



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

NATÁLIA MARCÉLI STEPHANES

**Investigação dos Mecanismos de Morte Celular Envolvidos na
Citotoxicidade dos Compostos 4-Nitrochalcona e
Dietilditiocarbamato de Sódio Trihidratado Sobre Linhagens
Celulares Humanas de Neoplasias Hematológicas**

Florianópolis
2023

NATÁLIA MARCÉLI STEPHANES

**Investigação dos Mecanismos de Morte Celular Envolvidos na
Citotoxicidade dos Compostos 4-Nitrochalcona e
Dietilditiocarbamato de Sódio Trihidratado Sobre Linhagens
Celulares Humanas de Neoplasias Hematológicas**

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^a Dra. Maria Cláudia Santos da Silva

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alfeu Zanotto Filho
Dra. Lorena Santos Bubniak
Prof. Dr. Sharbel Weidner Maluf
Dra. Iris Mattos Santos Pirath (suplente)

Florianópolis
2023

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

Stephanes, Natália Marcéli

Investigação dos mecanismos de morte celular envolvidos na citotoxicidade dos compostos 4-nitrochalcona e dietilditiocarbamato de sódio trihidratado sobre linhagens celulares humanas de neoplasias hematológicas / Natália Marcéli Stephanes ; orientadora, Maria Cláudia Santos Silva, 2023.

113 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Chalconas. 3. Ditiocarbamatos. 4. Neoplasias hematológicas. 5. Citotoxicidade. I. Santos Silva, Maria Cláudia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Natália Marcéli Stephanes

Investigação dos Mecanismos de Morte Celular Envolvidos na Citotoxicidade dos Compostos 4-Nitrochalcona e Dietilditiocarbamato de Sódio Trihidratado Sobre Linhagens Celulares Humanas de Neoplasias Hematológicas

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Alfeu Zanotto Filho, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Sharbel Weidner Maluf, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Lorena Santos Bubniak, Dr^a.
Secretaria de Saúde do Estado de Santa Catarina

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

Prof^a. Dr^a. Thaís Cristine Marques Sincero
Coordenador(a) do Programa

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

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

GRATIDÃO é uma palavra composta por oito simples letras que, juntas, tem um significado tão nobre e grandioso que eu nem consigo definir. Nesse momento de realização de um sonho e fechamento de um ciclo tão importante da minha vida, eu só consigo pensar o quanto eu sou uma pessoa abençoada por Deus e extremamente privilegiada pelas oportunidades que eu tive até hoje e pelas pessoas que cruzaram o meu caminho.

Eu sou imensamente grata a Deus pela vida e por toda a trajetória que me trouxe até esse momento. Não foi fácil, mas ninguém disse que seria. E na verdade, é isso que torna o Doutorado tão gratificante. Agradeço aos meus **amigos e familiares** pelo suporte e apoio emocional, em especial ao meu marido **Lauro** e meu filho **Vicente** que abdicaram de muitos momentos em família para que eu pudesse me dedicar ao Doutorado.

As dificuldades da vida me ensinaram a ser uma pessoa resiliente, e os contratempos dentro do laboratório me mostraram que no LOEH (Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias) somos uma família também, que podemos contar uns com os outros e que duas, três, quatro cabeças pensam muito melhor do que uma só. Conteí com muita ajuda dentro do laboratório, principalmente na reta final do Doutorado, e agradeço muito à todas as pessoas que contribuíram para que essa Tese fosse finalizada. Em especial, agradeço aos meus colegas e amigos **Lisandra, João, Laura e Amanda** que, além de colocarem a “mão na massa” comigo, fizeram os momentos no laboratório serem mais leves e descontraídos.

Agradeço também ao Paulo **Emílio Feuser** e ao **Arthur Poester Cordeiro** pela colaboração com o fornecimento dos compostos e pela disponibilidade de sempre.

Não poderia deixar de agradecer também ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia e a CAPES pelo financiamento e por permitir a realização deste trabalho, bem como aos **membros da banca** pela disponibilidade e pelas contribuições com o Tese.

Por fim, mas não menos importante, eu agradeço à minha mentora e orientadora **Profa. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva**, que me colheu e acreditou no meu potencial desde que eu era aluna de iniciação científica, e que me proporcionou excelentes oportunidades tanto dentro do LOEH como em parcerias com outros laboratórios. Prof, obrigada pelo carinho de sempre e por tantos ensinamentos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, fica o meu muito obrigada!

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo e uma barreira para o aumento da expectativa de vida em todos os países. As neoplasias hematológicas, dentre as quais se destacam as leucemias, os linfomas e o mieloma múltiplo, apresentam alta prevalência na população brasileira e são consideradas um importante problema de saúde pública devido a agressividade, bem como as altas taxas de recidiva e de mortalidade relacionadas a alguns subtipos dessas doenças. A quimioterapia é a estratégia de tratamento mais utilizada no combate às neoplasias hematológicas, entretanto, essa abordagem terapêutica apresenta limitações importantes na sua efetividade em função de características farmacocinéticas relacionadas ao alcance dos fármacos às células alvo, em concentrações adequadas; citotoxicidade não seletiva dos agentes terapêuticos, o que resulta em efeitos adversos que comprometem a qualidade de vida e a segurança dos pacientes; além do desenvolvimento de resistência ao tratamento com fármacos citotóxicos atualmente disponíveis no arsenal terapêutico. Assim, a descoberta de novas moléculas com atividade antitumoral que sejam efetivas e seletivas para as células neoplásicas, bem como a investigação dos seus principais mecanismos de citotoxicidade, é um grande desafio para pesquisadores da área de oncologia experimental. Nessa perspectiva, a 4-nitrochalcona (4NC) e o dietilditiocarbamato de sódio tri-hidratado (DETC) são compostos pertencentes à classe das chalconas e dos ditiocarbamatos, respectivamente, que se apresentam como potenciais protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos, pois são reconhecidos na literatura pela sua atividade antineoplásica. Contudo, esses compostos não foram avaliados sobre células de neoplasias hematológicas e, além disso, seus efeitos sobre células não neoplásicas presentes no microambiente da medula óssea ainda não foram investigados. Considerando o exposto, no presente estudo foi investigada a atividade citotóxica da 4NC e do DETC sobre linhagens celulares de leucemia mieloide aguda (LMA) (K562), linfoma de Burkitt (Daudi), mieloma múltiplo (MM.1S) e estroma de medula óssea (HS-5). Os estudos *in silico* sugerem que ambos os compostos apresentam propriedades físico-químicas adequadas para uma boa biodisponibilidade oral, e apontam propriedades farmacocinéticas que podem ser melhoradas no desenvolvimento de novos fármacos a partir da 4NC e do DETC. Os ensaios de viabilidade celular, realizados pelo método do MTT, indicam que os compostos são citotóxicos para as células K562, Daudi e MM.1S, bem como são seletivos na indução dessas células neoplásicas à morte, e apresentam potencial hemolítico apenas em altas concentrações. Os mecanismos de citotoxicidade da 4NC e do DETC foram investigados sobre as células K562 e Daudi, as quais se mostraram mais sensíveis aos compostos. Os resultados sugerem que os compostos 4NC e o DETC bloqueiam o ciclo das células Daudi e K562 na fase G2/M (com exceção da 4NC sobre células Daudi) e que resultam na produção de espécies reativas de oxigênio EROs em ambas as linhagens celulares. Com relação ao mecanismo de morte celular, a avaliação da morfologia das células K562 e Daudi, bem como a investigação da exposição dos resíduos de fosfatidilserina e da expressão de fatores pró e antiapoptóticos (Bax, Bcl-2, potencial de membrana mitocondrial [$\Delta\Psi_m$], AIF, survivina, caspase-3 ativada e FasR) fornecem evidências da indução de morte celular por apoptose intrínseca e extrínseca após o tratamento das células K562 com a 4NC e com o DETC, e das células Daudi com a 4NC. Já o efeito do DETC sobre as células Daudi parece não envolver a indução da apoptose. Em conclusão, os compostos 4NC e DETC são protótipos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de LMA e linfoma de Burkitt, os quais apresentam seletividade para as células neoplásicas avaliadas no presente estudo; bem como induzem a produção de EROs e levam as células K562 e Daudi à morte celular por apoptose, com exceção do DETC sobre células Daudi.

Palavras-chave: Chalconas. Ditiocarbamatos. Neoplasias hematológicas. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death in the world and a barrier to increasing life expectancy in all countries. Hematological neoplasms, including leukemias, lymphomas and multiple myeloma, have a high prevalence in the Brazilian population and are considered an important public health problem due to their aggressiveness, as well as the high rates of recurrence and mortality related to some subtypes of these diseases. Chemotherapy is the most used treatment strategy against hematological malignancies, however this therapeutic approach has important limitations in its effectiveness due to pharmacokinetic characteristics related to the reach of drugs to target cells in adequate concentrations; non-selective cytotoxicity of therapeutic agents, which results in adverse effects that compromise patients' quality of life and safety; and the development of resistance to treatment with cytotoxic drugs currently available in the therapeutic arsenal. Thus, discovery of new molecules with antitumor activity that are effective and selective for neoplastic cells, as well as investigation of their main cytotoxicity mechanisms, is a great challenge for researchers in the field of experimental oncology. In this perspective, 4-nitrochalcone (4NC) and sodium diethyldithiocarbamate trihydrate (DETC) are compounds belonging to the class of chalcones and dithiocarbamates, respectively, that present themselves as potential prototypes for the development of new drugs, since they are described in literature due to their antineoplastic activity. However, these compounds have not been evaluated on hematological neoplasm cells and their effects on non-neoplastic cells present in the bone marrow microenvironment have not been investigated yet. Considering all the above, present study investigated the cytotoxic activity of 4NC and DETC on cell lines of acute myeloid leukemia (AML) (K562), Burkitt's lymphoma (Daudi), multiple myeloma (MM.1S) and bone marrow stroma (HS -5). *In silico* studies suggest that both compounds have adequate physicochemical properties for good oral bioavailability, and point to pharmacokinetic properties that can be improved in the development of new drugs from 4NC and DETC. Cell viability assays, performed by the MTT method, indicate that compounds are cytotoxic to K562, Daudi and MM.1S cells, as well as being selective in inducing these neoplastic cells to death, and have hemolytic potential only at high concentrations. Cytotoxic mechanisms of 4NC and DETC were investigated on K562 and Daudi cells, which were shown to be more sensitive to the compounds. The results suggest that 4NC and DETC block the cell cycle of Daudi and K562 cells in G2/M phase (except for 4NC on Daudi cells) and result in the production of reactive oxygen species (ROS) in both cell lines. Regarding the mechanism of cell death, evaluation of K562 and Daudi morphology, as well as investigation of phosphatidylserine residue exposure and expression of pro- and anti-apoptotic factors (Bax, Bcl-2, mitochondrial membrane potential [$\Delta\Psi_m$], AIF, survivin, activated caspase-3, and FasR) provide evidence of intrinsic and extrinsic apoptosis after treatment of K562 cells with 4NC and DETC, and Daudi cells with 4NC. The effect of DETC on Daudi cells does not seem involve apoptosis cell death. In conclusion, the 4NC and DETC compounds are promising prototypes for new drugs development for acute myeloid leukemia and Burkitt's lymphoma, which are selective for the neoplastic cells evaluated in the present study; as well as induce the production of ROS and lead K562 and Daudi cells to apoptosis, with the exception of DETC on Daudi cells.

Keywords: Chalcones. Dithiocarbamates. Hematologic neoplasms. Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – As 10 características do câncer (<i>Hallmarks of Cancer</i>).....	25
Figura 2 – Estrutura química da 4NC.....	34
Figura 3 – Estrutura química do DETC.....	35
Figura 4 – Fases do ciclo celular.....	37
Figura 5 – Alterações morfológicas em células apoptóticas.....	41
Figura 6 – Sinalização da apoptose intrínseca e extrínseca.....	43
Figura 7 – Citotoxicidade da 4NC sobre linhagens celulares humanas de neoplasias hematológicas.....	62
Figura 8 – Citotoxicidade do DETC sobre linhagens celulares humanas de neoplasias hematológicas.....	63
Figura 9 – Citotoxicidade dos compostos 4NC e DETC sobre linhagem celular humana de estroma de medula óssea (HS-5).....	66
Figura 10 – Efeito da 4NC e do DETC sobre o ciclo celular das linhagens K562 e Daudi.....	70
Figura 11 – Efeito da 4NC e do DETC sobre a produção de EROs.....	72
Figura 12 – Morfologia das células K562 e Daudi incubadas com 4NC e DETC.....	73
Figura 13 – Efeito da 4NC e do DETC sobre a exposição dos resíduos de fosfatidilserina em células K562 e Daudi.....	74
Figura 14 – Expressão da proteína pró-apoptótica Bax em células K562 e Daudi incubadas com 4NC e DETC.....	75
Figura 15 – Expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 em células K562 e Daudi incubadas com 4NC e DETC.....	76
Figura 16 – Efeito da 4NC e do DETC sobre o $\Delta\Psi_m$ de células K562 e Daudi.....	78
Figura 17 – Expressão da proteína pró-apoptótica AIF em células K562 e Daudi incubadas com 4NC e DETC.....	79
Figura 18 – Expressão da proteína antiapoptótica survivina em células K562 e Daudi incubadas com 4NC e DETC.....	80
Figura 19 – Expressão de caspase- ativada em células K562 e Daudi incubadas com 4NC e DETC.....	81
Figura 20 – Expressão de FasR em células K562 e Daudi incubadas com 4NC e DETC.....	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Anticorpos utilizados na análise de proteínas relacionadas com a apoptose.....	55
Quadro 2 – Predição <i>in silico</i> das características físico-químicas e propriedades farmacocinéticas dos compostos 4NC e DETC.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros estabelecidos por Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge para uma boa biodisponibilidade oral.	57
Tabela 2 – Valores de CI_{50} calculados para 4NC e DETC após 24, 48 e 72 horas de incubação sobre as linhagens MM.1S, K562 e Daudi.	64
Tabela 3 – IS dos compostos 4NC e DETC para as células de neoplasias hematológicas.	67
Tabela 4 – Hemólise induzida por 4NC e DETC em eritrócitos humanos.....	68
Tabela 5 – Razão entre a expressão da proteína Bcl-2 e a proteína Bax em células K562 e Daudi incubadas com os compostos 4NC e DETC.	77

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Taxa de hemólise.....	50
Equação 2 – Índice de seletividade.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\Psi_m$ – Potencial de membrana mitocondrial

4NC – 4-nitrochalcona

ADME – Absorção, distribuição, metabolismo e excreção

AIF – Fator indutor de apoptose (do inglês, *apoptosis inducing factor*)

