHA, A. J.; LEITE, A. C. 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, 2015.

EVANGELISTI, C.; CHIARINI, F.; MCCUBREY, J.A.; MARTELLI, A.M. Therapeutic potential of targeting mTOR in T-cell acute lymphoblastic leukemia: An Update. **International Journal of Oncology**, v. 19, p. 7, 2018.

EZOE, S. Secondary leukemia associated with the anti-cancer agent, etoposide, a topoisomerase II inhibitor. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, n. 7, p. 2444 - 2453, 2012.

FESIK, S. W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 11, p. 876 - 885, 2005.

FERRAZ, K. S.; FERANDES, L.; CARRILHO, D.; PINTO, M. C.; LEITE, M. D. E. F.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; SPEZIALI, N. L.; MENDES, I. C.; BERALDO, H. 2-Benzoylpyridine-N(4)-tolyl thiosemicarbazones and their palladium(II) complexes: cytotoxicity against leukemia cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 20, p. 7138 - 7144, 2009.

FEUN, L.; MODIANO, M.; LEE, K.; MAO, J.; MARINI, A.; SAVARAJ, N.; PLEZIA, P.; ALMASSIAN, B.; COLACINO, E.; FISCHER, J.; MACDONALD, S. Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 50, n. 3, p. 223-229, 2002.

FINCH, R. A.; LIU, M. C.; GRILL, S. P.; ROSE, W. C.; LOOMIS, R.; VASQUEZ, K. M.; CHENG, Y. C.; SARTORELLI, A. C. 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.

FOURNIER-DIT-CHABERT, J.; VINADER, V.; SANTOS, A. R.; REDONDO-HORCAJO, M.; DRENEAU, A.; BASAK, R.; COSENTINO, L.; MARSTON, G.; ABDEL-RAHMAN, H.; LOADMAN, P. M.; SHNYDER, S. D.; DÍAZ, J. F.; BARASOAIN, I.; FALCONER, R. A.; PORS, K. Synthesis and biological evaluation of colchicine C-ring analogues tethered with aliphatic linkers suitable for prodrug derivatisation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 24, p. 7693 - 7696, 2012.

FREZZATO, F.; TRIMARCO, V.; MARTINI, V.; GATTAZZO, C.; AVE, E.; VISENTIN, A.; CABRELLE, A.; OLIVIERI, V.; ZAMBELLO, R.; FACCO, M.; ZONTA, F.; CRISTIANI, A.; BRUNATI, A. M.; MORO, S.; SEMENZATO, G.; TRENTIN, L. Leukaemic cells from chronic lymphocytic leukaemia patients undergo apoptosis following microtubuledepolymerization and Lyn inhibition by nocodazole. **British Journal of Haematology**, v. 165, n. 5, p. 659 - 672, 2014.

FU, D. J.; YANG, J. J.; LI, P.; HOU, Y. H.; HUANG, S. N.; TIPPIN, M. A.; PHAM, V.; SONG, L.; ZI, X.; XUE, W. L.; ZHANG, L. R.; ZHANG, S. Y. Bioactive heterocycles containing a 3,4,5-trimethoxyphenyl fragment exerting potent antiproliferative activity through microtubule destabilization. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 50 – 61, 2018.

FULDA, S. Cell death in hematological tumors. **Apoptosis**, v.14, n.4, p. 409 – 423, 2009.

FURIA, L.; PELICCI, P.; FARETTA, M. High-resolution cytometry for high-content cell cycle analysis. **Current Protocols in Cytometry**, v. 70, n. 7.41, p. 1 – 15, 2014.

FUSO, N.I.; CESCA, M.; BIZZARO, F.; GIAVAZZI, R. Combination therapy in cancer: effects of angiogenesis inhibitors on drug pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Chinese Journal of Cancer**, v. 35, p. 61-72, 2016.

GAIDANO, G.; BALLERINI, P.; GONG, J. Z.; INGHIRAMI, G.; NERI, A.; NEWCOMB, E. W.; MAGRATH, I. T.; KNOWLES, D. M.; DALLA-FAVERA, R. p53 mutation in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 12, p. 5413 – 5417, 1991.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; AARONSON, S. A.; ABRAMS, J. M.; ADAM, D.; AGOSTINIS, P.; et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death & Differentiation – Nature**, v. 25, n. 3, p. 486 – 541, 2018.

GARG, A. D.; MAES, H.; VAN VLIET, A. R.; AGOSTINIS, P. Targeting the hallmarks of cancer with therapy-induced endoplasmic reticulum (ER) stress. **Molecular & Cellular Oncology**, v. 2, n. 1, 2015.

GASPARINI, C.; CELEGHINI, C.; MONASTA, L.; ZAULI, G. NF- $\kappa$ B pathways in hematological malignancies. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 11, p. 2083 – 2102, 2014.

GENOVA, P.; VARADINOVA, T.; MATESANZ, A. I.; MARINOVA, D.; SOUZA, P. Toxic effects of bis(thiosemicarbazone) compounds and its palladium(II) complexes on herpes simplex virus growth. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 197, n. 2, p. 107 - 112, 2004.

GIRARDI, T.; VICENTE, C.; COOLS, J.; DE KEERSMAECKER, K. The genetics and molecular biology of T-ALL. **Blood**, v. 129, n. 9, p. 1113 – 1123, 2017.

GLOBOCAN. Disponível em:  
<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-factsheet.pdf>. Acesso em 08 dezembro 2018.

GOLDAR, S.; KHANIANI, M. S.; DERAKHSHAN, S. M.; BARADARAN, B. Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 6, p. 2129 - 2144, 2015.

HALUSKA, F. G.; TSUJIMOTO, Y.; CROCE, C. M. The t(8;14) chromosome translocation of the Burkitt lymphoma cell line Daudi occurred during immunoglobulin gene rearrangement and involved the heavy chain diversity region. **Genetics**, v. 84, p. 6835-6839, 1987.

HART, L. S.; CUNNINGHAM, J. T.; DATTA, T.; DEY, S.; TAMEIRE, F.; LEHMAN, S. L.; QIU, B.; ZHANG, H.; CERNIGLIA, G.; BI, M.; LI, Y.; GAO, Y.; LIU, H.; LI, C.; MAITY, A.; THOMAS-TIKHONENKO, A.; PERL, A. E.; KOONG, A.; FUCHS, S. Y. DIEHL, J. A.; MILLS, I. G.; RUGGERO, D.; KOUMENIS, C. ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 12, p. 4621 – 4634, 2012.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894 – 901, 2008.

HASSAN, M.; WATARI, H.; ABUALMAATY, A.; OHBA, Y.; SAKURAGI, N. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. **BioMed Research International**, v. 2014: 150845, 2014.

- HASHMI, A. A.; HUSSAIN, Z. F.; FARIDI, N.; KHURSHID, A. Distribution of Ki67 proliferative indices among WHO subtypes of non-Hodgkin's lymphoma: association with other clinical parameters. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 20, p. 8759 - 8763, 2014.
- HEJMADI, M. Introduction to Cancer Biology. New York: Momna Hejmadi & Ventus Publishing: ApS, p. 46, 2010.
- HERR, I., DEBATIN, K.M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*, v. 98, n. 9, p. 2603 - 2614, 2001.
- HOCHEGGER, H.; TAKEDA, S.; HUNT, T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 11, p. 910 – 916, 2008.
- HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, v. 12, p. 86, 2013.
- HOIJAT-FARSANGI, M. Novel and emerging targeted-based cancer therapy agents and methods. **Tumour Biology**, v. 36, n. 2, p.543-546, 2015.
- HORN, S.; HUGHES, M. A.; SCHILLING, R.; STICHT, C.; TENEV, T.; PLOESSER, M.; MEIER, P.; SPRICK, M. R.; MACFARLANE, M.; LEVERKUS, M. Caspase-10 negatively regulates caspase-8-mediated cell death, switching the response to CD95L in favor of NF-kappaB activation and cell survival. **Cell Reports**, v. 19, n. 4, p. 785 – 797, 2017.
- HOYT, M. T. The anticancer mode of action of the quinone natural product cribrastatin 6. Thesis (Doctor of Philosophy in Chemistry) - University of Illinois, Urbana, 2010.
- HUITING, L. N.; SAMAHA, Y.; ZHANG, G. L.; RODERICK, J. E.; LI, B.; ANDERSON, N. M.; WANG, Y. W.; WANG, L.; LAROCHE, F.; CHOI, J. W.; LIU, C. T.; KELLIHER, M. A.; FENG, H. UFD1 contributes to MYC-mediated leukemia aggressiveness through suppression of the proapoptotic unfolded protein response. **Leukemia**, 2018. [Epub ahead of print]
- HUNTER, A. M.; LACASSE, E. C.; KORNELUK, R. G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. **Apoptosis**, v. 12, n. 9, p. 1543 - 1568, 2007.