Apaf-1 – Fator ativador de protease apoptótica 1 (do inglês, *apoptotic peptidase activating factor 1*)

Bax – *Bcl-2-associated X protein*

Bcl-2 – *B-cell lymphoma protein-2*

BCSH – *British Committee for Standards in Haematology*

BE – Brometo de etídio

BHE – Barreira hematoencefálica

BSA – Albumina sérica bovina (do inglês, *bovine serum albumin*)

Caspases – *Cysteine-dependent aspartate-specific proteases*

CD38 – *Cluster of differentiation 38*

CDKs – Cinases dependentes de ciclinas (do inglês, *cyclin dependent kinases*)

CKI – Inibidores de CDK (do inglês, *cyclin-dependent kinase inhibitors*)

CEPSH – Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos

CI₅₀ – Concentração inibitória 50%

CNMC – Comitê de Nomenclatura em Morte Celular

CO₂ – Dióxido de carbono

CYP – Citocromo P450 (do inglês, *cytochrome P450*)

D_{cn} – Densidade óptica do controle negativo

D_{cp} – Densidade óptica do controle positivo

DD – Domínio de morte (do inglês, *death domain*)

DED – Domínio efetor de morte (do inglês, *death effect domain*)

DETC – Dietilditiocarbamato sódico tri-hidratado

DIABLO – Proteína de ligação direta a IAP com baixo ponto isoelétrico (do inglês, *direct IAP binding protein with low PI*)

DL₅₀ – Dose letal 50%

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)

DR-3 – Receptor de morte 3 (do inglês, *death receptor 3*)

DR-6 – Receptor de morte 6 (do inglês, *death receptor 6*)

DRP1 – *Dynamin-1-like protein*

Dt – Densidade óptica da amostra teste

EC₅₀ – Concentração efetiva 50% (do inglês, *50% effective concentration*)

EDTA – Ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*)

EPM – Erro padrão da média

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FAAD – *Fas-associated protein with death domain*

FasR – Receptor Fas (do inglês, *Fas receptor*)

FITC – Fluoresceína (do inglês *fluorescein isothiocyanate*)

HEPES – Ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]

HIV – vírus da imunodeficiência humana (do inglês, *human immunodeficiency virus*)

INCA – Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva

IAP – Proteínas inibidoras de apoptose (do inglês, *inhibitors of apoptosis proteins*)

IS – Índice de seletividade

LA – Laranja de acridina

LCPP – Laboratório de Controle e Processos de Polimerização

LMA – Leucemia mieloide aguda

Log P o/a – Coeficiente de partição óleo/água

LPA – Leucemia promielocítica aguda

MLKL – *Mixed lineage kinase domain like pseudokinase*

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

NCCN[®] – National Comprehensive Cancer Network[®]

OMS – Organização Mundial da Saúde

PARP – Poly-ADP-Ribose Polimerase

PBS – Solução de tampão fosfato (do inglês, *phosphate buffered saline*)

P-gp – glicoproteína P (do inglês, *P-glycoprotein*)

PI – Iodeto de propídio (do inglês, *propidium iodide*)

RIPK1 – *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*

RIPK3 – *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3*

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute 1640*

SIB – *Swiss Institute of Bioinformatics*

Smac – Segundo ativador de caspases derivado das mitocôndrias (do inglês, *second mitochondria derived activator of caspases*)

SNC – Sistema nervoso central

SP – Sangue periférico

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

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNFR – Receptor do fator de necrose tumoral (do inglês, *tumor necrosis factor receptor*)

TPSA – Área de superfície polar topológica (do inglês, *topological polar surface area*)

TRADD – *TNFR1-associated death domain protein*

TRAIL-R – Receptor do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (do inglês, *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor*)

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	NEOPLASIAS MALIGNAS	25
2.2	LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA)	26
2.3	NEOPLASIA DE CÉLULAS LINFOIDES B MADURAS	29
2.4	NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS	33
2.5	4-NITROCHALCONA (4NC)	33
2.6	DIETILDITIOCARBAMATO DE SÓDIO TRIHIDRATADO (DETC)	34
2.7	REGULAÇÃO DA MORTE CELULAR E POSSÍVEIS ALVOS TERAPÊUTICOS ...	36
2.8	MODULAÇÃO E BLOQUEIO DO CICLO CELULAR	37
2.9	MORTE CELULAR	39
3	OBJETIVOS	45
3.1	OBJETIVO GERAL	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	ORIGEM DOS COMPOSTOS INVESTIGADOS	47
4.2	PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i> DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS	47
4.3	CULTIVO CELULAR	47
4.4	CURVAS DE CONCENTRAÇÃO E TEMPO-RESPOSTA E DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	48
4.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE ERITRÓCITOS HUMANOS	49
4.6	ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)	50
4.7	ANÁLISE DO CICLO CELULAR	51
4.8	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EROS	52
4.9	INVESTIGAÇÃO DA APOPTOSE	52
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FARMACOCINÉTICAS DOS COMPOSTOS 4NC E DETC	57
5.2	CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS 4NC E DETC SOBRE LINHAGENS CELULARES DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS	62

5.3	SELETIVIDADE DA 4NC E DO DETC PARA AS LINHAGENS CELULARES DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS	66
5.4	POTENCIAL HEMOLÍTICO DA 4NC E DO DETC	68
5.5	EFEITO DA 4NC E DO DETC SOBRE O CICLO CELULAR DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS.....	70
5.6	MECANISMO DE MORTE CELULAR INDUZIDO PELA 4NC E PELO DETC	72
6	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
7	PERSPECTIVAS	88
8	REFERÊNCIAS	89
	ANEXO 1 – PARECER DO CEP SH DA UFSC.....	103
	ANEXO 2 – PRODUÇÕES CIENTÍFICAS.	107

1 INTRODUÇÃO

O termo “câncer” compreende um grupo heterogêneo de neoplasias malignas que podem se originar em diversos tecidos e órgãos, as quais apresentam como principais características, a presença de células em graus variáveis de diferenciação, proliferação celular exacerbada e a capacidade de invadir tecidos adjacentes ou órgãos distantes (NCI, 2021; WHO, 2022). Trata-se de um problema de saúde pública mundial, o qual é uma das principais causas de morte e uma barreira para o aumento da expectativa de vida em todos os países do mundo (COSTA et al., 2022; SUNG et al., 2021).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2020 ocorreram aproximadamente 19,3 milhões de casos incidentes de câncer e quase 10,0 milhões de mortes devido a essa doença. A incidência e a mortalidade por câncer estão crescendo rapidamente no mundo todo, o que reflete o envelhecimento e o crescimento populacional, provocando mudanças na prevalência e na distribuição dos principais fatores de risco para o câncer; muitos dos quais estão associados ao desenvolvimento socioeconômico. Uma estimativa da OMS para o ano de 2040, aponta a ocorrência de 28,4 milhões de casos de câncer no mundo, com um aumento do número de casos de aproximadamente de 64% a 95% nos países em desenvolvimento (SUNG et al., 2021; WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020).

No Brasil, a estimativa do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) aponta a incidência de 704 mil casos de câncer para cada ano do triênio 2023-2025. Dentre os tipos de câncer mais frequentes no Brasil encontram-se as neoplasias hematológicas, as quais são originadas na medula óssea ou sistema linfático, e estão relacionadas com uma desregulação da hematopoiese normal (SWERDLOW et al., 2017). Os linfomas e as leucemias são integrantes desse grupo de neoplasias malignas que apresentam uma alta prevalência na população brasileira (SANTOS et al., 2023). Embora as taxas de cura sejam excelentes para alguns subtipos de leucemia e linfoma infantil, de forma geral, essas doenças apresentam um prognóstico mais desfavorável conforme o avanço da idade, com maiores taxas de recidiva e menor sobrevida (CREUTZIG et al., 2018; MALARD; MOHTY, 2020; MUKHTAR et al., 2017; NCI, 2023).

O mieloma múltiplo também se destaca nesse grupo de doenças malignas por ser a terceira neoplasia hematológica mais comum no mundo, com uma incidência de cerca de 176 mil novos casos e 117 mil mortes no ano de 2020, o que representa cerca de 1,8% do total de neoplasias malignas nesse ano (GLOBOCAN, 2020). Apesar da ausência de dados

epidemiológicos oficiais a respeito do mieloma múltiplo por órgãos nacionais, acredita-se que, no ano de 2020, essa neoplasia tenha sido responsável por 3.407 óbitos no Brasil (INCA, 2023). Tendo em vista que se trata de uma doença ainda sem cura, a recidiva em pacientes com mieloma múltiplo é frequente. Poucos pacientes atingem uma resposta terapêutica sustentada, e a sobrevida global é baixa (média de aproximadamente três anos) (ACS, 2023; KUMAR et al., 2017).

Considerando o impacto populacional dos dados epidemiológicos supracitados, e levando em conta fatores que influenciam na adesão às terapias, qualidade de vida, taxas de resposta ao tratamento e sobrevida global desses grupos de pacientes (como o alto custo dos fármacos, em especial dos imunoterápicos; resistência aos tratamentos; e citotoxicidade não seletiva da grande maioria das terapias atualmente disponíveis), é evidente a necessidade da busca por moléculas bioativas com alta acessibilidade sintética que sejam eficientes em induzir essas células neoplásicas à morte, com pouca ou nenhuma citotoxicidade para células não neoplásicas, que possam servir como protótipo para o desenvolvimento de fármacos seguros e mais seletivos para as neoplasias hematológicas em questão.

Nessa perspectiva, a 4-nitrochalcona (4NC) e o dietilditiocarbamato de sódio trihidratado (DETC) são produtos comerciais (reagentes químicos) que se apresentam como moléculas bioativas de interesse na área da química medicinal, as quais já são conhecidas na literatura por suas atividades biológicas, incluindo antitumoral (CORDEIRO et al., 2021; MAY et al., 2020; SANTOS et al., 2020). No entanto, não foram identificados estudos prévios avaliando o efeito da 4NC e do DETC sobre neoplasias hematológicas e, da mesma forma, não há dados na literatura a respeito da citotoxicidade, ou não, desses compostos para as células não neoplásicas presentes no microambiente da medula óssea.

Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da 4NC e do DETC sobre linhagens celulares de neoplasias hematológicas, bem como identificar os possíveis mecanismos de morte celular envolvido na citotoxicidade desses compostos, e investigar se a 4NC e o DETC apresentam citotoxicidade significativa sobre células não neoplásicas de estroma de medula óssea. Espera-se que as informações obtidas a partir deste trabalho possam aprofundar o conhecimento científico sobre os compostos em questão, e que a 4NC e o DETC possam servir como protótipo para o desenvolvimento de fármacos eficazes, seguros e seletivos para essas doenças, e que futuramente possa refletir em melhores taxas de resposta, qualidade de vida e sobrevida global para os pacientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NEOPLASIAS MALIGNAS

As neoplasias malignas, referidas coletivamente como câncer, são formadas por células com graus variáveis de diferenciação, que apresentam crescimento rápido e desordenado, bem como capacidade de invadir tecidos adjacentes. Independente de suas classificações, todas as neoplasias são constituídas por células neoplásicas clonais, que compõem o seu parênquima e definem a natureza da neoplasia, e pelo estroma, que é composto de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e quantidade variável de células do sistema imune, o qual fornece sustentação e suprimento sanguíneo adequado para o crescimento e evolução tumoral (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2018a; NCI, 2021; WHO, 2023).

Sabe-se que as alterações metabólicas relacionadas à tumorigênese proporcionam às células neoplásicas uma grande capacidade adaptativa, o que favorece a formação de um microambiente tumoral propício para o seu desenvolvimento. Nessa perspectiva, Hanahan e Weinberg (2000) descreveram um conjunto de seis capacidades funcionais adquiridas pelas células humanas à medida que sofrem um processo de transformação neoplásica, que determinariam o fenótipo maligno do tumor. Essas características foram chamadas de “*Hallmarks of Cancer*” que, atualmente, é composto por oito capacidades funcionais e duas características habilitantes, totalizando 10 “*Hallmarks of Cancer*” (HANAHAN, 2022) (Figura 1).

Figura 1 – As 10 características do câncer (*Hallmarks of Cancer*).



As 10 características do câncer, compostas por oito capacidades funcionais e duas características habilitantes. São consideradas capacidades funcionais: estímulo sustentado à proliferação; evasão de processos inibitórios; escape do sistema imunológico; imortalidade replicativa; ativação de invasão e metástase; indução da angiogênese; resistência à morte celular e reprogramação metabólica. As características habilitantes são: promoção da inflamação e instabilidade genômica. Fonte: Adaptado de Hanahan (2022).

Contudo, o conhecimento acerca dos mecanismos envolvidos nas neoplasias malignas progrediu com o tempo e, mais recentemente, Hanahan (2022) propôs novas características funcionais e habilitantes que podem, futuramente, ser incorporadas como componentes do “*Hallmarks of Cancer*”. São elas: desbloqueio da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos e senescência celular.

Com relação aos tipos de câncer, estes são genericamente subdivididos em tumores sólidos e neoplasias hematológicas, de acordo com o tecido de origem e a caracterização das doenças. Os tumores sólidos são representados pela formação de massas celulares neoplásicas em tecidos previamente íntegros. Já as neoplasias hematológicas, foco do presente trabalho, são originadas na medula óssea e/ou nos tecidos linfoides, e compreendem o resultado de uma desregulação da hematopoiese normal ou do desenvolvimento das células linfoides nos tecidos linfoides primários e secundários (NCI, 2021; SWERDLOW et al., 2017; WHO, 2023).

2.2 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA)

As leucemias constituem um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas caracterizadas pela proliferação clonal de células hematopoiéticas neoplásicas na medula óssea e/ou nos tecidos linfoides, as quais podem atingir a circulação periférica e infiltrar-se em outros tecidos e órgãos. A proliferação acelerada, e a consequente infiltração dessas células no ambiente medular resultam na perturbação da hematopoiese normal e inibição da produção de células não neoplásicas como leucócitos, eritrócitos e plaquetas (KUEHL, 2017; NCI, 2023; SWERDLOW et al., 2017; ROSE-INMAN).

O processo de transformação leucêmica pode ocorrer em diversos estágios de diferenciação das células comprometidas com a linhagem mieloide, linfoide ou ainda, em células progenitoras que expressam antígenos associados a mais de uma linhagem celular. Assim, as leucemias são classificadas como crônicas, quando os precursores acometidos mantêm a capacidade de maturação; ou agudas, quando há um bloqueio na diferenciação hematopoiética normal e a proliferação clonal de células progenitoras (ALEXANDER; ORGEL, 2021; HARRIS et al., 2019; NCI, 2023; SWERDLOW et al., 2017).

Nesse contexto, as leucemias mieloides agudas, um dos focos do presente trabalho, correspondem a um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas caracterizadas pela expansão clonal de células progenitoras neoplásicas mieloides (blastos leucêmicos), cujo diagnóstico é realizado de acordo com as características morfológicas, imunofenotípicas, citoquímicas e genéticas das células acometidas (NEWELL; COOK; 2021; PELCOVITS; NIROULA, 2020; SWERDLOW et al., 2017), as quais são subclassificadas atualmente conforme descrito por Khoury et al., 2022.

A LMA é a leucemia aguda mais frequente em pacientes adultos e a sua incidência aumenta com a idade, sendo mais expressiva em indivíduos acima de 65 anos. Estudos apontam uma taxa de sobrevida de cinco anos em apenas 25% dos casos, e que pacientes idosos apresentam um prognóstico ainda pior em função da alta incidência de anormalidades genéticas desfavoráveis. Além disso, nas últimas décadas, houve um aumento constante do número de casos de neoplasias mieloides associadas à terapia, a qual pode ocorrer em indivíduos que foram expostos à quimioterapia ou radioterapia de longo prazo anteriormente. As estimativas americanas apontam que esse grupo populacional apresenta um risco 4,7 vezes maior de desenvolver LMA do que a população em geral. Assim, em uma perspectiva biológica, pacientes idosos com LMA relacionada a terapias prévias representam um grande desafio clínico, tendo em vista os diversos fatores intrínsecos favoráveis ao desenvolvimento de resistência às terapias convencionais (MONTESINOS et al., 2019; MUKHEJEE; SEKERES, 2019; SYKES et al., 2015). Na população pediátrica, essa é uma condição clínica relativamente rara e com prognóstico desfavorável, aproximadamente um terço das crianças portadoras dessa doença sofrem recidiva após o tratamento inicial (APLENC et al., 2020; BRISSOT; MOTY, 2015; ELGARTEN; RUBNITZ, 2008; RUBNITZ; KASPERS, 2021).

De forma geral, o tratamento padrão das leucemias mieloides agudas com fármacos citotóxicos ainda segue o esquema proposto pelo *British Committee for Standards in Haematology* (BCSH) há mais de 40 anos, que inclui uma terapia de indução inicial, a qual geralmente consiste em combinações de citarabina com uma antraciclina, seguida de uma terapia de consolidação adaptada de acordo com o prognóstico de cada paciente, a fim de erradicar qualquer doença residual e alcançar uma remissão duradoura (ABDUL-HAY, 2016; BOSE; GRANT, 2015; CONITEC, 2014; KOUCHKOVSKY; MUKHEJEE; SEKERES, 2019; SHERIF et al., 2021).

O avanço na compreensão da base molecular da LMA deu início a uma era de terapias direcionadas (terapias alvo), as quais apresentaram resultados promissores em ensaios clínicos nos últimos anos, contudo, uma quantidade considerável de pacientes ainda desenvolve falha de indução ou recaída após atingir a remissão completa, mesmo após um regime terapêutico moderno (MONTESINOS et al., 2019; MUKHEJEE; SEKERES, 2019). Estudos recentes apontam que, na progressão da doença, fatores como evolução clonal, perda ou recorrência de genes e surgimento frequente de subclones funcionalmente heterogêneos podem afetar a eficácia dos agentes direcionados. Dessa forma, terapias direcionadas combinadas com regimes intensivos de quimioterapia podem ser opções viáveis para terapia de resgate e como pontes para transplante halogênico para pacientes recidivantes/refratários (MA; GE, 2021; MONTESINOS et al., 2019).

Embora a quimioterapia seja amplamente utilizada no tratamento da LMA, essa estratégia terapêutica ainda apresenta graves limitações na sua efetividade. Essa modalidade de tratamento, sozinha ou associada a terapias alvo, tende a ser bastante agressiva, pois tem como objetivo induzir a remissão completa da doença. Considerando que os agentes quimioterápicos utilizados para alcançar esse objetivo não são específicos para células neoplásicas, a remissão, quando alcançada, se dá às custas de uma toxicidade expressiva (BRISSOT; MOHTY, 2015; DOVAL et al., 2020; ELMAN; SILVA, 2007; ELSHOURY et al., 2019; KRUG et al., 2011; PETERS; BROWN, 2015; SHERIF et al., 2021). Nessa perspectiva, a qualidade de vida do paciente durante o tratamento fica comprometida, pois o mesmo fica suscetível a infecções devido à imunossupressão induzida pela quimioterapia, além de sofrer outros efeitos adversos que variam de acordo com o tipo de quimioterápico, a dose administrada e a duração dessa modalidade de tratamento. Apesar da agressividade e de algumas combinações de tratamentos, os pacientes que recidivam, principalmente aqueles acima de 60 anos de idade, dificilmente conseguem atingir a cura ou até mesmo uma remissão prolongada (ACS, 2023; AGARWAL et al., 2021; ELMAN; SILVA, 2007; ELSHOURY et al., 2019; FENG et al., 2020; KRUG et al., 2011; PETERS; BROWN, 2015). Assim, o transplante de medula óssea com células tronco hematopoiéticas ainda se apresenta como o tratamento mais efetivo para leucemias mieloides agudas, porém não é indicado para todos os pacientes e, além disso, complicações relacionadas a esse procedimento ainda são frequentes (BRISSOT; MOHTY, 2015, MOSNA; CAPELLI; GOTTARDI, 2017).

2.3 NEOPLASIA DE CÉLULAS LINFOIDES B MADURAS

As neoplasias de células linfoides maduras compreendem um grupo heterogêneo de neoplasias malignas que normalmente se desenvolvem nos linfonodos, porém podem ocorrer em outros tecidos, denominados de sítios extranodais (SWERDLOW et al., 2017).

Entre os vários subtipos de neoplasias de células linfoides B maduras, neste trabalho será abordado o linfoma de Burkitt e o mieloma múltiplo. Essa escolha se justifica, principalmente, pela a agressividade e altas taxas de mortalidade relacionadas a essas doenças.

2.3.1 Linfoma de Burkitt

O desenvolvimento do linfoma de Burkitt ocorre a partir da transformação neoplásica de células B quando essas já migraram da medula óssea e estão em processo de diferenciação no centro germinativo dos gânglios linfáticos (CROMBIE; LACASCE, 2021; SWERDLOW et al., 2017). A ocorrência de translocações específicas envolvendo o gene MYC e a consequente superexpressão da proteína MYC, bem como a rápida proliferação celular clonal e altas taxas de apoptose, são características marcantes dessa doença (CROMBIE; LACASCE, 2021; KALISZ et al., 2019).

Historicamente são reconhecidas três variantes clínicas do linfoma de Burkitt pela OMS, as quais são classificadas como endêmica, esporádica e doença associada à imunodeficiência. O subtipo endêmico ocorre majoritariamente na África e representa a malignidade pediátrica mais prevalente na África Subsaariana, com predominância masculina e mediana de idade de 6 anos (GOPAL; GROSS, 2018; SWERDLOW et al., 2017). Essa variante é restrita a regiões geográficas holoendêmicas para malária causada por *Plasmodium falciparum*, e está universalmente associada ao vírus Epstein-Barr. Dessa forma, a literatura sugere que a etiologia do linfoma de Burkitt endêmico está relacionada à co-infecção por esses dois agentes biológicos. A manifestação clínica mais frequente é o acometimento maxilar e dos demais ossos da face, contudo outros sítios extranodais como trato gastrointestinal, adrenais, rins e gônadas também podem ser acometidos (CROMBIE; LACASCE, 2021; MOLYNEUX e al., 2012). A segunda variante, esporádica, apresenta uma distribuição mundial e, assim como o linfoma de Burkitt endêmico, é mais frequente no sexo masculino, com uma proporção de 2:1 em relação ao feminino. Porém, diferente da variante endêmica, neste caso, a associação com o vírus Epstein-Barr é menos frequente. As manifestações clínicas geralmente envolvem locais extranodais, particularmente o sistema nervoso central (SNC), trato gastrointestinal e medula óssea (SATO et al., 2015; TERAS et al., 2016; ZAYAC; OLSZEWSKI, 2020). Já o terceiro

subtipo de linfoma de Burkitt ocorre em um contexto de imunodeficiência, o qual está relacionado, principalmente, à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*). Essa variante geralmente apresenta envolvimento nodal, mas podem estar envolvidos locais adicionais como a medula óssea e o SNC (CROMBIE; LACASCE, 2021; GASTWIRT; ROSCHEWSKI, 2018; OLSZEWSKI; FALLAH; CASTILLO, 2016).

Atualmente, a OMS considera evidências de que o linfoma de Burkitt positivo para o vírus Epstein-Barr e o linfoma de Burkitt negativo para o vírus Epstein-Barr formam discretos grupos com base em suas características moleculares, independentemente do contexto epidemiológico e localização geográfica e, portanto, podem substituir a subtipagem epidemiológica descrita acima (ALAGGIO et al., 2022). Contudo, independente do subtipo, o linfoma de Burkitt se apresenta como uma doença rapidamente progressiva. Dessa forma, o diagnóstico precoce e o início imediato do tratamento são determinantes para o sucesso terapêutico (DUNLEAVY; LITTLE; WILSON, 2016).

Devido à raridade dessa doença e à escassez de ensaios clínicos randomizados na literatura, não há um consenso entre os especialistas em relação ao esquema de tratamento ideal. Tendo em vista que o linfoma de Burkitt é mais comum em crianças, muitas abordagens atualmente usadas em adultos foram originalmente desenvolvidas para populações pediátricas. Tais estratégias terapêuticas geralmente incluem regimes de curta duração, com a administração de altas doses de agentes quimioterápicos combinados, em ciclos alternados, incluindo fármacos como etoposido, prednisona, ciclofosfamida, vincristina, doxorrubicina, dexametasona, ifosfamida, metotrexato, citarabina e rituximabe. A escolha dos agentes quimioterápicos varia de acordo com as características fenotípicas e histológicas das células neoplásicas, bem como aspectos clínicos do indivíduo acometido (CROMBIE; LACASCE, 2021; DUNLEAVY; LITTLE; WILSON, 2016).

Independentemente do regime de tratamento, a síndrome de lise tumoral é uma complicação potencial da terapia, a qual é originada a partir da liberação de produtos celulares que sobrecarregam a capacidade excretora dos rins e levam a desequilíbrios eletrolíticos, incluindo hipercalemia, hiperfosfatemia, hiperuricemia, podendo chegar à insuficiência renal. Assim, a profilaxia e o tratamento dessa síndrome incluem hidratação intravenosa, uso de agentes hipouricêmicos como alopurinol e rasburicase e, quando indicado, diálise. Além disso, os potenciais efeitos adversos relacionados ao uso de agentes quimioterápicos específicos, em

combinação ou não com outros fármacos, pode comprometer a qualidade de vida dos pacientes, como, por exemplo, a pneumonite associada ao uso de metotrexato, a cistite hemorrágica relacionada à ciclofosfamida, e a colite neutropênica, a qual pode se manifestar após o tratamento com qualquer agente citotóxico não seletivo que induza uma neutropenia grave. Por fim, embora o linfoma de Burkitt seja considerado altamente tratável, com altas taxas de cura nos estágios iniciais e bem tolerada por pacientes pediátricos e adultos jovens, um dos maiores desafios do tratamento dessa doença é a mortalidade relacionada à toxicidade da quimioterapia agressiva para indivíduos adultos mais velhos e/ou imunossuprimidos (CROMBIE; LACASCE, 2021; KALISZ et al., 2019).

2.3.2 Mieloma múltiplo

O mieloma múltiplo é uma neoplasia de células linfoides B maduras caracterizada pela expansão clonal de células plasmocitárias malignas que infiltram a medula óssea. De forma geral, o desenvolvimento dessa neoplasia hematológica é um processo lento, o qual se inicia a partir da aquisição de hiperdiploidia ou de uma translocação envolvendo o locus do gene da cadeia pesada da imunoglobulina. A instabilidade genética resultante desses eventos iniciais dá origem a uma condição assintomática denominada gamopatia monoclonal de significado indeterminado, a qual pode evoluir para mieloma múltiplo latente que, após diversos eventos genéticos adquiridos, como translocações secundárias e mutações somáticas, seguido da proliferação exacerbada dos plasmócitos clonais malignos resistentes à apoptose, chega ao estágio de mieloma múltiplo (KUMAR et al., 2017a; SWERDLOW et al., 2017; VAN DE DONK; PAWLYN; YONG, 2021).

Os plasmócitos malignos geralmente produzem uma imunoglobulina monoclonal em excesso, denominada de proteína M, que apresenta tendência a precipitar e formar depósitos amiloides que lesam os tecidos. Assim, apesar de alguns pacientes serem assintomáticos, a maioria dos indivíduos acometidos por essa doença apresentam sinais e sintomas relacionados a lesões de órgãos alvo, como dor óssea, fraturas, infecções, anemias, insuficiência renal e hiperviscosidade sanguínea. A idade média dos pacientes no momento do diagnóstico é 70 anos e os dados epidemiológicos apontam maior incidência de mieloma múltiplo em países desenvolvidos. Sabe-se que os fatores de risco para essa doença incluem obesidade, inflamação crônica e exposição a pesticidas, solventes orgânicos ou radiação, contudo variantes genéticas hereditárias também contribuem para o desenvolvimento de mieloma múltiplo (VAN DE DONK; PAWLYN; YONG, 2021).