IACOBUCCI, I.; MULLIGHAN, C. G. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 9, p. 975 – 983, 2017.

ICHIKAWA, A.; HOTTA, T.; TAKAGI, N.; TSUSHITA, K.; KINOSHITA, T.; NAGAI, H.; MURAKAMI, Y.; HAYASHI, K.; SAITO, H. Mutations of p53 gene and their relation to disease progression in B-cell lymphoma. **Blood**, v. 79, n. 10, p. 2701 – 2707, 1992.

IMMING, P. Chapter 2 - Medicinal Chemistry: Definitions and Objectives, Drug Activity Phases, Drug Classification Systems. In: *The Practice of Medicinal Chemistry (Third Edition)*. WERMUTH, C. G. (Ed.). New York: Academic Press, 2008. p.63-72.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>. Acesso em 11 abril 2018.

INDRAN, I. R.; TUFO, G.; PERVAIZ, S.; BRENNER, C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1807, n. 6, p. 735 – 745, 2011.

ISSHIKI, K.; HIRASE, T.; MATSUDA, S.; MIYAMOTO, K.; TSUJI, A.; YUASA, K. Death-associated protein kinase 2 mediates nocodazole-induced apoptosis through interaction with tubulin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.468, n. 1-2, p. 113-8, 2015.

JANSSON, P. J.; KALINOWSKI, D. S.; LANE, D. J. R.; KOVACEVIC, Z.; SEEBACHER, N. A.; FOUANI, L.; SAHNI, S.; MERLOT, A. M.; RICHARDSON, D. R. The renaissance of polypharmacology in the development of anti-cancer therapeutics: Inhibition of the “Triad of Death” in cancer by Di-2-pyridylketone thiosemicarbazones. **Pharmacological Research**, v. 100, p, 255 – 260, 2015.

KARIN, M. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6867 -6874, 1999.

KASUGA, N. C.; SEKINO, K.; ISHIKAWA, M.; HONDA, A.; YOKOYAMA, M.; NAKANO, S.; SHIMADA, N.; KOUMO, C.; NOMIYA, K. Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 12 zinc(II) complexes with four thiosemicarbazone and two semicarbazone ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 96, n. 2–3, p. 298 - 310, 2003.

KATSUYA, T.; SATOSHI, F.; HIROYASU, E. Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues. **Cancer Letters**, v. 278, n. 2, p. 130 - 138, 2009.

KAWAUCHI, K.; OGASAWARA, T.; YASUYAMA, M.; OTSUKA, K.; YAMADA, O. The PI3K/Akt Pathway as a Target in the Treatment of Hematologic Malignancies. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 5, p. 550 – 559, 2009.

KHARABI MASOULEH, B.; CHEVET, E.; PANSE, J.; JOST, E.; O'DWYER, M.; BRUEMMENDORF, T. H.; SAMALI, A. Drugging the unfolded protein response in acute leukemias. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 8, p. 87, 2015.

KIECHLE, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clinica Chimica Acta**, v. 326, p. 27 - 45, 2002.

KIM, Y. H.; SHIN, K. J.; LEE, T. G.; KIM, E.; LEE, M. S.; RYU, S. H.; SUH, P. G. G2 arrest and apoptosis by 2-amino-N-quinoline-8-yl-benzenesulfonamide (QBS), a novel cytotoxic compound. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 9, p. 1333 - 1341, 2005.

KLAPPROTH, K.; SANDER, S.; MARINKOVIC, D.; BAUMANN, B.; WIRTH, T. The IKK2/NF-(kappa)B pathway suppresses MYCinduced lymphomagenesis. **Blood**, v. 114, n. 12, p. 2448 – 2458, 2009.

KOEFFLER, H. P.; GOLDE, D. W. Human myeloid leukemia cell lines: a review. **Blood**, v. 56, n. 3, p. 344 - 350, 1980.

KONUMA, T.; KATO, S.; OIWA-MONNA, M.; TOJO, A.; TAKAHASHI, S. Single-unit cord blood transplant for acute lymphoblastic leukemia and lymphoma using an intensified conditioning regimen of total body irradiation, high-dose cytarabine and cyclophosphamide. **Leukemia & Lymphoma**, v. 56, n. 4, p. 1148 - 1150, 2015.

KORDES, U.; KRAPPMANN, D.; HEISSMEYER, V.; LUDWIG, W. D.; SCHEIDEREIT, C. Transcription factor NF-kappaB is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells. **Leukemia**, v. 14, n. 3, p. 399 – 402, 2000.

KUMAR, S.; BAJAJ, S.; BODLA, R.B. Preclinical screening methods in cancer. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 48, n. 5, p. 481 - 486, 2016.

KUMAR, A.; SHARMA, P. R.; MONDHE, D. M. Potential anticancer role of colchicine-based derivatives: an overview. **Anticancer Drugs**, v. 28, n. 3, p. 250 – 262, 2017.

KUZNETSOVA, N. R.; SVIRSHCHEVSKAYA, E. V.; SITNIKOV, N. S.; ABODO, L.; SUTORIUS, H.; ZAPKE, J.; VELDER, J.; THOMOPOULOU, P.; OSCHKINAT, H.; PROKOP, A.; SCHMALZ, H. G.; FEDOROV, A. Y.; VODOVOZOVA, E. L. Lipophilic prodrugs of a triazole-containing colchicine analogue in liposomes: biological effects on human tumor cells. **Bioorganicheskaia Khimiia**, v. 39, n. 5, p. 609 – 618, 2013.

LAROCQUE, K.; OVADJE, P.; DJURDJEVIC, S.; MEHDI, M.; GREEN, J.; PANDEY, S. Novel analogue of colchicine induces selective pro-death autophagy and necrosis in human cancer cells. **PLoS One**, v. 9, n. 1, e87064, 2014.

LAUX, I.; NEL, A. Evidence that oxidative stress-induced apoptosis by menadione involves Fas-dependent and Fas-independent pathways. **Clinical Immunology**, v. 101, n. 3, p. 335 – 344, 2001.

LAWRENCE, N. J.; PATTERSON, R.P.; OOI, L.L.; COOK, D.; DUCKI, S. Effects of alpha-substitutions on structure and biological activity of anticancer chalcones. **Bioorganic & Medical chemical Letters**, n.16, p. 5844 - 5848, 2006.

LEMKE, T. L.; SHEK, T. W.; CATES, L. A.; SMITH, L. K.; COSBY, L. A.; SARTORELLI, A. C. 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.

LEON-GONZALES, A. J.; ACERO, N.; MUNOZ-MINGARRO, D.; NAVARRO, I.; MARTIN-CORDERO, C. Chalcones as Promising Lead Compounds on Cancer Therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 30, p. 3407-3425, 2015.

LEONCINI, L.; CAMPO, E.; STEIN, H.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. F.; KLUIN, P. M. Burkitt lymphoma. In: The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. Lyon: IARC; p. 330 - 334, 2017.

LI, C. C.; O'CONNELL, C. D.; BECKWITH, M.; LONGO, D. L. Detection of p53 mutations in B cell non-Hodgkin's lymphoma cell lines. **Leukemia**, v. 9, n. 4, p. 650 – 655, 1995.

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

LI, C.; XIN, P.; XIAO, H.; ZHENG, Y.; HUANG, Y.; ZHU, X. The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 inhibits proliferation and induces apoptosis of burkitt lymphoma cells. **Cancer Cell International**, v. 15, p. 65, 2015.