As indicações terapêuticas para essa neoplasia hematológica são baseadas na presença de lesões de órgãos alvo ou pelo menos um biomarcador de malignidade. Desta forma, é necessário a realização de uma investigação diagnóstica detalhada, usando critérios clínicos, bioquímicos, imunofenotípicos, citogenéticos e radiológicos, a fim de diferenciar o mieloma múltiplo das condições precursoras assintomáticas. Os tratamentos disponíveis para o mieloma múltiplo são baseados na terapia farmacológica e no transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas. Assim, a determinação da estratégia terapêutica a ser utilizada deve considerar fatores importantes como idade do paciente, comorbidades e elegibilidade para o transplante de células-tronco hematopoiéticas, o qual geralmente é recomendado apenas para indivíduos com idade inferior a 65 anos (KUMAR et al., 2017; SWERDLOW et al., 2017; VAN DE DONK; PAWLYN; YONG, 2021). Em relação à terapia farmacológica, inibidores de proteassoma e os imunomoduladores são a base atual da terapia do mieloma múltiplo e, em ensaios clínicos, geralmente são o padrão de tratamento ao qual os medicamentos mais novos são adicionados. Porém, outras classes de medicamentos também se apresentam como alternativas de tratamento, como agentes alquilantes, antraciclinas, inibidores de histona deacetilase e inibidores de exportação nuclear. Além desses, os esteroides, na forma de dexametasona ou prednisolona, são invariavelmente incluídos nos esquemas terapêuticos e, uma outra classe de fármacos que está se tornando um componente-chave das terapias de recaída e de primeira linha são os anticorpos direcionados ao CD38 (do inglês, *cluster of differentiation 38*), devido a sua superexpressão nas células plasmocitárias (VAN DE DONK; PAWLYN; YONG, 2021). De acordo com a Diretriz atualizada da *National Comprehensive Cancer Network*[®] (NCCN[®]), é recomendado que o tratamento padrão seja baseado em um regime triplo, incluindo dois fármacos de classes diferentes associados a um esteroide. Contudo, alterações em relação às combinações farmacoterapêuticas e suas respectivas doses podem ser necessárias, de acordo com a idade do paciente, *performance status*, classes terapêuticas usadas previamente e a necessidade de tratamento de suporte (CALLANDER et al., 2022).

Nas últimas décadas, o progresso em relação a compreensão da biologia da doença, bem como a inclusão de novos fármacos ao arsenal terapêutico e as abordagens de tratamento individualizados, levaram a respostas clínicas mais profundas e duradouras. Contudo, o mieloma múltiplo continua sendo uma doença incurável e, mesmo diante de regimes terapêuticos mais efetivos, apresenta altas taxas de recidiva e de mortalidade, com uma sobrevida global média de aproximadamente três anos. O transplante de células-tronco hematopoiéticas não é uma opção para todos os pacientes e muitos indivíduos não têm acesso

a um tratamento de ponta. Além disso, os efeitos adversos relacionados ao tratamento e, principalmente, a quimiorresistência, são desafios importantes no tratamento dessa doença (KUMAR et al., 2017; MCCARTHY et al., 2017; VAN DE DONK; PAWLYN; YONG, 2021).

2.4 NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS

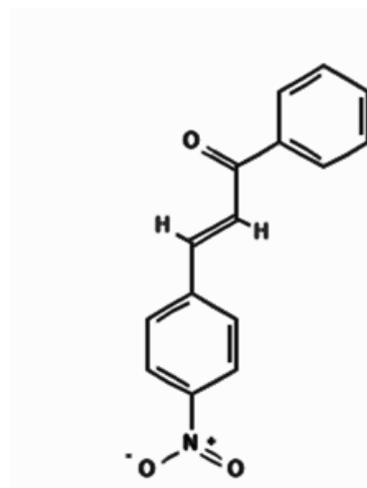
Considerando as informações expostas acima, identifica-se três principais fatores que são limitantes para o sucesso terapêutico das neoplasias malignas abordadas neste estudo e justificam a busca por novas alternativas de tratamento, entre eles: as características farmacocinéticas relacionadas ao alcance dos fármacos às células alvo, em concentrações adequadas; a citotoxicidade não seletiva dos agentes terapêuticos, que resulta em efeitos adversos que comprometem a qualidade de vida e a segurança dos pacientes; e o desenvolvimento de resistência ao tratamento com fármacos citotóxicos atualmente disponíveis no arsenal terapêutico. Assim, o presente trabalho apresenta a investigação do efeito citotóxico e mecanismos de ação dos compostos 4NC e DETC para serem utilizados como possíveis protótipos para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas.

2.5 4-NITROCHALCONA (4NC)

As chalconas são flavonoides de cadeia aberta compostos por dois anéis aromáticos unidos por três carbonos, uma carbonila e dois carbonos α -, β -insaturados. Essas estruturas químicas são consideradas como ponto de partida promissores para o desenvolvimento de novos fármacos (DAS; MANNA, 2016; GOMES et al., 2017; MAHAPATRA; BHARTI; ASATI, 2015). Essa classe de compostos apresenta uma grande variedade de atividades biológicas conhecidas, destacando-se a atividade antineoplásica (*in vitro*), a qual já foi relatada sobre células provenientes de diferentes neoplasias malignas, como câncer de mama (BONAKDAR et al., 2017), câncer de pulmão, câncer colorretal (WANG et al., 2020), melanoma (DALLA VIA et al., 2009; VITOROVIC-TODOROVIC et al., 2013), carcinoma cervical (VITOROVIC-TODOROVIC et al., 2013), LMA (MAIORAL et al., 2020; VITOROVIC-TODOROVIC et al., 2013), leucemia linfoblástica aguda e mieloma múltiplo (MAIORAL et al., 2020). Além disso, as propriedades terapêuticas incluindo efeito antiproliferativo (MENDANHA et al., 2021; MICHALKOVA et al., 2021), antioxidante (CHU; GUO, 2016; SHAIK et al., 2020), anti-inflamatório (CHU; GUO, 2016), antibacteriano (SHAIK et al., 2020; XU et al., 2019) e citotóxico (SHAIK et al., 2020; WANG et al., 2020), são comumente relacionadas às chalconas.

A 4NC (Figura 2) é um composto já comercializado como reagente químico, utilizado na rota de síntese de outros produtos comerciais, que têm atraído a atenção dos pesquisadores na área da química medicinal. Já foram identificados na literatura estudos farmacocinético e de relação estrutura-atividade que contemplam a 4NC e/ou seus derivados (DASKIEWCZ; BARRON, 2003; MULIM; RASHID; MUMMA, 1987; OH et al., 2019) e, além disso, estudos recentes descreveram as atividades biológicas leishmanicida (ASSOLINI et al., 2020) e antineoplásica (CORDEIRO et al., 2021; SANTOS et al., 2020) desse composto.

Figura 2 – Estrutura química da 4NC.



Fonte: Adaptado de PubChem (2022a).

Contudo, apesar de a 4NC já ser conhecida na literatura, ainda não foram realizados estudos avaliando o efeito desse composto sobre células de neoplasias hematológicas e, além disso, o mecanismo de ação dessa chalcona ainda não foi esclarecido. Estudos nesse contexto são importantes para aprofundar o conhecimento científico a respeito deste composto e, futuramente, impulsionar o desenvolvimento de novos fármacos a partir da 4NC.

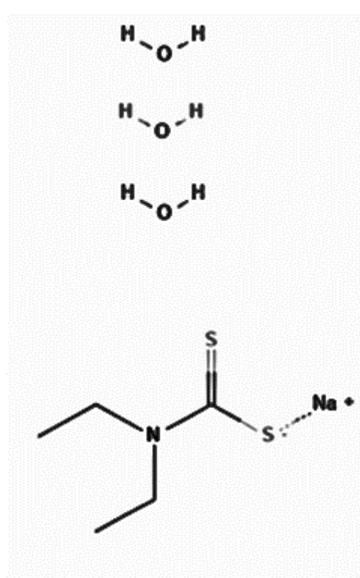
2.6 DIETILDITIOCARBAMATO DE SÓDIO TRIHIDRATADO (DETC)

O dietilditiocarbamato é um composto que pertence à classe dos ditiocarbamatos, formado por dois substituintes de etila ligados a um grupo amina que, por sua vez, está ligado ao dissulfeto de carbono. A estrutura química desse composto tem duas porções distintas, uma porção amina formada por nitrogênio e os dois grupos etila, que estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), e uma extremidade de dissulfeto de carbono que pode quelar em metais, o que atribui uma atividade biológica desse composto sobre metaloproteases e enzimas (BRAGA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2021). Assim, devido às características

estruturais do dietilditiocarbamato, várias aplicações farmacológicas têm sido investigadas para este composto, sendo que, nos últimos 20 anos, novas estruturas químicas com frações dietilditiocarbamato foram sintetizadas e testadas para diversas atividades biológicas como antineoplásica (CVEK; DVORAK, 2008; FENG et al., 2020; HE et al., 2018; HUANG et al., 2018), antiviral (PANG et al., 2007; TOPPING, JONES; 1988; YANG et al., 2018), antiglaucoma (BOZDAG et al., 2015), anti-Alzheimer (JIANG et al., 2018), antiparasitária (ASPATWAR et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2019), leishmanicida (CELES et al., 2016), e outras.

O dietilditiocarbamato de sódio, apresentado neste trabalho em sua forma trihidratada como DETC (Figura 3), é amplamente conhecido na literatura por ser um dos principais metabólitos ativos do fármaco dissulfiram. A investigação de possíveis aplicabilidades terapêuticas para este metabólito é heterogênea, pois alguns autores avaliam o efeito indireto do dietilditiocarbamato de sódio por meio da administração do fármaco dissulfiram, enquanto outros autores entendem que essas substâncias são sinônimas e, ainda, alguns estudos consideram ambos como fármacos, ou como fármaco e metabólito, e avaliam seus efeitos separadamente (AJIBOYE et al., 2022; CHIEN et al., 2019; FREYER et al., 2019; KAST et al., 2013; KAUL et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2021).

Figura 3 – Estrutura química do DETC.



Fonte: Adaptado de PubChem (2022b).

Desde a sua descoberta, o efeito terapêutico do dietilditiocarbamato de sódio vem sendo investigado para muitos distúrbios, incluindo envenenamentos por metais, proteção contra

danos de radiação, tratamento de candidíase, doença de Wilson, lúpus sistêmicos e infecção pelo HIV (AJIBOYE et al., 2022). No âmbito da oncologia, já foi avaliada a citotoxicidade do dietilditiocarbamato de sódio sobre células de melanoma (CORDEIRO et al., 2021), bem como o seu efeito como adjuvante no tratamento de câncer de mama (DUFOUR et al., 1993); como antagonista da toxicidade da cisplatina e da ciclofosfamida (FREYER et al., 2019; PAREDES et al., 1988; TSANG; AL-FAYEA; AU, 2009); e como fotossensibilizante para terapia fotodinâmica (CHEN et al., 2022; FEUSER et al., 2021; MAJI, 2022). Além disso, mais recentemente o dietilditiocarbamato de sódio foi associado a uma redução da resistência à temozolomida (fármaco utilizado no tratamento de neoplasias cerebrais), por meio da inibição da enzima superóxido dismutase 2, em modelos animais com tumor primário resistente a este fármaco (CHIEN et al., 2019).

Assim, considerando o potencial do dietilditiocarbamato de sódio no tratamento de neoplasias malignas, já descrito na literatura, e a necessidade de novas alternativas terapêuticas para a LMA, linfoma de Burkitt e mieloma múltiplo, apontadas neste trabalho, a investigação do efeito desse composto sobre modelos de neoplasias hematológicas deve ser encorajada por pesquisadores na área da oncologia experimental.

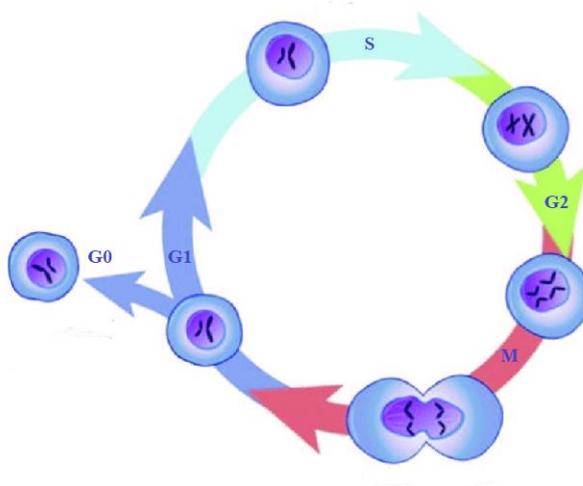
2.7 REGULAÇÃO DA MORTE CELULAR E POSSÍVEIS ALVOS TERAPÊUTICOS

A homeostase celular é resultante de um equilíbrio entre a proliferação, a diferenciação e a morte celular regulada. No desenvolvimento das neoplasias malignas ocorre a proliferação excessiva de células neoplásicas, em decorrência de falhas nos mecanismos intracelulares que mantém a homeostase. Dessa forma, o entendimento acerca desses mecanismos é fundamental para a identificação de alvos terapêuticos e, conseqüentemente, para o sucesso de novos tratamentos (GRETEN; GRIVENNIKOV, 2019; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2018b; RODRÍGUEZ-MOLINERO; LÓPEZ-DIÉGUEZ; BENEGAS, 2007). Além disso, no desenvolvimento de novos fármacos citotóxicos, é desejado que a indução das células neoplásicas à morte celular seja um processo altamente regulado e pouco imunogênico como, por exemplo, a morte celular por apoptose (DANESE et al., 2017; GALLUZZI et al., 2018; HAAKE; POLAKOWSKA, 1993; HAY et al., 2014; LOPEZ; TAIT, 2015; WICKMAN, et al., 2012).

2.8 MODULAÇÃO E BLOQUEIO DO CICLO CELULAR

O ciclo celular apresenta um papel fundamental na transformação, replicação e proliferação neoplásica, o que o torna um possível alvo terapêutico. A progressão das fases do ciclo celular é um processo regulado por sinalizações bioquímicas complexas. Esse controle é extremamente importante para a manutenção do ritmo de proliferação, para garantir a correta replicação do DNA (ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*), a segregação dos cromossomos homólogos para as células filhas originadas durante a divisão e para a coordenação dos processos de diferenciação, senescência e morte celular (BARNUM; O'CONNELL, 2014; KUMAR, ABBAS; ASTER., 2018b). O ciclo celular é composto por dois eventos principais: a síntese de DNA (fase S) e a divisão da célula-mãe em duas células-filhas durante a mitose (fase M). A fase entre a divisão celular e a síntese de DNA é denominada fase G₀/G₁, enquanto que a fase entre a síntese de DNA e a mitose é denominada fase G₂/M. As células que se encontram metabolicamente ativas, porém que não entraram no ciclo de replicação celular, são denominadas quiescentes e encontram-se na fase G₀ até que ocorra um estímulo mitótico extracelular para sinalizar a saída da fase G₁ (Figura 4) (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2018b; MALUF et al., 2011).

Figura 4 – Fases do ciclo celular.



O ciclo celular é composto pelas fases: G₁, a que ocorre o crescimento celular e o primeiro ponto de checagem; S, a que ocorre a síntese de DNA e a duplicação cromossômica; G₂, a que a célula começa a se preparar para a divisão e a que ocorre o segundo ponto de checagem; e M, a que ocorre a citocinese (divisão da célula em duas). Na fase G₀, as células estão metabolicamente ativas, mas não entraram no ciclo de proliferação (quiescentes).

Fonte: Adaptado de Melo; Almeida, Leite (2014).

Durante a fase G1 do ciclo celular, ocorre a descondensação dos cromossomos e a célula sintetiza proteínas necessárias para a fase S como, por exemplo, as enzimas responsáveis pela duplicação do DNA. Após o momento definido como ponto de restrição (final da fase G1), a progressão do ciclo celular começa a ser controlada por mecanismos intracelulares que envolvem a ativação das proteínas específicas (MALUF et al., 2011; TAN et al., 2017). Localizado entre as fases G1 e S, encontra-se o primeiro *checkpoint* (ponto de checagem). Quando são identificados erros na fase G1, a proteína p53 ativa genes inibidores de crescimento, os quais induzem a parada do ciclo celular para que seja realizado o reparo ao dano genômico (BARNUM; O'CONNELL, 2014; KUMAR, ABBAS; ASTER., 2018c; WIMAN; ZHIVOTOVSKY, 2017). Na sequência, a célula passa para a fase S, onde ocorre a replicação do seu material genético. Quando a duplicação do DNA já está completa, inicia a fase G2. Nessa fase, ocorre a diferenciação celular e a síntese de proteínas necessárias para a mitose. Entre as fases G2 e M, encontra-se o segundo *checkpoint*. Diante de danos irreparáveis nesse ponto de checagem do ciclo celular, a proteína p53 inibe o complexo responsável pela regulação da mitose, assim a prófase não é iniciada e a mitose é interrompida. Se o dano ao DNA for devidamente reparado, a progressão do ciclo celular segue para a fase M. A fase M é a fase de divisão propriamente dita, quando ocorre a separação nuclear. Essa fase compreende os processos de prófase, metáfase, anáfase e telófase; e antecede a citocinese, que é divisão de uma célula em duas células-filhas (BARNUM; O'CONNELL, 2014; HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013; MALUF et al., 2011; TAN et al., 2017; WIMAN; ZHIVOTOVSKY, 2017).

A proliferação celular constante e descontrolada é uma das principais características de células neoplásicas e é um dos principais mecanismos biológicos envolvidos na oncogênese. Nessa perspectiva, os pontos de checagem que bloqueiam a proliferação celular são fundamentais para a interrupção da progressão de mutações que poderão resultar em uma neoplasia maligna, pois integram não somente respostas a danos ao DNA, mas também caminhos essenciais para a sobrevivência celular (BARNUM; O'CONNELL, 2014; KUMAR, ABBAS; ASTER., 2018c; MALUF et al., 2011; MATTEWS; BERTOLI; BRUIN, 2022; WIMAN; ZHIVOYOVSKY, 2017). Os *checkpoints* do ciclo celular são controlados por diversas enzimas denominadas cinases dependentes de ciclinas (CDKs, do inglês *cyclin dependent kinases*). As CDKs interagem com proteínas específicas denominadas ciclinas, formando o complexo catalítico-CDK ativo. As concentrações de CDKs permanecem estáveis durante todo o ciclo celular, enquanto que a disponibilidade de ciclinas é variável ao longo da

progressão do mesmo. Dessa forma, a expressão de determinadas ciclinas determinam a ativação de CDKs específicas em cada fase do ciclo celular. A identificação de erros no processo de replicação celular leva à formação de um complexo estável entre as CDKs e proteínas inibidoras de CDKs (CKIs, do inglês *cyclin-dependent kinase inhibitors*). As CKIs impedem a ligação das CDKs às suas respectivas ciclinas e, quando o dano ao DNA não pode ser reparado, são ativadas vias que iniciam a morte celular programada (BARNUM; O'CONNELL, 2014; KUMAR, ABBAS; ASTER., 2018b; MALUF et al., 2011; TAN et al., 2017). Nesse caso, a proteína p53, dentre outras, induz a expressão de genes efetores pró-apoptóticos que induzem a célula à apoptose com o objetivo de eliminar as células modificadas que possuem potencial catastrófico (BARNUM; O'CONNELL, 2014; KUMAR, ABBAS; ASTER., 2018c;).

2.9 MORTE CELULAR

No início dos anos 2000, acreditava-se que a morte celular era um processo de caráter apenas degenerativo, a qual era iniciada em resposta a lesões celulares, infecções e ausência de fatores de crescimento. Atualmente, sabe-se que a morte celular pode ser minimamente controlada e resultante de uma série de estímulos intracelulares e extracelulares, além de também ser um dos eventos cruciais na evolução de diversas doenças (GALLUZZI et al., 2018; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

De acordo com o Comitê de Nomenclatura em Morte Celular (CNMC), os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas, bioquímicas e funcionais. A revisão mais atual do CNMC (2018) descreveu pela primeira vez o termo “morte celular regulada”, e propôs um novo conceito para o termo “morte celular programada”. Assim, a morte celular regulada é descrita como uma forma de morte celular que resulta na ativação de um ou mais módulos de transdução de sinal e, portanto, pode ser farmacológica ou geneticamente modulada (cineticamente e até certo ponto). Já a morte celular programada foi definida como uma forma particular de morte celular regulada que ocorre em cenários estritamente fisiológicos, ou seja, não se relaciona com perturbações da homeostase e, portanto, não ocorre no contexto de falha na adaptação ao estresse. Outros tipos de morte celular regulada foram descritos pelo CNMC (2018), como a apoptose intrínseca, apoptose extrínseca, anoikis, ferroptose, piroptose, parthanatos, necroptose, morte celular dependente de autofagia, morte celular entóxica, morte celular nentóxica, morte mitótica, morte celular dependente de

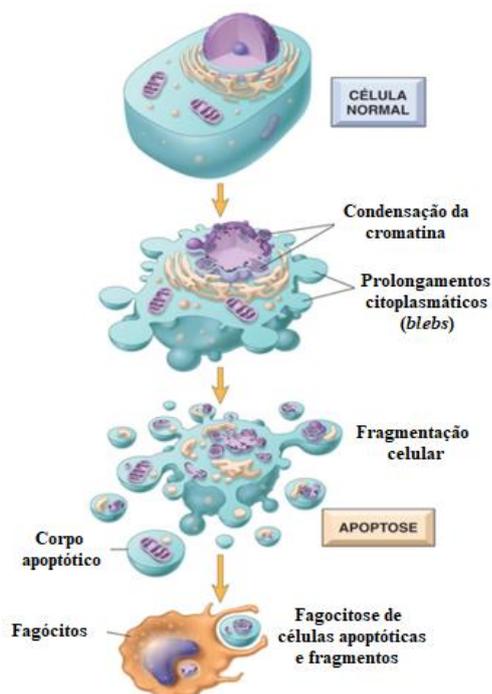
lisossomos, morte celular imunogênica e necrose induzida por transição de permeabilidade mitocondrial (GALLUZZI et al., 2018).

2.9.1 Apoptose

A apoptose é o tipo de morte celular mais bem descrito na literatura, e pode ser definida como um processo altamente regulado, com vias de sinalização bem definidas que podem ser ativadas por substâncias e genes envolvidos na homeostase celular ou por alterações patológicas específicas. Inicialmente, a apoptose foi considerada como sinônimo de morte celular programada em comparação à necrose. Entretanto, após a revisão de 2018 do CNMC, a apoptose não fisiológica, como a induzida por compostos citotóxicos, que é tema do presente estudo, passou a ser denominada morte celular regulada (GALLUZZI et al., 2018; KERR et al., 1972).

O processo de apoptose pode ser reconhecido por características morfológicas marcantes e coordenadas. Dentre elas, destacam-se a diminuição do volume celular e a condensação da cromatina, a qual se concentra junto à membrana nuclear que se mantém intacta. Nessa etapa, a morfologia da maioria das organelas permanece preservada, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A proteína fosfatidilserina, normalmente localizada na parte interna da membrana plasmática, é translocada para o meio externo. A seguir, ocorre a formação de prolongamentos da membrana celular (*blebs*) e a formação de corpos apoptóticos, onde o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. O processo de fragmentação internucleossômica do DNA ocorre segundo um padrão característico no qual uma endonuclease produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, porém sempre múltiplos de 180 - 200 pares de base (“padrão em escada”). Finalmente, as células em processo de morte ou os corpos apoptóticos são fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório expressivo (*in vivo*) (Figura 5) (GALLUZZI et al., 2018; HAAKE; POLAKOWSKA, 1993; KROEMER et al., 2008; SIVAGNANAM et al., 2017; XU; HAI; HUA, 2019).

Figura 5 – Alterações morfológicas em células apoptóticas.



Células em apoptose sofrem alterações morfológicas tais como diminuição do volume celular, condensação da cromatina, formação de “*blebs*” de membrana plasmática, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos, os quais, *in vivo*, serão fagocitados por macrófagos. Fonte: Adaptado de Quizlet (2022).

Segundo a literatura, ocorrem dois processos distintos responsáveis pela regulação da apoptose: a apoptose intrínseca e a apoptose extrínseca (GALLUZZI et al., 2018).

A apoptose intrínseca é ativada por estresses intracelulares ou extracelulares, como a privação de fatores de crescimento, danos ao DNA, hipóxia, ativação de oncogenes e concentrações elevadas de EROs e radiação ultravioleta. Os sinais transduzidos em resposta a esses estímulos convergem principalmente para a mitocôndria. Esses estímulos induzem uma transição da permeabilidade da membrana mitocondrial pela formação de poros de transição (CARNEIRO; EL-DEITY, 2020; GALLUZZI et al., 2018; GOLDAR et al., 2015; KASHYAP; GARG; GOEL, 2021). Esses poros de transição de permeabilidade mitocondrial são regulados pelos membros da família Bcl-2, tais como Bax, Bak, Bok, Bim, Bad, Bid, Bik, Bmf, Puma, Noxa, Hrk, Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, A1 e Bcl-B, os quais possuem funções opostas, ou seja, enquanto algumas proteínas possuem efeito antiapoptótico, outras ativam a apoptose (CARNEIRO; EL-DEITY, 2020; GALLUZZI et al., 2018).

Dessa forma, o estresse celular resulta no desequilíbrio entre a expressão de proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2 como a proteína 2 do linfoma de células B (Bcl-2, do inglês *B-*

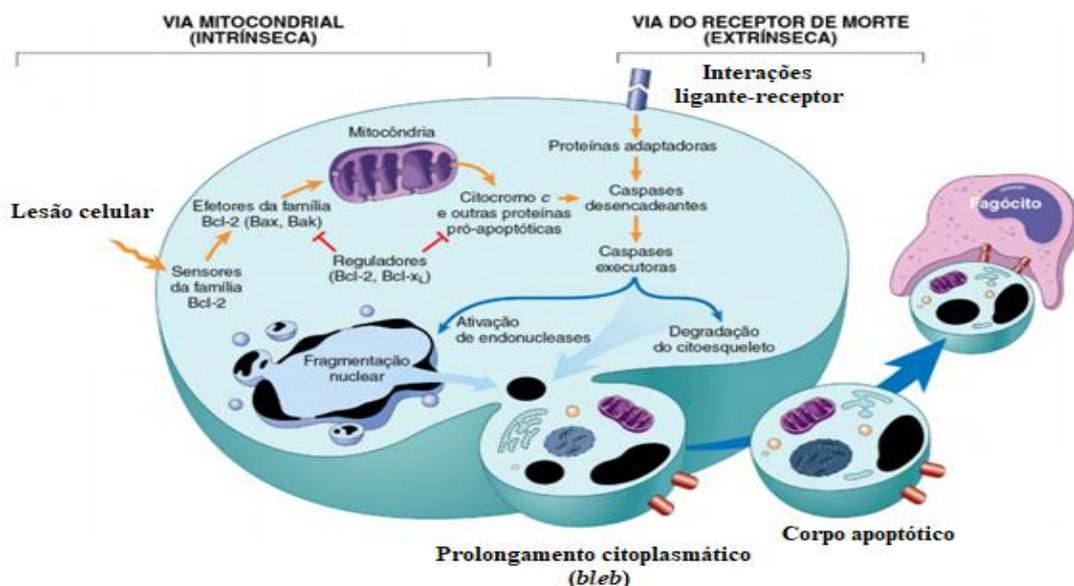
cell lymphoma) e de proteínas pró-apoptóticas como a proteína X associada a Bcl-2 (Bax), ambas localizadas no espaço intramembranar da mitocôndria. Esse desequilíbrio resulta na emissão de um sinal capaz de induzir a formação dos poros de transição, o que leva à despolarização e à perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Em consequência da perda do $\Delta\Psi_m$, ocorre a liberação de proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembranar para o citosol como, por exemplo, o citocromo c, o fator indutor de apoptose (AIF, do inglês *apoptosis inducing factor*), a endonuclease G e as proteínas Smac/DIABLO (CARNEIRO; EL-DEITY, 2020; GALLUZZI et al., 2018; GOLDAR et al., 2015; KASHYAP; GARG; GOEL, 2021). O citocromo c liberado no citosol interage com o fator ativador de protease apoptótica 1 (Apaf1, do inglês *apoptotic peptidase activating factor 1*), que se liga à pró-caspase 9 e formam um complexo denominado apoptossoma. O apoptossoma leva à ativação da caspase iniciadora (caspase-9), a qual cliva a caspase-3 (caspase efetora) e prossegue com a cascata das caspases que medeiam a apoptose (CARNEIRO; EL-DEITY, 2020; GALLUZZI et al., 2018; ZOU et al., 1997). Adicionalmente, o AIF e a endonuclease G podem induzir a morte celular de maneira independente de caspases por meio da indução de condensação da cromatina e da clivagem do DNA (KASHYAP; GARG; GOEL, 2021). Ainda, a proteína pró-apoptótica Smac/DIABLO ativa a cascata de caspases por interagir e antagonizar as proteínas inibidoras da apoptose (IAPs, do inglês *inhibitors of apoptosis proteins*), dentre as quais destaca-se a proteína survivina (CARNEIRO; EL-DEITY, 2020; GOLDAR et al., 2015).