LI, D.; HU, C.; LI, H. Survivin as a novel target protein for reducing the proliferation of cancer cells. **Biomedical Reports**, v. 8, n. 5, p. 399 – 406, 2018.

LI, L.; JIANG, S.; LI, X.; LIU, Y.; SU, J.; CHEN, J. Recent advances in trimethoxyphenyl (TMP) based tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 482 – 494, 2018.

LIBERTA, A.; WEST, D. Antifungal and antitumor activity of heterocyclic thiosemicarbazones and their metal complexes: current status. **Biometals**, v. 5, n. 2, p. 121-126, 1992.

LIU, M. C.; LIN, T. C.; SARTORELLI, A. C. Synthesis and antitumor activity of amino derivatives of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 20, p. 3672 – 3677, 1992.

LIU, M.; LU, L. Plastoquinone and Ubiquinone in Plants: Biosynthesis, Physiological Function and Metabolic Engineering. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1898, 2016.

LOBANA, T. S.; SHARMA, R.; CASTIÑEIRAS, A.; BUTCHER, R. J. Thiosemicarbazone Derivatives of Copper(I): Influence of Substituents (R) at N1 Atom of [(C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N)HC<sub>2</sub>=N<sub>3</sub>N<sub>2</sub>H-C1(=S)N1HR] in the Formation of 1D or 2D Networks of Copper(I) Complexes. **Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie**, v. 636, n. 15, p. 2698 - 2703, 2010.

LONETTI, A.; ANTUNES, I. L.; CHIARINI, F.; ORSINI, E.; BUONTEMPO, F.; RICCI, F.; TAZZARI, P. L.; PAGLIARO, P.; MELCHIONDA, F.; PESSI, A.; BERTAINA, A.; LOCATELLI, F.;

MCCUBREY, J. A.; BARATA, J. T.; MARTELLI, A. M. Activity of the pan-class I phosphoinositide 3-kinase inhibitor NVP-BKM120 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 28, n. 6, p. 1196 – 1206, 2014.

LUPESCU, A.; BISSINGER, R.; JILANI, K.; LANG, F. In vitro induction of erythrocyte phosphatidylserine translocation by the natural naphthoquinone shikonin. **Toxins**, v. 6, n. 5, p. 1559 - 1574, 2014.

LYNCH, R. C., GRATZINGER, D., ADVANI, R. H. Clinical Impact of the 2016 Update to the WHO Lymphoma Classification. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 18, n. 7, p. 45, 2017.

MACÍAS-MARTÍNEZ, B. I.; CORTÉS-HERNÁNDEZ, D. A.; ZUGASTI-CRUZ, A.; CRUZ-ORTÍZ, B. R.; MÚZQUIZ-RAMOS, E. M. Heating ability and hemolysis test of magnetite nanoparticles obtained by a simple co-precipitation method. **Journal of Applied Research and Technology**, v. 14, n. 4, p. 239 – 244, 2016.

MACKENZIE, M. J.; SALTMAN, D.; HIRTE, H.; LOW, J.; JOHNSON, C.; POND, G.; MOORE, M. J. A Phase II study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) and gemcitabine in advanced pancreatic carcinoma. A trial of the Princess Margaret hospital Phase II consortium. **Invest New Drugs**, v. 25, p. 553 – 558, 2017.

MAIORAL, M. F.; GASPAR, P. C.; SOUZA, G. R. R; MASCARELLO, A.; CHIARADIA-DELATORRE, L. D.; LICÍNIO, M. A.; RABELLO-MORAES, A. C.; YUNES, R. O.; NUNES, R. J.; SANTOS-SILVA, M. C. Apoptotic events induced by synthetic naphthylchalcones in human acute leucemia cell lines. **Biochimie**, v. 95, n. 4, p. 866-874, 2013.

MAIORAL, M. F.; MORAES, A. C.; SGAMBATTI, K. R.; YUNES, R. O.; NUNES, R. J.; SANTOS-SILVA, M. C. Investigation of cellular mechanisms involved in apoptosis induced by a synthetic naphthylchalcone in acute leucemia cell lines. **Anti-Cancer Drugs**, v. 27, n. 8, p. 738-747 2016.

MAIORAL, M. F.; BODAK, C. D. N.; STEFANES, N. M.; BIGOLIN, A.; MASCARELLO, A.; CHIARADIA-DELATORRE, L. D.; YUNES, R. O.; NUNES, R. J.; SANTOS-SILVA, M. C. Cytotoxic effect of a novel naphthylchalcones against multiple câncer cells focusing on hematologic malignancies. **Biochimie**, v. 140, p. 48-57, 2017.

- MAIORAL, M. F. Investigação de diferentes mecanismos apoptóticos induzidos por compostos de origem natural e sintética em células de neoplasias hematológicas. 2017. Tese (Doutorado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- MALARZ, K.; MROZEK-WILCZKIEWICZ, A.; SERDA, M.; REJMUND, M.; POLANSKI, J.; MUSIOL, R. The role of oxidative stress in activity of anticancer thiosemicarbazones. **Oncotarget**, v. 9, n. 25, p. 17689 – 17710, 2018.
- MARKOVIĆ, V.; JANIĆIJEVIĆ, A.; STANOJKOVIĆ, T.; KOLUNDŽIJA, B.; SLADIĆ, D.; VUJČIĆ, M.; JANOVIĆ, B.; JOKSOVIĆ, L.; DJURDJEVIĆ, P. T.; TODOROVIĆ, N.; TRIFUNOVIĆ, S.; JOKSOVIĆ, M. D. Synthesis, cytotoxic activity and DNA-interaction studies of novel anthraquinone-thiosemicarbazones with tautomerizable methylene group. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 228 – 238, 2013.
- MARZO-MAS, A.; BARBIER, P.; BREUZARD, G.; ALLEGRO, D.; FALOMIR, E.; MURGA, J.; CARDA, M.; PEYROT, V.; MARCO, J. A. Interactions of long-chain homologues of colchicine with tubulin. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 126, p. 526 – 535, 2017.
- MATASSOV, D.; KAGAN, T.; LEBLANC, J.; SIKORSKA, M.; ZAKERI, Z. Measurement of apoptosis by DNA fragmentation. **Methods in Molecular Biology**, v. 282, p. 1-17, 2004.
- MATZNO, S.; YAMAGUCHI, Y.; AKIYOSHI, T.; NAKABAYASHI, T.; MATSUYAMA, K. An attempt to evaluate the effect of vitamin K3 using as an enhancer of anticancer agents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 6, p. 1270 -1273, 2008.
- MELCHERS, F. Checkpoints that control B cell development. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 6, p. 2203-10, 2015.
- MENDOZA, M.C.; ER, E.E.; BLENIS, J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 36, n. 6, p. 320 – 328, 2011.
- MISHRA, A. K.; MISHRA, S. B. MANAV, N.; SALUJA, D.; CHANDRA, R.; KAUSHIK, N. K. Synthesis, characterization, antibacterial and cytotoxic study of platinum (IV) complexes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 18, p. 6333 - 6340, 2006.

MOCAN, T. Hemolysis as Expression of Nanoparticles-Induced Cytotoxicity in Red Blood Cells. **Biotechnology, Molecular Biology and Nanomedicine**, v. 1, n. 1, 2013.

MOHARRAM, S. A.; SHAH, K.; KAZI, J. U. T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells Display Activation of Different Survival Pathways. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 19, p. 4124, 2017.

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

MORI, J.; IWASHIMA, M.; WAKASUGI, H.; SAITO, H.; MATSUNAGA, T.; OGASAWARA, M.; TAKAHASHI, S.; SUZUKI, H.; HAYASHI, T. New plastoquinones isolated from the brown alga, *Sargassum micracanthum*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 9, p. 1159 – 1163, 2005.

MORI, K. Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. **The Journal of Biochemistry**, v. 146, p. 743 - 750, 2009.

MOUDI, M.; GO, R.; YIEN, C. Y.; NAZRE, M. Vinca alkaloids. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 4, n. 11, p. 1231 – 1235, 2013.