A sinalização da apoptose pela via extrínseca é iniciada pela ativação de receptores localizados na membrana plasmática, por meio de estímulos extracelulares. Esses receptores, tais como o fator de necrose tumoral (TNFR, do inglês *tumor necrosis factor receptor*), FasR (do inglês *Fas receptor*, também chamado de Apo-1 ou CD95), DR-3 (do inglês *death receptor 3*, também chamado de Apo-2), DR-6 (do inglês *death receptor 6*) e TRAIL-R (do inglês *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor*), são denominados receptores de morte (AMARANTE-MENDES; GRIFFITH, 2015; GALLUZZI et al., 2018; GOLDAR et al., 2015). Os receptores de morte possuem um domínio extracelular rico em cisteína, o qual é responsável pela ligação do receptor ao seu ligante específico, e um domínio citoplasmático, denominado domínio de morte (DD; do inglês, *death domain*), que permite a propagação dos sinais apoptóticos (CARNEIRO; EL-DEITY, 2020; GOLDAR et al., 2015; KASHYAP; GARG; GOEL, 2021). Quando os receptores de morte reconhecem seus ligantes específicos, eles sofrem trimerização e consequente ativação. Os DD interagem com as proteínas adaptadoras FADD (do inglês, *Fas associated protein with death domain*) ou TRADD (do inglês, *TNFR1-*

associated death domain protein). Essas proteínas adaptadoras possuem outro domínio de interação de proteínas chamado de domínio efetor de morte (DED; do inglês *death effect domain*). Quando o DED das proteínas adaptadoras interage com o DED da pró-caspase 8, forma-se o complexo sinalizador indutor de apoptose (DISC), o qual leva à ativação da pró-caspase 8. A caspase 8 ativada ativa diretamente as caspases efetoras -3 e -7, o que resulta em apoptose independente da via mitocondrial (GALLUZZI et al., 2018; GOLDAR et al., 2015; KOFF et al., 2015). Além disso, a caspase-8 ativada pode ativar a proteína pró-apoptótica Bid, membro da família Bcl-2, que leva à formação de um fragmento chamado Bid truncado (tBid, do inglês *truncated Bid*), que possibilita o aumento da permeabilidade mitocondrial e liberação de proteínas pró-apoptóticas, fazendo uma conexão entre a apoptose extrínseca e intrínseca (AMARANTE-MENDES; GRIFFITH, 2015; KASHYAP; GARG; GOEL, 2021; RÖDER et al., 2011).

Em ambos os processos de apoptose ocorre a ativação de caspases (Figura 6) (GALLUZZI et al., 2018; KASHYAP; GARG; GOEL, 2021). As caspases efetoras (caspase-3 -6 e -7), ativadas pela caspase-9 da apoptose intrínseca e pela caspase-8 da apoptose extrínseca, atuam na clivagem de substratos específicos tais como proteínas cinases, proteínas do citoesqueleto e proteínas envolvidas no reparo do DNA, o que culmina em uma série de alterações morfológicas as quais caracterizam a apoptose e levam à morte celular (BAIG et al., 2016; CARNEIRO; EL-DEITY, 2020; GALLUZZI et al., 2018; KASHYAP; GARG; GOEL, 2021).

Figura 6 – Sinalização da apoptose intrínseca e extrínseca.



A apoptose intrínseca é ativada por estímulos intra ou extracelulares que provocam uma lesão celular.

Inicialmente há um desequilíbrio entre membros da família Bcl-2, o que resulta na perda do $\Delta\Psi_m$ e a consequente liberação de proteínas próapoptóticas, como o citocromo c. Esse por sua vez forma o apoptossoma que ativa a caspase iniciadora -9 e permite a fosforilação da caspase-3. A caspase-3 ativada cliva substratos específicos que resultam em alterações morfológicas seguidas da execução da apoptose. A apoptose extrínseca é iniciada pela ativação de receptores localizados na membrana plasmática. Os receptores trimerizados interagem com as proteínas adaptadoras FAAD e TRAAD e com a pró-caspase-8, que, quando ativada, ativa diretamente a caspase-3, culminando na apoptose (CARNEIRO; EL-DEITY, 2020; GALLUZZI et al., 2018). Fonte: Adaptado de Valente (2023).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito citotóxico e a seletividade dos compostos 4NC e DETC sobre células de linhagens de neoplasias hematológicas (LMA, linfoma de Burkitt e mieloma múltiplo), bem como investigar os possíveis mecanismos de morte celular envolvido na citotoxicidade de ambos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma predição *in silico* das propriedades físico-químicas e farmacocinéticas dos compostos 4NC e DETC.

- Investigar o potencial efeito citotóxico da 4NC e do DETC em relação à concentração e ao tempo de incubação sobre uma linhagem celular humana de mieloma múltiplo (MM.1S), uma linhagem humana de LMA (K562) e uma linhagem humana de linfoma de Burkitt (Daudi).

- Determinar a concentração inibitória 50% (CI₅₀) de ambos os compostos em células MM.1S, K562 e Daudi.

- Investigar o potencial efeito citotóxico dos compostos sobre células não neoplásicas, utilizando como modelo uma linhagem celular humana de estroma de medula óssea (HS-5) e eritrócitos obtidos a partir do sangue periférico (SP) de indivíduos considerados clinicamente saudáveis.

- Calcular o índice de seletividade (IS) da 4NC e do DETC para as células MM.1S, K562 e Daudi, em relação às células não neoplásicas (HS-5).

- Verificar o efeito dos compostos 4NC e DETC sobre o ciclo celular nas linhagens de neoplasias hematológicas.

- Investigar se o efeito dos compostos 4NC e DETC sobre células neoplásicas envolve a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs).

- Analisar a morfologia das células neoplásicas após exposição à 4NC e ao DETC.

- Avaliar o efeito dos compostos sobre o $\Delta\Psi_m$ das células de neoplasias hematológicas e investigar o envolvimento de fatores reguladores da apoptose (Bax, Bcl-2, fator indutor da apoptose, survivina, caspase-3 e receptor Fas) no potencial efeito citotóxico da 4NC e do DETC.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Essa seção irá abordar os procedimentos, as técnicas e os reagentes utilizados para a obtenção dos resultados apresentados neste trabalho.

4.1 ORIGEM DOS COMPOSTOS INVESTIGADOS

Os compostos investigados neste trabalho são produtos comerciais (4-Nitrochalcona - Sigma-Aldrich[®], USA; e Dietilditiocarbamato de sódio trihidratado - Vetec[®], Brasil), cedidos pelo Laboratório de Controle e Processos de Polimerização (LCPP) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.2 PREDIÇÃO *IN SILICO* DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS

A avaliação da biodisponibilidade da administração por via oral dos compostos 4NC e DETC foi realizada por meio da ferramenta *online* SwissADME, desenvolvida pelo grupo de modelagem molecular do *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB), a qual forneceu uma predição *in silico* das características físico-químicas e propriedades farmacocinéticas dos compostos investigados. Dessa forma, além da determinação dos valores de peso molecular, Log P o/a (coeficiente de partição óleo/água), aceptores de ligação hidrogênio, doadores de ligação hidrogênio, número de ligações rotacionáveis e área de superfície polar topológica (TPSA, do inglês *topological polar surface area*), a ferramenta em questão possibilitou a predição da permeabilidade dos compostos para a barreira hematoencefálica (BHE); a interação com a glicoproteína P (P-gp, do inglês, *P-glycoprotein*) e com isoenzimas da superfamília do citocromo P450 (CYP, do inglês *cytochrome P450*), bem como forneceu um escore de biodisponibilidade para os compostos (escala que varia de 0.0 a 1.0, sendo que quanto mais perto de 1.0, maior a probabilidade do futuro fármaco apresentar >10 % de biodisponibilidade oral) (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

4.3 CULTIVO CELULAR

Neste estudo foram utilizadas três linhagens celulares humanas de neoplasias hematológicas: Daudi (linfoma de Burkitt), K562 (LMA) e MM.1S (mieloma múltiplo, linhagem sensível a dexametasona). Além dessas, a linhagem celular humana HS-5 (estroma de medula óssea) foi incluída no estudo como modelo de célula não neoplásica e constituinte do estroma medular. As células Daudi, MM.1S e HS-5 foram cedidas pela Prof. Dr^a. Sara Saad,

da Universidade Estadual de Campinas, e a linhagem K562 foi cedida pelo Prof. Dr. Alberto Orfao, do *Cientro de Investigación del Cancer* da Universidade de Salamanca.

O cultivo celular foi realizado em meio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10.000 U/mL de penicilina, 10 mM de tampão HEPES (ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'[2-etanosulfônico]) e 10.000 µg/mL de estreptomicina, em pH 7,2. Todos os reagentes utilizados para a preparação dos meios de cultura foram adquiridos da Gibco[®], Thermo Fischer, EUA.

As células foram semeadas a uma densidade de 1×10^6 células/frasco, em frascos de cultura estéreis de 25 cm² ou 75 cm² (Kasvi, Brasil) repicadas a cada 48 horas e mantidas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂, a 37 °C. Para o repique das células aderidas (HS-5), foi utilizado uma solução de tripsina /ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*) 0,25 % (ambos adquiridos da Thermo Fischer, EUA), a fim de soltar as células da garrafa. Quando as células adquiriram um aspecto redondo e individualizado, foi utilizado meio RPMI com 10% de soro fetal bovino para neutralizar a solução contendo tripsina. Em seguida, a suspensão de células formada foi centrifugada a 264 g, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino e o repique foi realizado a partir desta suspensão celular final. Antes de cada protocolo experimental, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão com o corante Azul de Trypan 0,5% (Sigma-Aldrich[®], EUA) (TENNANT, 1964), e apenas as suspensões celulares com mais de 95% de células viáveis foram utilizadas nos experimentos.

4.4 CURVAS DE CONCENTRAÇÃO E TEMPO-RESPOSTA E DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A fim de avaliar o efeito citotóxico da 4NC e do DETC sobre as linhagens celulares humanas Daudi, K562, MM.1S e HS-5, as células foram incubadas com concentrações crescentes dos compostos (1, 5, 10, 25, 50 e 100 µM) por períodos de 24, 48 e 72 horas (com exceção da linhagem humana HS-5, a qual foi avaliada apenas no tempo de 72 horas). De acordo com padronização realizada previamente aos experimentos, para as linhagens Daudi e K562, foi utilizada uma densidade celular de 5×10^4 células/poço para 24 horas de incubação, $2,5 \times 10^4$ células/poço para 48 horas e $1,25 \times 10^4$ células/poço para o período de 72 horas, em 200 µL de meio RPMI, as quais foram semeadas em placas de cultura de 96 poços e incubadas a 37°C, com 5% de CO₂. Em relação às linhagens MM.1S e HS-5, essas foram semeadas a uma

densidade celular de 1×10^5 células/poço para incubação de 24 horas, 5×10^4 células/poço para 48 horas e $2,5 \times 10^4$ células/poço para 72 horas, sob as mesmas condições descritas acima.

As células que são cultivadas em suspensão (K562, Daudi e MM.1S) foram plaqueadas e incubadas com os compostos no mesmo dia. Já as células HS-5, que crescem aderidas em frascos de cultura na forma de monocamada, foram plaqueadas em um dia, tratadas com a 4NC e DETC no dia seguinte, e imediatamente incubadas. Para cada experimento, foi realizado um controle de células sem tratamento, e outro controle acrescido de 2% do veículo de dissolução dos compostos (dimetilsulfóxido, DMSO) (Merck Millipore[®], Alemanha) ao meio de cultura.

Os compostos investigados no presente trabalho foram dissolvidos em DMSO (Merck Millipore[®], Alemanha) na concentração de 10 mM e armazenados a 4°C (solução estoque) até o preparo de soluções intermediárias, a partir da solução estoque, as quais foram diluídas em meio de cultura no momento da realização dos protocolos experimentais.

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico do brometo de 3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), um sal tetrazólico de cor amarela que é reduzido ao seu derivado formazan (cor roxa) pela mitocôndria de células viáveis. Assim, o referido método consiste na avaliação indireta da viabilidade celular, por meio da atividade enzimática mitocondrial (MOSMANN, 1983). Dessa forma, o meio de cultura foi parcialmente removido após o período de incubação com os compostos; e uma solução contendo 5 mg/mL de MTT (Invitrogen[®], EUA) diluído em solução de tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) (Thermo Fischer, EUA) foi adicionada aos poços; depois as células foram novamente incubadas por um período de três horas. Na sequência, o sobrenadante foi removido, e os precipitados de formazan formados em cada poço foram dissolvidos com 100 µL de uma solução contendo álcool isopropílico (Proc 9[®], Brasil) e HCl 0,04N (Lafan[®], Brasil), e finalmente as placas foram centrifugadas a 264 g por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para uma nova placa, onde foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro (MB-580, Heales[®], China) no comprimento de onda de 540 nm. A absorbância do grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular e a CI_{50} foi obtida por regressão linear, a partir da análise das curvas concentração e tempo-resposta, utilizando o *software* GraphPad Prism 9.

4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE ERITRÓCITOS HUMANOS

A influência da 4NC e do DETC sobre os eritrócitos humanos foi investigada por meio do ensaio de hemólise. Esse método tem como objetivo avaliar o potencial de determinado

composto em causar lesões nas membranas das hemácias, o que leva ao extravasamento do seu conteúdo intracelular (EVANS et al., 2013).

Inicialmente, foram coletadas amostras de sangue periférico (SP) de três indivíduos considerados clinicamente saudáveis e não fumantes, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) conforme o Comitê de Ética de Pesquisa em Seres humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (CEPSH nº2.838/2018) (Anexo 1), as quais foram obtidas a partir de punção venosa, em tubos contendo o anticoagulante EDTA (BD Biosciences[®], EUA). Imediatamente após a coleta, as hemácias foram isoladas do plasma e dos leucócitos por centrifugação (10 minutos a 264 g); transferidas para um tubo falcon; lavadas com uma solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% (NaCl 0,9%) (Equiplex[®], Brasil) e suspensas em NaCl 0,9% a fim de obter uma dispersão estoque concentrada de eritrócitos, cuja absorbância ficou entre 1,8 e 2,2 em leitura realizada por espectrofotômetro a 540 nm. A partir do concentrado de eritrócitos, foram preparados os controles positivo (100% de hemólise, 950 µL de água destilada e 50 µL da dispersão de eritrócitos) e negativo (0% de hemólise, 950 µL de NaCl 0,9% e 50 µL da dispersão de eritrócitos), além das amostras teste (950 µL de NaCl 0,9% e 50 µL da dispersão de eritrócitos), as quais foram submetidas a concentrações crescentes dos compostos, de acordo com os valores de CI_{50} previamente calculados (4NC: 49,56 µM - 148,68 µM; DETC: 58,85 µM - 1.177,00 µM). As amostras foram homogeneizadas e incubadas por uma hora, a 37°C e sob agitação suave (100 g) (WANG et al., 2009). Na sequência, foram centrifugadas a 500 g por cinco minutos, e os sobrenadantes foram transferidos para uma placa de 96 poços a fim de seguir com a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 nm. Por fim, a taxa de hemólise foi calculada conforme a Equação 1.

Equação 1 – Taxa de hemólise.

$$\text{Taxa de hemólise} = \frac{D0t - D0cn}{D0cp - D0cn} \times 100$$

Onde: Dt: densidade óptica da amostra teste; Dcn: densidade óptica do controle negativo; Dcp: densidade óptica do controle positivo. Fonte: Elaborada pela autora.

4.6 ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

O IS é utilizado para demonstrar a capacidade de um composto induzir morte celular de forma seletiva para uma determinada linhagem celular, em relação à outra. O cálculo é baseado na razão entre a CI_{50} em células que são utilizadas como padrão de comparação e a CI_{50} em outra linhagem de células, a qual se deseja verificar se o composto é seletivo. Assim, foi

avaliada a seletividade dos compostos 4NC e DETC para linhagens celulares de neoplasias hematológicas (MM1.S, Daudi e K562) em relação à células não neoplásicas (HS-5), após 72 horas de incubação, conforme a Equação 2.

Equação 2 – Índice de seletividade.

$$IS = \frac{CI50 \text{ linhagem não neoplástica}}{CI50 \text{ linhagem de neoplasia hematológica}}$$

Fonte: Elaborada pela autora.

Foi considerado como alta seletividade um $IS \geq 10$, moderada seletividade $5 < IS < 10$ e baixa seletividade um $IS \leq 5$ (PEÑA-MORÁN et al., 2016).

As duas linhagens celulares que apresentaram maiores IS em relação às células HS-5 foram selecionadas para dar continuidade aos experimentos.

4.7 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

Para avaliar o efeito dos compostos 4NC e DETC sobre o ciclo celular, foi utilizado o “PI/RNase Solution Kit” (Immunostep[®], Espanha). O iodeto de propídio (PI, do inglês *propidium iodide*), presente no referido *kit* comercial, é uma molécula fluorescente intercalante de ácidos nucleicos. Assim, considerando as diferenças no conteúdo de DNA entre as fases do ciclo celular, o princípio deste método se baseia na detecção da intensidade de fluorescência do PI após digestão do RNA, o que possibilita a quantificação da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular (POZAROWSKI; DARZYNKIEWICZ, 2004).

As linhagens celulares selecionadas foram incubadas por 18 horas (1×10^6 células/poço) com os compostos 4NC e DETC nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas, em estufa úmida, a 37°C e com 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS, e o procedimento de marcação com PI foi realizado conforme instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram fixadas com etanol 70% (Dinâmica[®], Brasil) e incubadas a 4°C por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas duas vezes com PBS suplementado com 2% de albumina sérica bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) (Sigma-Aldrich[®], EUA), e centrifugadas a 264 g durante 10 minutos. Após a centrifugação, as células foram incubadas por 15 minutos com a solução de PI contendo RNase, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Por fim, com o auxílio de uma estratégia de *gating* no canal PE (510-595 nm), foram adquiridos 50.000 eventos em ciclo no citômetro de fluxo BD FACSCanto II TM (Becton

Dickinson Immunocytometry Systems[®], EUA), com o *software* BDFACSDiva versão 8.0.1. Os dados foram analisados utilizando o *software* Infinicyt versão 2.0 (Cytognos[®], Espanha). Para a caracterização dos parâmetros a serem analisados no citômetro de fluxo, este protocolo experimental contou com um controle negativo (células sem tratamento).

4.8 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EROS

Para avaliar a capacidade dos compostos 4NC e DETC em produzir EROs, foi utilizado o *kit MitoSOX Red Molecular Probes* (Thermo Fischer[®], EUA) conforme instruções do fabricante. O referido *kit* é composto por um corante fluorescente capaz de permear a membrana plasmática íntegra e se acumular no interior da mitocôndria, onde ocorre uma reação de oxidação do reagente MitoSOX pelo radical superóxido, emitindo fluorescência vermelha. Dessa forma, a captação da intensidade de fluorescência pelo citômetro de fluxo é proporcional a produção de EROs.

As linhagens celulares selecionadas (1×10^6 células/poço) foram incubadas com os compostos 4NC e DETC nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas, por 18 horas, em estufa úmida, a 37°C e com 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas a 264 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 300 µL de uma solução de MitoSOX diluído na proporção de 1:10.000 sobre o sedimento celular, seguido de incubação em temperatura ambiente e na ausência de luz por 30 minutos. Após esse período, as células foram centrifugadas a 264 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi suspenso em 300 µL de PBS. As células (50.000 eventos) foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II[™], com o *software* BDFACSDiva versão 8.0.1. Para a caracterização dos parâmetros analisados no citômetro de fluxo, este protocolo experimental contou com um controle negativo (células sem tratamento). Os *doublets* foram retirados utilizando-se as características de FSC *Heigh* e FSC *Area* das células. A análise dos dados gerados foi realizada utilizando-se o *software* Infinicyt versão 2.0.

4.9 INVESTIGAÇÃO DA APOPTOSE

No presente estudo, foram realizados três métodos distintos para identificar se a apoptose é o tipo de morte celular envolvida na citotoxicidade dos compostos 4NC e DETC sobre as linhagens celulares neoplásicas selecionadas. Inicialmente, foi avaliada a morfologia das células por microscopia de fluorescência, com o auxílio dos corantes brometo de etídio (BE) e laranja de acridina (LA). Na sequência, foi realizada a avaliação da exposição dos

resíduos de fosfatidilserina marcados com anexina-V conjugada a FITC (fluoresceína, do inglês *fluorescein isothiocyanate*), por citometria de fluxo, e o terceiro ensaio foi a investigação da ativação da caspase-3, igualmente por citometria de fluxo. Adicionalmente, as vias de sinalização da apoptose também foram avaliadas por citometria de fluxo.

4.9.1 Análise da morfologia das células coradas com BE e LA

O LA é um corante permeável à membrana citoplasmática intacta, que interage com o DNA e confere fluorescência verde às células observadas em microscópio de fluorescência. Já o BE é um intercalante de DNA que confere fluorescência avermelhada/alaranjada somente às células com aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática. Este método permite a visualização da morfologia das células e a identificação de possíveis alterações no volume celular, características citoplasmáticas e nucleares, bem como alterações na integridade da membrana plasmática (RENVOIZÉ et al., 1998).

Para a realização deste ensaio, as linhagens celulares selecionadas (1×10^6 células/poço) foram incubadas por 18 horas com os compostos 4NC e DETC nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas, em estufa úmida, a 37°C e com 5% de CO_2 . Após a incubação as células foram lavadas com PBS e suspensas em uma solução contendo BE (10 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma-Aldrich®, EUA) e LA (10 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma-Aldrich®, EUA), na proporção 1:1 (GENG et al., 1998). Na sequência, uma alíquota de 25 μL da suspensão celular foi transferida para uma lâmina de vidro, a qual foi recoberta com uma lamínula. As alterações morfológicas foram observadas em um microscópio de fluorescência (ECLIPSE Ni U®, Nikon, Japão) e os campos representativos foram fotografados em aumento de 400 vezes.

4.9.2 Avaliação da exposição dos resíduos de fosfatidilserina

A proporção de células com exposição dos resíduos de fosfatidilserina foi indiretamente avaliada a partir da determinação da intensidade de fluorescência média das células neoplásicas marcadas com anexina-V conjugada a FITC, pela técnica de citometria de fluxo, tendo em vista que esse marcador apresenta afinidade de ligação à fosfolipídios negativamente carregados como a fosfatidilserina exposta no início do processo apoptótico (KOOPMAN et al., 1994).

As linhagens de neoplasias hematológicas selecionadas (1×10^6 /poço) foram incubadas por 18 horas com 4NC e DETC nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas, em estufa úmida, a 37°C e com 5% de CO_2 . Após o período de incubação, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 264 g, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi lavado com 4 mL de PBS. Em

seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi suspenso com 500 μ L de tampão (10 mM HEPES, 2,5 mM CaCl₂ e 140 mM NaCl). Uma alíquota de 100 μ L dessa suspensão celular foi utilizada para proceder com a marcação, onde foram adicionados 5 μ L de anexina-V conjugada a FITC (BD Pharmingen™ - Catálogo: 556419). Após a marcação, as células foram incubadas por 30 minutos, em seguida, foi adicionado PBS e, por fim, 50.000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo BD FACSCanto II™, com o *software* BDFACSDiva versão 8.0.1. Para a caracterização dos parâmetros analisados no citômetro de fluxo, este protocolo experimental contou com um controle negativo (células sem tratamento). Os *doublets* foram retirados utilizando-se as características de FSC *Height* e FSC *Area* das células. A análise dos dados gerados foi realizada utilizando-se o *software* Infinicyt versão 2.0.

4.9.3 Investigação da expressão de proteínas pró e antiapoptóticas

A ativação da caspase efetora da apoptose (caspase-3), bem como a expressão de outras proteínas envolvidas na apoptose intrínseca e extrínseca foram avaliadas por citometria de fluxo. As células neoplásicas selecionadas (1 x 10⁶ células/poço) foram incubadas por 18 horas com os compostos 4NC e DETC nas suas respectivas CI₅₀ de 24 horas, em estufa úmida, a 37°C e com 5% de CO₂. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 264 g, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi lavado duas vezes com 4 mL de PBS. Para avaliação das proteínas intracelulares (Bax, Bcl-2, AIF, caspase-3 ativada e survivina) foi realizada a fixação e a permeabilização da membrana citoplasmática com o *kit* FIX&PERM® (Nordic-MUBio®, Holanda), conforme instruções do fabricante. Os experimentos referentes a avaliação do FasR não passaram pela etapa de fixação e permeabilização, por se tratar de uma proteína localizada na membrana celular. Seguindo o protocolo de marcação, as células foram incubadas por 20 minutos com volumes adequados dos anticorpos de interesse (Quadro 1), em temperatura ambiente e na ausência de luz. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 264 g por cinco minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 4 mL de PBS. Por fim, o sobrenadante foi descartado, foram adicionados 300 μ L de PBS e as células (50.000 eventos) foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II™, com o *software* BDFACSDiva versão 8.0.1. Para a caracterização dos parâmetros analisados no citômetro de fluxo, este protocolo experimental contou com um controle negativo (células sem tratamento). Os *doublets* foram retirados utilizando-se as características de FSC *Height* e FSC *Area* das células. A análise dos dados gerados foi realizada utilizando-se o *software* Infinicyt versão 2.0.

Quadro 1 – Anticorpos utilizados na análise de proteínas relacionadas com a apoptose.

Marcador	Clone	Fabricante	Código de catálogo	Volume utilizado	Fluorocromo
FasR	B-10	Santa Cruz, EUA	SC-8009 PE	5 μ L	PE
Bax	B-9	Santa Cruz, EUA	SC-7480 PercP	5 μ L	PercP
Bcl-2	Bcl-2/100	Exbio, República Checa	1F-668-T100	4 μ L	FITC
AIF	E-1	Santa Cruz, EUA	SC-13116 FITC	5 μ L	FITC
Survivina	D-8	Santa Cruz, EUA	SC-17779 PE	5 μ L	PE
Caspase-3 ativada	C92-605	BD Bioscience, EUA	560627	5 μ L	V450

FITC: fluoresceína; PercP: complexo proteína peridínina-clorofila; PE: ficoeritrina; V450: *pacific blue*. Fonte: A autora.

4.9.4 Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Para avaliar o efeito dos compostos 4NC e DETC sobre o $\Delta\Psi_m$ das células selecionadas foi utilizado o *kit* MitoView 633 (Biotium®, Califórnia, EUA). Segundo instruções do fabricante, o MitoView 633 é composto por um corante fluorescente capaz de permear a membrana plasmática, o qual se acumula na mitocôndria das células com $\Delta\Psi_m$ íntegro. Desta forma, a fluorescência é proporcional a integridade de membrana mitocondrial, uma vez que o corante não consegue se acumular em membranas com potencial comprometido.

As linhagens celulares selecionadas (1×10^6 células/poço) foram incubadas com os compostos 4NC e DETC nas suas respectivas CI_{50} de 24 horas, por 18 horas, em estufa úmida, a 37°C e com 5% de CO_2 . Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas a 264 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100 μ L de uma solução de MitoView 633 diluído 1:10.000 sobre o sedimento celular, seguido de incubação em temperatura ambiente e na ausência de luz por 30 minutos. Após esse período, as células foram centrifugadas a 264 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi suspenso em 300 μ L de PBS. As células (50.000 eventos) foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II™, com o *software* BDFACSDiva versão 8.0.1. Para a caracterização dos parâmetros analisados no citômetro de fluxo, este protocolo experimental contou com um controle negativo (células sem tratamento). Os *doublets* foram retirados utilizando-se as características de *FSC Height* e *FSC Area* das células. A análise dos dados gerados foi realizada utilizando-se o *software* Infinicyt versão 2.0.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados no presente trabalho foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), exceto aqueles nos quais foram utilizadas figuras representativas, sendo que cada experimento foi repetido pelo menos três vezes, de forma independente.

As análises estatísticas dos ensaios de citotoxicidade foram realizadas utilizando-se a análise de variância ANOVA *one way*, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. Para a avaliação das diferentes fases do ciclo celular, produção de EROs, externalização dos resíduos de fosfatidilserina, expressão das proteínas pró e antiapoptóticas, $\Delta\Psi_m$ e também para o ensaio de hemólise, a análise estatística foi realizada utilizando-se o teste *t* de *Student*, comparando o tratado com o grupo controle. Em todas as análises, foi adotado um nível de confiança de 95% e os testes estatísticos foram aplicados por meio do *software* GraphPad Prism 9.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FARMACOCINÉTICAS DOS COMPOSTOS 4NC E DETC

A síntese e a caracterização de moléculas potencialmente ativas, bem como a avaliação de suas propriedades biológicas, são fases iniciais do processo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (GUIDO et al., 2010; KATZUNG; TREVOR, 2017). Nesse contexto, a análise de propriedades farmacocinéticas é uma etapa importante no planejamento de fármacos a serem administrados pela via oral (via mais comum e mais fácil de administração), tendo em vista que umas das principais falhas nas fases de ensaios pré-clínicos e clínicos de fase I-III estão relacionadas aos processos de absorção do fármaco no lúmen intestinal, estabilidade frente ao metabolismo hepático, distribuição entre os diferentes tecidos e consequente alcance ao alvo terapêutico, e excreção do fármaco e de seus metabólitos (ALQAHTANI, 2017).

Os modelos de estudos computacionais ganharam destaque nessa área com o avanço da tecnologia e, atualmente, são disponibilizados por inúmeras plataformas *online*, o que resulta em um grande progresso para a química medicinal (ALQAHTANI, 2017; PAPPALARDO et al., 2019). Assim, a partir da estrutura química de compostos promissores, uma etapa de triagem virtual com foco na avaliação de parâmetros farmacocinéticos pode ser útil na identificação de pontos a serem mantidos ou aprimorados no desenvolvimento de novos fármacos (ALQAHTANI, 2017; DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017; PAPPALARDO, 2019).