MÚZQUIZ-RAMOS, E. M.; GUERRERO-CHÁVEZ, V.; MACÍAS-MARTÍNEZ, B. I.; LÓPEZBADILLO, C. M.; GARCÍA-CERDA, L. A. Synthesis and characterization of maghemite nanoparticles for hyperthermia applications. **Ceramics International**, v. 41, n. 1, p. 397 - 402, 2014.

NAGASAWA, T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 2, p. 107-116, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products from marine invertebrates and microbes as modulators of antitumor targets. **Current Drug Targets**, v. 7, n. 3, p. 279 – 304, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461 – 477, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629 – 661, 2016.

NGUYEN, L., PAPENHAUSEN, P., SHAO, H. The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. **Genes**, v. 8, n. 4, p. 116, 2017.

NI CHONGHAILE, T.; SAROSIEK, K. A.; VO, T. T.; RYAN, J. A.; TAMMAREDDI, A.; MOORE VDEL, G.; DENG, J.; ANDERSON, K. C.; RICHARDSON, P.; TAI, Y. T.; MITSIADES, C. S.; MATULONIS, U. A.; DRAPKIN, R.; STONE, R.; DEANGELO, D. J.; MCCONKEY, D. J.; SALLAN, S. E.; SILVERMAN, L.; HIRSCH, M. S.; CARRASCO, D. R.; LETAI, A. Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy. **Science**, v. 334, n. 6059, p. 1129 – 1133, 2011.

NOGAI, H.; DÖRKEN, B.; LENZ, G. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 14, p. 1803 - 1811, 2011.

NORBERG, E.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, n. 1, p. 95 - 100, 2010.

NOWAK, D., STEWART, D., KOEFFLER, H. P. Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development. **Blood**, v. 113, n. 16, p. 3655 - 3665, 2009.

NUMATA, A.; KANBARA, S.; TAKAHASHI, C.; FUJIKI, R.; YONEDA, M.; USAMI, Y.; FUJITA, E. A cytotoxic principle of the brown alga *Sargassum tortile* and structures of chromenes. **Phytochemistry**, v. 31, n. 4, p. 1209 - 1213, 1992.

ODA, E.; OHKI, R.; MURASAWA, H.; NEMOTO, J.; SHIBUE, T.; YAMASHITA, T.; TOKINO, T.; TANIGUCHI, T.; TANAKA, N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. **Science**, v. 288, n. 5468, p. 1053 - 1058, 2000.

OLIVEIRA, C. G.; MAIA, P. I. S.; MIYATA, M.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; ALMEIDA, E. T.; DEFLON, V. M. Cobalt(III) complexes with thiosemicarbazones as potential anti-*Mycobacterium tuberculosis* agents. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 1848 - 1856, 2014.

OLIVEIRA, A. A.; PERDIGÃO, G. M.; RODRIGUES, L. E.; DA SILVA, J. G.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; TAKAHASHI, J. A.; ROCHA, W. R.; BERALDO, H. Cytotoxic and antimicrobial effects of indium(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 3, p. 918 – 932, 2017.

PALANIMUTHU, D.; SHINDE, S. V.; SOMASUNDARAM, K.; SAMUELSON, A. G. In Vitro and in Vivo Anticancer Activity of Copper Bis(thiosemicarbazone) Complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 722 - 734, 2013.

PALENIK, G. J.; RENDLE, D. F.; CARTER, W. S. The crystal and molecular structures of thiosemicarbazones; an antitumor agent 5-hydroxy-2-formylpyridine thiosemicarbazone sesquihydrate and the inactive acetone thiosemicarbazone. **Acta Crystallographica Section B**, v. 30, n. 10, p. 2390 - 2395, 1974.

PANDEYA, S. N.; SRIRAM, D.; NATH, G.; DECLERCQ, E. Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities of Schiff and Mannich bases derived from isatin derivatives and N-[4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl] thiosemicarbazide. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 25 - 31, 1999.

PARK, S.; SIM, H.; LEE, K. Rapamycin-resistant and torin-sensitive mTOR signaling promotes the survival and proliferation of leukemic cells. **BMB Reports**. v. 49, n.1, p. 63 – 68, 2006.

PARK, E.; GANG, E. J.; HSIEH, Y. T.; SCHAFFER, P.; CHAE, S.; KLEMM, L.; HUANTES, S.; LOH, M.; CONWAY, E. M.; KANG, E. S.; KOO, H. H.; HOFMANN, W. K.; HEISTERKAMP, N.; PELUS, L.; KEERTHIVASAN, G.; CRISPINO, J.; KAHN, M.; MÜSCHEN, M.; KIM, Y. M. Targeting survivin overcomes drug resistance in acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 118, n. 8, p. 2191 – 2199, 2011.

PASQUIER, E., KAVALLARIS, M. Microtubules: a dynamic target in cancer therapy. **IUBMB Life**, v. 60, n. 3, p. 165-70, 2008.

PATHMANATHAN, N.; BALLEINE, R. L. Ki67 and proliferation in breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 66, n. 6, p. 512-6, 2013.

PEDRINI, F. S.; DOMENEGHINI-CHIARADIAB, L.; LICÍNIO, M. A.; MORAES, A. C. R.; CURTA, J. C.; COSTA, A.; MASCARELLO, A.;

CRECZINSKY-PASA, T. B.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; SANTOS-SILVA, M. C. Induction of apoptosis and cell cycle arrest in L-1210 murine lymphoblastic leukaemia cells by (2E)-3-(2-naphthyl)-1-(3'-methoxy-4'-hydroxy-phenyl)-2-propen-1-one. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 9, p. 1128 - 1136, 2010.

PEREIRA, J.; LAGE, L. A. P. C. Linfoma de Burkitt. In *Citometria de fluxo – Aplicações no laboratório clínico e de pesquisa*. Editora Atheneu, p. 255-261, 2013.

PEREIRA, J. K.; MACHADO-NETO, J. A.; LOPES, M. R.; MORINI, B. C.; TRAINA, F.; COSTA, F. F.; SAAD, S. T.; FAVARO, P. Molecular effects of the phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor NVP-BKM120 on T and B-cell acute lymphoblastic leukaemia. **European Journal of Cancer**, v. 51, n. 14, p. 2076 - 2085, 2015.

PEREZ, E. A. Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, n. 8, p. 2086 - 2095, 2008.

PERINI, G. F.; RIBEIRO, G. N.; PINTO NETO, J. V.; CAMPOS, L. T.; HAMERSCHLAK, N. BCL-2 as therapeutic target for hematological malignancies. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 11, n. 1, p. 65, 2018.

PERKINS, A. S.; Friedberg, J. W. Burkitt lymphoma in adults. **American Society Hematology Education Program**, v. 2008, p. 341- 348, 2008.

PERLMAN, H.; ZHANG, X.; CHEN, M. W.; WALSH, K.; BUTTYAN, R. An elevated bax/bcl-2 ratio corresponds with the onset of prostate epithelial cell apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 6, n. 1, p. 48 - 54, 1999.

PERONDI, D. M. Investigação do mecanismo de morte celular induzido por tiossemicarbazonas em linhagens de células de leucemias agudas humanas. 2018. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

POPESCU, R.C.; ANDRONESCU, E.; VASILE, B.S.; TRUSCA, R.; BOLDEIU, A.; MOGOANTA, L.; MOGOSANU, G.D.; TEMELIE, M.; RADU, M.; GRUMEZESCU, A.M.; SAVU, D. Fabrication and Cytotoxicity of Gemcitabine-Functionalized Magnetite Nanoparticles. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1080 - 1090, 2017.

PORTER, A. G.; DHAKSHINAMOORTHY, S. Apoptosis initiated by dependence receptors: a new paradigm for cell death? **Bioessays**, v. 26, n. 6, p. 656 - 664, 2004.

RAETZ, E. A., TEACHEY, D. T. T-cell acute lymphoblastic leukemia. **American Society Hematology Education Program**, v. 2016, n. 1, p. 580 – 588, 2016.

RIEDL, S. J; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature**, v. 5, p. 897 - 906, 2004.

RISINGER, A. L.; GILES, F. J.; MOOBERRY, S. L. Microtubule dynamics as a target in oncology. **Cancer Treatment Reviews**, v. 35, n. 3, p.255 - 261, 2009.

RIVERA, P.; PODESTA, F. New plastoquinones from the brown alga *Desmarestia menziesii*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 68, p. 1399-1400, 1990.

RIZZATTI, E. G. Leucemias linfoblásticas agudas. In *Citometria de fluxo – Aplicações no laboratório clínico e de pesquisa*. Editora Atheneu, p. 107-120, 2013.

ROWE, M., FITZSIMMONS, L., BELL, A. I. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. **Chinese Journal of Cancer**, v. 33, n. 12, p. 609 - 619, 2014.

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

RUTKOWSKI, D. T.; KAUFMAN, R. J. A trip to the ER: coping with stress. **Trends in Cell Biology**, v.14, n. 1, p. 20 - 28, 2004.

SAFTA, B.; ZIANI, L.; FAVRE, L.; LAMENDOUR, L.; GROS, G.; MAMI-CHOUAIB, F.; MARTINVALET, D.; THIERY, J. Granzyme B-activated p53 interacts with Bcl-2 to promote cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. **Journal of Immunology**, v. 194, n. 1, p. 418 - 428, 2015.

SALLES, G.; BARRETT, M.; FOÀ, R.; MAURER, J.; O'BRIEN, S.; VALENTE, N.; WENGER, M.; MALONEY, D. G. Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience. **Advances in Therapy**, v. 34, n. 10, p 2232 – 2273, 2017.

SALUM, L. B., ALTEI, W. F., CHIARADIA L. D., CORDEIRO, M.N., CANEVAROLO, R. R., MELO, C. P., WINTER, E., MATTEI, B., DAGHESTANI, H. N., SANTOS-SILVA, M. C., CRECZYNSKI-PASA, T. B., YUNES, R. A., YUNES, J. A., ANDRICOPULO, A. D., DAY, B. W., NUNES, R. J., VOGT, A. Cytotoxic 3,4,5-trimethoxychalcones as mitotic arresters and cell migration inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 501 – 510, 2013.

SALUM, L. B. Planejamento de ligantes da tubulina com propriedades antitumorais. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, 2011.

SALUM, L. B., MASCARELLO, A., CANEVAROLO, R. R., ALTEI, W. F., LARANJEIRA, A. B., NEUENFELDT, P. D., STUMPF, T. R., CHIARADIA-DELATORRE, L. D., VOLLMER, L. L., DAGHESTANI, H. N., DE SOUZA MELO, C. P., SILVEIRA, A. B., LEAL, P. C., FREDERICO, M. J., DO NASCIMENTO, L. F., SANTOS, A. R., ANDRICOPULO, A. D., DAY, B. W., YUNES, R. A., VOGT, A., YUNES, J. A., NUNES, R. J. N-(1'-naphthyl)-3,4,5-trimethoxybenzohydrazide as microtubule destabilizer: Synthesis, cytotoxicity, inhibition of cell migration and in vivo activity against acute lymphoblastic leukemia. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 96, p. 504-518, 2015.

SANO, R.; REED, J.C. ER stress-induced cell death mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1833, n. 12, p. 3460 - 3470, 2013.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 45, p. 528 - 537, 2000.

SARKAR, F. H.; LI, Y.; WANG, Z.; KONG, D. Cellular signaling perturbation by natural products. **Cellular Signalling**, v. 21, n. 11, p. 1541 - 1547, 2009.

SCHRÖDER, M. Endoplasmic reticulum stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 6, p. 862 - 894, 2008.

SENS, L. Síntese, caracterização e análises farmacológicas de novos derivados de tiossemicarbazonas e amidas: um estudo de correlação estrutura-atividade. 2018. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SERDA, M.; KALINOWSKI, D. S.; MROZEK-WILCZKIEWICZ, A.; MUSIOL, R.; SZURKO, A.; RATUSZNA, A.; PANTARAT, N.; KOVACEVIC, Z.; MERLOT, A. M.; RICHARDSON, D. R.; POLANSKI, J. 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.

SEVRIOUKOVA, I. F. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 12, p. 2545 - 2579, 2011.

SHORT, N. J.; JABBOUR, E. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: How to Recognize and Treat It. **Current Oncology Reports**, v. 19, n. 1, p. 6, 2017.

SIEGEL, D. Implantação da hibridização in situ fluorescente para investigação da translocação entre os cromossomos 8 e 14 em pacientes com suspeita de Linfoma de Burkitt na Divisão de Análises Clínicas do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago. Monografia (especialização) - Universidade Federal de Santa Catarina, Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago. Programa de Pós-Graduação em Residência Integrada Multiprofissional em Saúde - Alta complexidade, 2016.

SHAN, Z. L.; ZHONG, L.; XIAO, C. L.; GAN, L. G.; XU, T.; SONG, H.; YANG, R.; LI, L.; LIU, B. Z. Shikonin suppresses proliferation and induces apoptosis in human leukemia NB4 cells through modulation of MAPKs and c-Myc. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 3, p. 3055 - 3060, 2017.

SHANKLAND, K. R.; ARMITAGE, J. O.; HANCOCK, B. W. Non-Hodgkin lymphoma. **The Lancet**, v. 380, n. 9844, p. 848-57, 2012.

SHAO, J.; ZHOU, B.; DI BILIO, A. J.; ZHU, L.; WANG, T.; QI, C.; SHIH, J.; YEN, Y. A ferrous-Triapine complex mediates formation of reactive oxygen species that inactivate human ribonucleotide reductase. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, p. 586 - 592, 2006.

SHCHEGRAVINA, E. S.; MALEEV, A. A.; IGNATOV, S. K.; GRACHEVA, I. A.; STEIN, A.; SCHMALZ, H. G.; GAVRYUSHIN, A. E.; ZUBAREVA, A. A.; SVIRSHCHEVSKAYA, E. V.; FEDOROV, A. Y. Synthesis and biological evaluation of novel non-racemic indole-containing allocolchicinoids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 141, p. 51 - 60, 2017.

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

SILVA, A. P.; MARTINI, M. V.; OLIVEIRA, C. M.; CUNHA, S.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L.; SILVA, C. C. Antitumor activity of (-)-alpha-bisabolol-based thiosemicarbazones against human tumor cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2987 – 2993, 2010.

SMITH, L. Hematopoiesis. In: RODAK, BK; FRITSMA GA; KEOHANE EM. **Hematology: Clinical Principles and Applications**. Elsevier Saunders, cap. 7, p. 66 - 85, 2012.

SONG, S.; JEONG, J. Y.; JEONG, S. H.; KIM, H. K.; KO, K. S.; RHEE, B. D.; KIM, N.; HAN, J. Mitochondria as therapeutic targets for cancer stem cells. **World Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 2, p. 418 - 427, 2015.

SPENDER, L.C.; INMAN, G. Phosphoinositide 3-kinase/AKT/mTORC1/2 signaling determines sensitivity of Burkitt's lymphoma cells to BH3 mimetics. **Molecular Cancer Research**, v. 10, n. 3, p. 347 – 359, 2010.

STEFANI, C.; AL-EISAWI, Z.; JANSSON, P. J.; KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R. 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.

STEFANES, N. M. Avaliação do Efeito Apoptótico das Pirazolinas Sintéticas H3TM4 e H3TM6 em células de Linhagens de Leucemias Agudas Humanas. 2018. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

STILGENBAUER, S.; EICHHORST, B.; SCHETELIG, J.; COUTRE, S.; SEYMOUR, J. F.; MUNIR, T.; PUVVADA, S. D.; WENDTNER, C. M.; ROBERTS, A. W.; JURCZAK, W.; MULLIGAN, S. P.; BOTTCHER, S.; MOBASHER, M.; ZHU, M.; DESAI, M.; CHYLA, B.; VERDUGO, M.; ENSCHEDE, S. H.; CERRI, E.; HUMERICKHOUSE, R.; GORDON, G.; HALLEK, M.; WIERDA, W. G. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. **Lancet Oncology**, v. 17, n. 6, p. 768 – 778, 2016.

SUN, X.; KAUFMAN, P. D. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, v. 127, n. 2, p. 175 – 186, 2018.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; PILERI, S. A.; HARRIS, N. L.; STEIN, H.; SIEBERT, R.; ADVANI, R.; GHIELMINI, M.; SALLES, G. A.; ZELENETZ, A. D.; JAFFE, E. S. Introduction and overview of the classification of lymphoid neoplasms. In: *The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms*. Lyon: IARC; 2017.

SZCZEPAŃSKI, T.; PONGERS-WILLEMSE, M. J.; LANGERAK, A. W.; HARTS, W. A.; WIJKHUIJS, A. J.; VAN WERING, E. R.; VAN DONGEN, J. J. Ig heavy chain gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leucemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements, and are rare in T-cell receptor alpha beta lineage. *Blood*, v. 93, n. 12, p. 4079 – 4085, 1999.

SZWED, M.; LAROCHE-CLARY, A.; ROBERT, J.; JOZWIAK, Z. Induction of apoptosis by doxorubicin-transferrin conjugate compared to free doxorubicin in the human leukemia cell lines. *Chemico-Biological Interactions*, v. 220, p. 140-148, 2014.

TAHARA, M.; INOUE, T.; MIYAKURA, Y.; HORIE, H.; YASUDA, Y.; FUJII, H.; KOTAKE, K.; SUGANO, K. Cell diameter measurements obtained with a handheld cell counter could be used as a surrogate marker of G2/M arrest and apoptosis in colon cancer cell lines exposed to SN-38. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 434, n. 4, p. 753 – 759, 2013.

TANG, X.; ZHANG, C.; WEI, J.; FANG, Y.; ZHAO, R.; YU, J. Apoptosis is induced by shikonin through the mitochondrial signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, v. 13, n. 4, p. 3668 – 3674, 2016.

TEITZ, Y. D.; RONEN, D.; STEMATSKY, T.; RIGGS, J. L. Inhibition of human immunodeficiency virus by N-methylisatin- $\beta$ 4':4'-diethylthiosemicarbazone and N-allylisatin- $\beta$ -4':4'-diallylthiosemicarbazone. *Antiviral Research*, v. 24, n. 4, p. 305-314, 1994.

TENÓRIO, R. P.; GÓES, A. J. S.; DE LIMA, J. G.; DE FARIA, A. R.; ALVES, A. J.; DE AQUINO, T. M. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. *Química Nova*, v. 28, p. 1030 - 1037, 2005.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood Cancer Journal**, v. 7, n. 6, e577, 2017.

THOMOPOULOU, P.; SACHS, J.; TEUSCH, N.; MARIAPPAN, A.; GOPALAKRISHNAN, J.; SCHMALZ, H. G. New colchicine-derived triazoles and their influence on cytotoxicity and microtubule morphology. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 43, n. 8, p. 625 – 639, 2015.

THORLEY-LAWSON, D. A., ALLDAY, M. J. The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 913-24, 2008.

VASEKAR, M.; RIZVI, S.; LIU, X.; VRANA, K. E.; ZHENG, H. Novel Immunotherapies for Hematological Malignancies. **Current Molecular Pharmacology**, v. 9, n. 3, p. 264 - 271, 2016.

VERMES, C.; HAANEN, H.; STEFFENS-NAKKEN, C.; REUTELINGSPERGER, A. novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, p. 39 – 51, 1995.

VILANOVA, C.; DÍAZ-OLTRA, S.; MURGA, J.; FALOMIR, E.; CARDA, M.; REDONDO-HORCAJO, M.; DÍAZ, J. F.; BARASOAIN, I.; MARCO, J. A. Design and synthesis of pironetinanalogue/colchicine hybrids and study of their cytotoxic activity and mechanisms of interaction with tubulin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 24, p. 10391 – 10403, 2014.

VILIMAS, T.; MASCARENHAS, J.; PALOMERO, T.; MANDAL, M.; BUONAMICI, S.; MENG, F.; THOMPSON, B.; SPAULDING, C.; MACAROUN, S.; ALEGRE, M. L.; KEE, B. L.; FERRANDO, A.; MIELE, L.; AIFANTIS, I. Targeting the NF-kappaB signaling pathway in Notch1-induced T-cell leukemia. **Nature Medicine**, v. 13, n. 1, p. 70 - 77, 2007.

VILLUENDAS, R.; PIRIS, M. A.; ALGARA, P.; SÁNCHEZ-BEATO, M.; SÁNCHEZ-VERDE, L.; MARTINEZ, J. C.; ORRADRE, J. L.; GARCÍA, P.; LOPEZ, C.; MARTINEZ, P. The expression of p53 protein in non-Hodgkin's lymphomas is not always dependent on p53 gene mutations. **Blood**, v. 82, n. 10, p. 3151 – 3156, 1993.

VOLPE, E.; SAMBUCCI, M.; BATTISTINI, L.; BORSELLINO, G. Fas-Fas Ligand: Checkpoint of T Cell Functions in Multiple Sclerosis. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 382-392, 2016.

ZARITSKY, A.; WOLDRINGH, C. L. Chromosome replication, cell growth, division and shape: a personal perspective. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p. 756, 2015.

ZHANG, B.; DUAN, D.; GE, C.; YAO, J.; LIU, Y.; LI, X.; FANG, J. Synthesis of xanthohumol analogues and discovery of potent thioredoxin reductase inhibitor as potential anticancer agent. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n.2, p. 1795-1805, 2015.

ZHANG, X.; KONG, Y.; ZHANG, J.; SU, M.; ZHOU, Y.; ZANG, Y.; LI, J.; CHEN, Y.; FANG, Y.; ZHANG, X.; LU, W. Design, synthesis and biological evaluation of colchicine derivatives as novel tubulin and histone deacetylase dual inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 95, p. 127 – 135, 2015.

ZHANG, D.; TANG, B.; XIE, X.; XIAO, Y. F.; YANG, S. M.; ZHANG, J. W. The interplay between DNA repair and autophagy in cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 16, n. 7, p. 1005 - 1013, 2015.

ZHAO, Q.; ASSIMOPOULOU, A. N.; KLAUCK, S. M.; DAMIANAKOS, H.; CHINOU, I.; KRETSCHMER, N.; RIOS, J. L.; PAPAGEORGIOU, V. P.; BAUER, R.; EFFERTH, T. Inhibition of c-MYC with involvement of ERK/JNK/MAPK and AKT pathways as a novel mechanism for shikonin and its derivatives in killing leukemia cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 36, p. 38934 – 38951, 2015.

ZHU, J.; GARRETT, R.; JUNG, Y.; ZHANG, Y.; KIM, N.; WANG, J.; JOE, G. J.; HEXNER, E.; CHOI, Y.; TAICHMAN, R. S.; EMERSON, S. G. Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 109, n. 9, p. 3706 - 3712, 2007.

ZHU, T.; SHEN, S.; LU, Q.; YE, X.; DING, W.; CHEN, R.; XIE, J.; ZHU, W.; XU, J.; JIA, L.; WU, W.; MA, T. Design and synthesis of novel N()-substituted thiosemicarbazones bearing a pyrrole unit as potential anticancer agents. **Oncology Letters**, v. 13, n. 6, p. 4493 – 4500, 2017.

YANG, C.; ZHANG, J.; DING, M.; XU, K.; LI, L.; MAO, L.; ZHENG, J. Ki67 targeted strategies for cancer therapy. **Clinical and Translational Oncology**, v. 20, n. 5, p. 570 – 575, 2018.

YATIM, N.; CULLEN, S.; ALBERT, M. L. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 262 – 275, 2017.

YE, C. L.; QIAN, F.; WEI, D. Z.; LU, Y. H.; LIU, J. W. Induction of apoptosis in K562 human leukemia cells by 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone. **Leukemia Research**, n. 29, p. 887-892, 2005.

YOUNES, A.; ANSELL, S.; FOWLER, N.; WILSON, W.; DE VOS, S.; SEYMOUR, J.; ADVANI, R.; FORERO, A.; MORSCHHAUSER, F.; KERSTEN, M. J.; TOBINAI, K.; ZINZANI, P. L.; ZUCCA, E.; ABRAMSON, J.; VOSE, J. The landscape of new drugs in lymphoma. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 6, p. 335 – 346, 2017.

YU, Y.; KALINOWSKI, D. S.; KOVACEVIC, Z.; SIAFAKAS, A. R.; JANSSON, P. J.; STEFANI, C.; LOVEJOY, D. B.; SHARPE, P. C.; BERNHARDT, P. V.; RICHARDSON, D. R. Thiosemicarbazones from the Old to New: Iron Chelators That Are More Than Just Ribonucleotide Reductase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 17, p. 5271-5294, 2009.

WANG, N.; LI, D. Y.; NIU, H. Y.; ZHANG, Y.; HE, P.; WANG, J. H. 2-hydroxy-3-methylanthraquinone from *Hedyotis diffusa* Willd induces apoptosis in human leukemic U937 cells through modulation of MAPK pathways. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 6, p. 752 – 758, 2013.

WANG, M.; WANG, L. R. Reseach Progress of Ki-67 in Acute Myeloid Leukemia-Review. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**, v. 24, n. 4, p. 1264 – 1268, 2016.

WEISS, L. M.; BINDL, J. M.; PICOZZI, V. J.; LINK, M. P.; WARNKE, R. A. Lymphoblastic lymphoma: na immunophenotype study of 26 cases with comparison to T cell acute lymphoblastic leucemia. **Blood**, v. 67, n. 2, p. 474 – 478, 1986.

WENZEL, E. S.; SINGH, A. T. K. Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer. **In Vivo**, v. 32, n. 1, p. 1 – 5, 2018.

WEST, D. X. et al. Thiosemicarbazone complexes of copper(II): structural and biological studies. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 123, n. 1–2, p. 49 - 71, 1993.

WILDES, T. M.; FARRINGTON, L.; YEUNG, C.; HARRINGTON, A. M.; FOYIL, K. V.; LIU, J.; KREISEL, F.; BARTLETT, N. L.; FENSKE, T. S. Rituximab is associated with improved survival in Burkitt lymphoma: a retrospective analysis from two 127 US academic medical centers. **Therapeutic Advances in Hematology**, v. 5, n. 1, p. 3 - 12, 2014.

WIMAN, K.G.; ZHIVOTOVSKY, B. Understanding cell cycle and cell death regulation provides novel weapons against human diseases. **Journal of Internal Medicine**, v. 281, n. 5, p. 483 - 495, 2017.

WU L. T lineage progenitors: the earliest steps in route to T lymphocytes. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 2, p. 121 – 126, 2006.

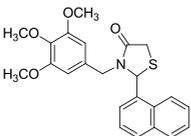
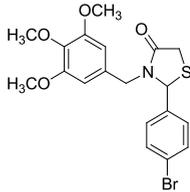
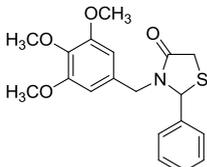
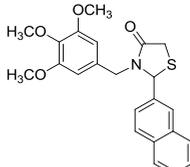


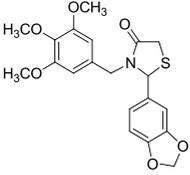
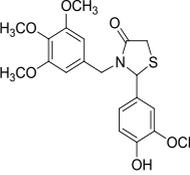
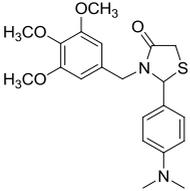
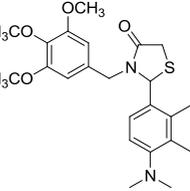
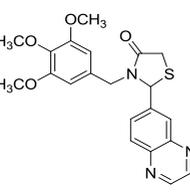
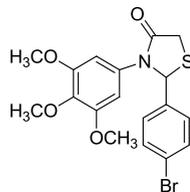
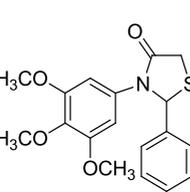
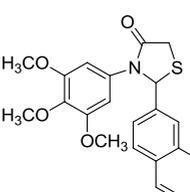
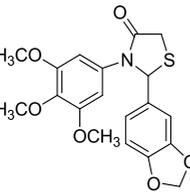
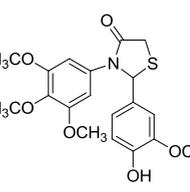
## ANEXO A - Síntese dos compostos sintéticos e isolamento do composto natural

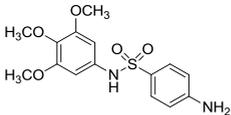
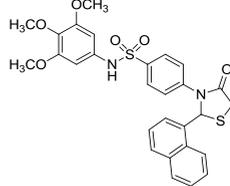
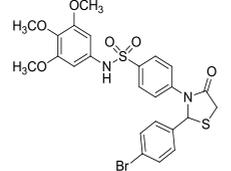
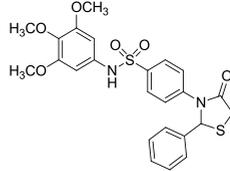
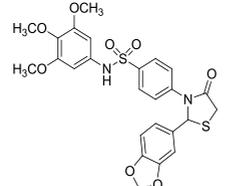
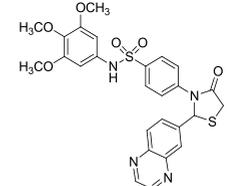
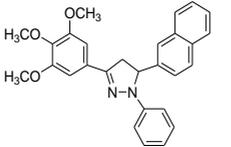
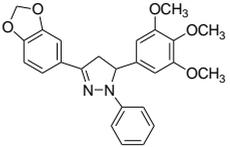
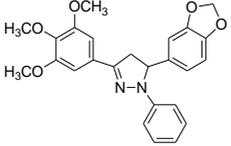
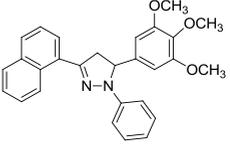
### Síntese dos análogos sintéticos que contêm o grupo 3,4,5-trimetoxifenila em sua estrutura

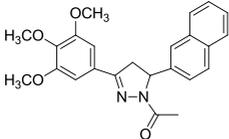
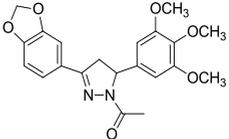
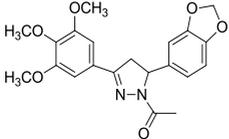
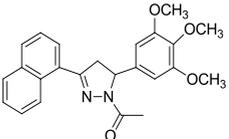
Os análogos sintéticos que contêm o grupo 3,4,5-trimetoxifenila foram sintetizados pela Dra. Patrícia Devantier Neuenfeldt no Laboratório Estrutura e Atividade do Departamento de Química da UFSC, coordenado pelo professor Dr. Ricardo José Nunes. Foram avaliados 28 compostos, os quais foram distribuídos em cinco séries (EtA, EtB, TAS, Ea e Eh). Os substituintes R selecionados para as sínteses foram escolhidos com base nos compostos mais ativos das séries de chalconas derivadas da 3,4,5-trimetoxiacetofenona e das acilhidrazonas derivadas da 3,4,5-trimetoxihidrazida, previamente estudadas e que apresentaram potente atividade frente a células leucêmicas (MAIORAL et al, 2013; SALUM et al, 2013; SALUM et al, 2015; MAIORAL et al, 2016; MAIORAL et al, 2017).

Compostos contendo o esqueleto 3,4,5-trimetoxifenila com diferentes grupamentos R.

<b>Código</b>	<b>Estrutura</b>	<b>Código</b>	<b>Estrutura</b>
<b>EtA01</b>		<b>EtA02</b>	
<b>EtA03</b>		<b>EtA04</b>	

<b>EtA05</b>		<b>EtA06</b>	
<b>EtA07</b>		<b>EtA08</b>	
<b>EtA09</b>		<b>EtB02</b>	
<b>EtB03</b>		<b>EtB04</b>	
<b>EtB05</b>		<b>EtB06</b>	

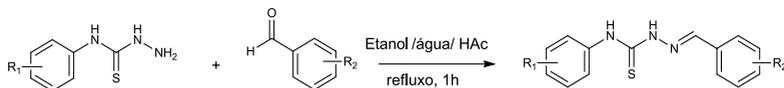
<b>TAS0</b>		<b>TAS1</b>	
<b>TAS2</b>		<b>TAS3</b>	
<b>TAS5</b>		<b>TAS9</b>	
<b>Ea09</b>	 <p>Exact Mass: 438,19</p>	<b>Ea21</b>	 <p>Exact Mass: 432,17</p>
<b>Ea22</b>	 <p>Exact Mass: 432,17</p>	<b>Ea25</b>	 <p>Exact Mass: 438,1943</p>

<p><b>Eh9</b></p>	 <p>Exact Mass: 404,1736</p>	<p><b>Eh21</b></p>	 <p>Exact Mass: 398,1478</p>
<p><b>Eh22</b></p>	 <p>Exact Mass: 398,1478</p>	<p><b>Eh25</b></p>	 <p>Exact Mass: 404,1736</p>

### Síntese dos derivados de tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas são geralmente obtidas pela reação de condensação quimiosseletiva de tiossemicarbazidas com aldeídos e/ou cetonas, e recebem a denominação da classe tiossemicarbazona após o nome do respectivo aldeído ou cetona condensado. Os 38 derivados de tiossemicarbazonas investigadas neste estudo foram sintetizadas de acordo com a metodologia descrita na literatura (DE AQUINO et al, 2008) pelo aluno de iniciação científica Lucas Antônio Pacheco, sob a orientação do professor Dr. Ricardo José Nunes e coorientação da doutoranda Larissa Sens, no Laboratório Estrutura e Atividade do Departamento de Química da UFSC. Resumidamente, foram obtidas tiossemicarbazidas a partir da síntese do respectivo isotiocianato com hidrazina hidratada em álcool isopropílico e adicionou-se água, álcool etílico e diferentes benzaldeídos substituídos ao intermediário previamente sintetizado. Essa reação foi catalisada por ácido acético e refluxada por 1 h. Em seguida, o produto formado foi filtrado a vácuo e, quando se fez necessário, o produto foi recristalizado com etanol.

Representação da síntese das tiossemicarbazonas.

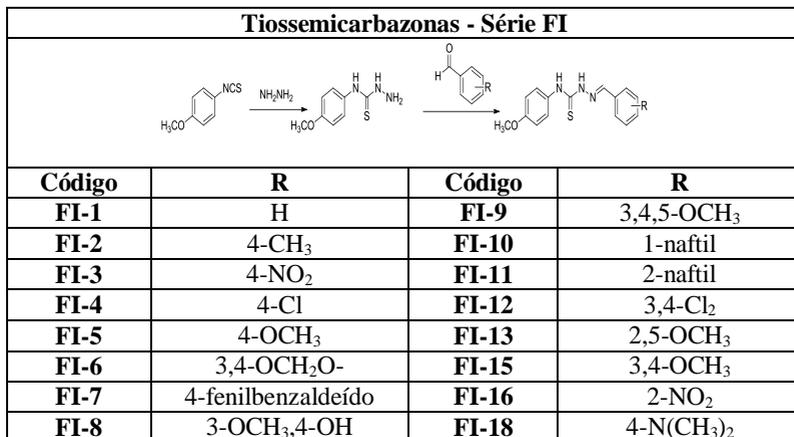


As tiossemicarbazonas foram divididas em três séries (série FI, CMS e VIU) que se diferem devido aos substituintes ligados ao anel aromático próximo ao  $-NH$ .

Estrutura química dos derivados de tiossemicarbazonas incluídos no estudo.

Tiossemicarbazonas - Série CMS			
Código	R	Código	R
CMS-01	H	CMS-09	3,4,5-OCH <sub>3</sub>
CMS-02	4-CH <sub>3</sub>	CMS-10	1-naftil
CMS-03	4-NO <sub>2</sub>	CMS-11	2-naftil
CMS-04	4-Cl	CMS-12	3,4-Cl <sub>2</sub>
CMS-05	4-OCH <sub>3</sub>	CMS-13	2,5-OCH <sub>3</sub>
CMS-06	3,4-OCH <sub>2</sub> O-	CMS-15	3,4-OCH <sub>3</sub>
CMS-07	4-fenilbenzaldeído	CMS-16	2-NO <sub>2</sub>
CMS-08	3-OCH <sub>3</sub> ,4-OH	CMS-18	4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

Tiossemicarbazonas - Série VIU	
Código	R
VIU-05	4-OCH <sub>3</sub>
VIU-06	3,4-OCH <sub>2</sub> O-
VIU-09	3,4,5-OCH <sub>3</sub>
VIU-16	2-NO <sub>2</sub>
VIU-19	4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>



### Isolamento do composto natural (AP1)

O composto natural AP1 foi gentilmente cedido pela doutoranda Ana Cláudia Philippus, orientada pela professora Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC. O AP1 foi isolado do extrato da alga parda *Desmarestia menziesii*, coletada por pesquisadores da expedição do Programa Antártico Brasileiro (ProAntar). A alga seca sob ar frio foi macerada com diclorometano e metanol na proporção de 2:1 e o extrato obtido foi concentrado em rotaevaporador rotatório. O extrato foi fracionado utilizando cromatografia líquida a vácuo (CLV), em que foram utilizados solventes de polaridade crescente. Foram obtidos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e foram feitas cromatografias em camada delgada (CCD) para seleção das frações mais promissoras a fim de dar continuidade ao fracionamento. A fração hexano 6:4 acetato de etila foi novamente separada por CLV, foram feitas novas análises de RMN e CCD e a fração hexano 8:2 acetato de etila foi selecionada para dar continuidade ao fracionamento. Dela foi realizada uma coluna clássica utilizando solventes de polaridade crescente. Foram obtidas 77 frações, reunidas de acordo com a semelhança cromatográfica em 11 frações, das quais foram obtidos espectros de RMN, e a fração 5 foi considerada pura. Dessa, obteve-se os espectros bidimensionais para elucidação estrutural. Por fim, os dados obtidos foram comparados com a literatura e o composto foi identificado como uma plastoquinona, denominada 9-hidroxisarqaquinona.

## ANEXO B - Parecer do CEP SH da UFSC.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

**Pesquisador:** Maria Cláudia Santos da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 80430317.0.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.838.107

## Apresentação do Projeto:

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

## Objetivo da Pesquisa:

## Objetivo Primário:

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

## Objetivo Secundário:

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

Continuação do Parecer: 2.038.107

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

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

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

**Benefícios:**

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

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

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

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria I, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400  
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS  
 Telefone: (48)3721-8294 E-mail: csp.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 2.036/107

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

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados os seguintes documentos obrigatórios:

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

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

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não foram detectadas pendências ou inadequações neste projeto.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
 Balno: Trindade CEP: 88.040-400  
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS  
 Telefone: (48)3721-6254 E-mail: cnp.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 2.036.107

**Considerações Finais a critério do CEP:****Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1004163.pdf	13/08/2018 11:52:19		Aceito
Outros	carta_resposta_agosto.docx	13/08/2018 11:43:45	Mariana Franzoni Maloral	Aceito
Cronograma	cronograma_modificado_agosto.docx	13/08/2018 11:42:56	Mariana Franzoni Maloral	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado_agosto.docx	13/08/2018 11:42:47	Mariana Franzoni Maloral	Aceito
Folha de Rosto	folha.pdf	27/11/2017 15:16:51	Mariana Franzoni Maloral	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_maclau.pdf	06/11/2017 14:46:37	Mariana Franzoni Maloral	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_hu.pdf	06/11/2017 14:45:24	Mariana Franzoni Maloral	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	pesquisa_PB.doc	07/10/2017 14:27:16	Mariana Franzoni Maloral	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Aprovação da CONEP:**

Não

FLORIANÓPOLIS, 22 de Agosto de 2018

Assinado por:  
 Maria Luiza Bazzo  
 (Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400  
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS  
 Telefone: (48)3721-8094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br