Nessa perspectiva, por meio da ferramenta de predição *in silico* SwissADME, a etapa inicial do presente trabalho buscou investigar as características físico-químicas e as propriedades farmacocinéticas da 4NC e do DETC. Os parâmetros estabelecidos por Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge (Tabela 1) foram utilizados para a análise da biodisponibilidade oral dos compostos.

Tabela 1 – Parâmetros estabelecidos por Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge para uma boa biodisponibilidade oral.

Características físico-químicas	Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge
Peso molecular (g/mol)	≤500	160 a 480	-----	-----	200 a 600
Ligações rotacionáveis	-----	-----	≤10	-----	≤15

Aceptores de ligação de hidrogênio	≤10	-----	≤12	-----	≤10
Doadores de ligação de hidrogênio	≤5	-----	≤12	-----	≤5
TPSA (Å²)	-----	-----	≤140	≤131,6	≤150
LogP o/a calculado	≤5	-0,4 a 5,6	-----	≤5,88	≤5

Fonte: Elaborada pela Autora. Informações obtidas de Egan, et al., 2000; Ghose et al., 1998; Lipinski et al., 2001; Muegge et al., 2001; Veber et al., 2002.

As regras aplicadas para a predição de futuros fármacos com boa biodisponibilidade oral consideram que o peso molecular é um fator importante a ser ponderado, uma vez que a maioria dos fármacos administrados por essa via são transportados de forma passiva. Assim, o peso molecular pode dificultar a passagem da molécula pelas membranas biológicas. Além disso, o aumento do peso molecular pode resultar na diminuição da solubilidade, bem como na redução da concentração do futuro fármaco no epitélio intestinal e, conseqüentemente, prejudicar a absorção do mesmo (DI; KERNS, 2015; RODRIGUES et al., 2021). Seguindo esse raciocínio, a solubilidade em água é importante não apenas para a absorção do fármaco, mas também na etapa de formulação e manipulação, que antecedem a sua administração, bem como para a distribuição do mesmo pelo organismo e conseqüente alcance ao alvo terapêutico (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017; RODRIGUES et al., 2021).

Adicionalmente, as ligações de hidrogênio são interações intermoleculares que também merecem atenção no processo de desenvolvimento de novos fármacos. Essas interações podem participar do processo de ligação do futuro fármaco com resíduos de aminoácidos do sítio ativo, sendo consideradas interações flexíveis e dinâmicas. Contudo, um número excessivo de doadores e aceptores de ligação de hidrogênio pode prejudicar a permeabilidade dos fármacos a serem desenvolvidos pelas membranas biológicas (FOKOUE et al., 2020; RODRIGUES et al., 2021).

Outro parâmetro importante na pesquisa e desenvolvimento de fármacos é a TPSA, a qual está diretamente associada à capacidade de formação das ligações de hidrogênio. Uma TPSA reduzida está relacionada a uma melhor absorção do candidato a fármaco, pois a dessolvatação de grupos polares é necessária para a permeação de membranas celulares (RODRIGUES et al., 2021; MULLER et al., 2022). Da mesma forma, a lipofilicidade (avaliada por meio do Log P o/a) também é considerada um parâmetro fundamental a ser avaliado, tendo em vista a necessidade de um equilíbrio hidrofílico-lipofílico para condições ideais de absorção

e distribuição do fármaco a ser desenvolvido (BARREIRO; FRAGA, 2015; DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017; RODRIGUES et al., 2021).

Com relação às ligações rotacionáveis, a sua presença na estrutura química resulta em conformações significativamente diferentes dos compostos. Por esse motivo, um pequeno número de ligações rotacionáveis é ideal para garantir a estabilidade conformacional da molécula e a passagem da mesma pelas membranas biológicas (HOU et al., 2013; RODRIGUES et al., 2021).

Os resultados obtidos para os compostos 4NC e DETC, em relação aos parâmetros descritos acima, estão apresentados no Quadro 2.

Quadro 2 – Predição *in silico* das características físico-químicas e propriedades farmacocinéticas dos compostos 4NC e DETC.

Características físico-químicas	4NC	DETC
Fórmula	C ₁₅ H ₁₁ NO ₃	C ₅ H ₁₆ NNaO ₃ S ₂
Peso molecular	253,25 g/mol	225,31 g/mol
Ligações rotacionáveis	4	3
Aceptores de ligação de hidrogênio	3	3
Doadores de ligação de hidrogênio	0	3
Área de superfície polar topológica (TPSA)	62,89 Å ²	63,02 Å ²
LogP o/a calculado	2,67	0,83
Solubilidade em água	Moderadamente solúvel	Solúvel
Propriedades farmacocinéticas	4NC	DETC
Absorção gastrointestinal	Alta	Alta
Permeável à BHE	Sim	Sim
Substrato da P-gp	Não	Sim
Inibidor da CYP1A2	Sim	Não
Inibidor da CYP2C19	Sim	Não
Inibidor da CYP2C9	Não	Não
Inibidor da CYP2D6	Não	Não
Inibidor da CYP3A4	Não	Sim
Escore de biodisponibilidade	0.55	0.55

Fonte: Elaborada pela Autora. Informações obtidas em: www.swissadme.ch.

Pode-se observar no Quadros 2 que as propriedades físico-químicas da 4NC se encontram dentro dos parâmetros estabelecidos por Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge (Tabela 1), para uma boa biodisponibilidade oral. Além disso, os resultados obtidos com a predição *in silico* sugerem que esse composto é moderadamente solúvel em água e apontam a possibilidade de uma alta absorção gastrointestinal da 4NC. Além disso, de acordo com a triagem computacional, esse composto apresenta um escore de biodisponibilidade de 0,55.

Em relação à análise das características físico-químicas do DETC (Quadro 2), é possível verificar que esse composto também exibe parâmetros adequados às regras de Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge (Tabela 1). Ademais, a análise computacional sugere que o DETC é solúvel em água e aponta a possibilidade de uma alta absorção gastrointestinal desse composto. Assim como a 4NC, o DETC apresenta um escore de biodisponibilidade de 0,55.

Dessa forma, tendo em vista os intervalos de referência considerados ideais para uma boa biodisponibilidade oral (Tabela 1), o conjunto de resultados obtidos a partir dos estudos computacionais aponta que tanto a 4NC quanto o DETC apresentam características físico-químicas compatíveis com a sua administração por essa via.

Contudo, sabe-se que a administração oral de fármacos sofre influência de processos metabólicos, nos quais diversas reações enzimáticas podem interferir na sua atividade biológica (BRAZ et al., 2018; DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Dessa forma, tendo em vista que a grande maioria dos xenobióticos são metabolizados no fígado por meio do CYP, no presente trabalho também foi avaliado a possível interação dos compostos com isoenzimas do CYP.

Os dados apresentados no Quadro 2 sugerem que a 4NC possui capacidade de inibir a CYP1A2 e a CYP2C19, assim como indicam a possibilidade de o DETC inibir a isoenzima CYP3A4. De acordo com a literatura, a classe dos ditiocarbamatos é conhecida por serem inibidores seletivos fracos tanto da CYP3A4 quanto de outras isoformas como a CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8 e CYP2E1 (HAKKOLA et al., 2020; PRATT-HYATT et al., 2010). Com relação a 4NC, não foram identificados estudos prévios avaliando o seu efeito sobre o CYP.

Sabe-se que a inibição significativa das isoenzimas da superfamília do CYP pode levar a interações medicamentosas relacionadas à farmacocinética e resultar em efeitos adversos e/ou toxicidade para os pacientes (BRAZ et al., 2018; CHENG; FRISHMAN; ARONOW, 2009; MANIKANDAN; NAGINI, 2018; WARING, 2019). Dessa forma, os resultados obtidos para a 4NC e o DETC merecem estudos complementares e mais aprofundados, no entanto não inviabilizam a continuidade da investigação desses compostos como futuros fármacos, pois alguns medicamentos atualmente disponíveis no arsenal terapêutico, para diferentes condições clínicas, também são inibidores de isoenzimas do CYP, como omeprazol (inibidor de CYP2C19), ciclosporina (inibidor de CYP3A4), paroxetina (inibidor de CYP2D6), fluconazol (inibidor de CYP2C9), carbamazepina (inibidor CYP1A2) e outros (BRAZ et al., 2018).

Outros parâmetros farmacocinéticos importantes a serem considerados no desenvolvimento de novos fármacos são a capacidade de determinado composto em permear a BHE e a possibilidade de que o mesmo seja substrato da P-gp. A BHE é uma barreira de alta seletividade que protege o SNC de substâncias que podem ser potencialmente neurotóxicas. Já a P-gp é uma proteína transportadora transmembrana que funciona como uma bomba de efluxo contra alguns fármacos, toxinas e xenobióticos, prevenindo o acúmulo intracelular dessas substâncias, a qual está presente em diversos tecidos orgânicos, incluindo a BHE (DING et al, 2019; MUKHAMETOV; RAEVSKY, 2017).

Os resultados da predição *in silico* apontam a possibilidade de o DETC permear a BHE e de que o mesmo seja substrato da P-gp. Já em relação à 4NC, o estudo computacional sugere que esse composto apresenta capacidade para permear a BHE e, ao contrário do DETC, não foi indicada a possibilidade de que seja substrato da P-gp. Dependendo do ponto de vista, esses resultados podem ser interpretados de duas formas diferentes. A capacidade de ambos os compostos estudados neste trabalho permearem a BHE parece ser, inicialmente, uma característica indesejada quando se pensa na possibilidade de neurotoxicidade. Diferentemente da 4NC, o DETC poderia ter o risco de neurotoxicidade atenuado devido a possibilidade desse composto ser substrato para a P-gp. Porém, ao olhar sob outra perspectiva e considerar as características das doenças que estão sendo propostas como alvo da 4NC e do DETC, observa-se que a capacidade dos compostos de permear a BHE pode ser uma característica favorável e importante do ponto de vista clínico para pacientes que apresentam acometimento do SNC.

Dessa forma, a predição dos parâmetros farmacocinéticos para a 4NC e para o DETC apresentados até o momento devem ser interpretados com cautela. Foram identificadas propriedades que não são consideradas ideais no desenvolvimento de novos fármacos, no entanto, isso não impossibilita a continuidade do presente estudo, tendo em vista que modificações estruturais, nanoencapsulação de moléculas bioativas e outras estratégias de otimização são amplamente utilizadas na química medicinal a fim de obter futuros fármacos com perfis farmacológicos mais favoráveis. Tais estratégias permitem eliminar/melhorar as propriedades indesejadas, mantendo a atividade biológica dos compostos em questão (AHMAD; CHOI, 2019; ANDERSON, 2003; BLASS, 2015; BATOOL; LEE; BAE, 2012).

Por fim, embora os dados apresentados nessa etapa inicial do trabalho permitam realizar uma discussão preliminar a respeito das características físico-químicas e propriedades

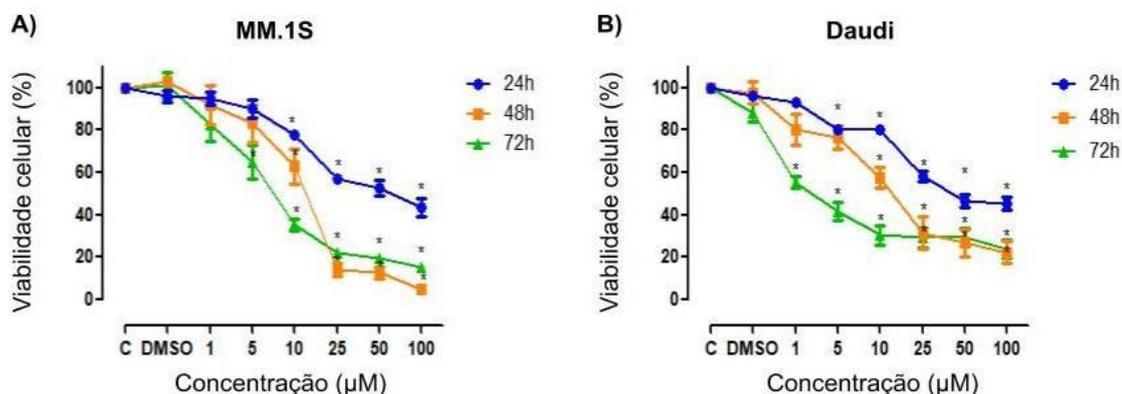
farmacocinéticas da 4NC e do DETC, ensaios experimentais são necessários para confirmar os resultados obtidos a partir desta predição *in silico*.

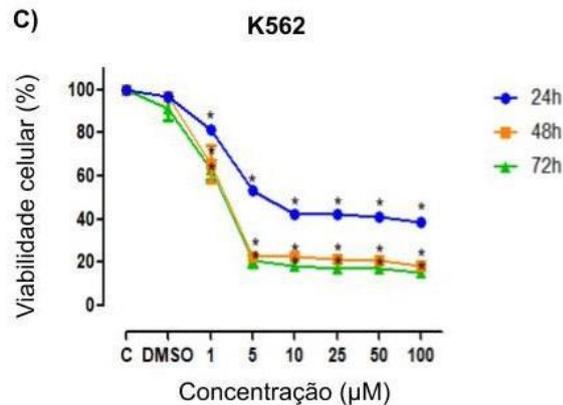
5.2 CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS 4NC E DETC SOBRE LINHAGENS CELULARES DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Embora a 4NC e o DETC sejam produtos comerciais com atividade antineoplásica já descrita na literatura (CORDEIRO et al., 2021; MAY et al, 2020; SANTOS et al., 2020), até a recente publicação do nosso grupo de pesquisa em parceria com o LCPP, sobre o efeito da 4NC em células de leucemias agudas (FEUSER et al., 2022), não havia registros na literatura acerca da atividade citotóxica desses dois compostos sobre modelos de neoplasias hematológicas, especificamente. Tendo em vista que as neoplasias hematológicas compreendem um grupo heterogêneo de doenças, as quais acometem diversos subtipos celulares e com graus variáveis de diferenciação, a parte experimental do presente trabalho teve início com a realização de curvas de concentração e tempo-resposta da 4NC e do DETC sobre linhagens celulares humanas de três neoplasias hematológicas diferentes: mieloma múltiplo (MM.1S), linfoma de Burkitt (Daudi) e LMA (K562).

Pode-se observar nas Figuras 7 e 8 que ambos os compostos reduziram significativamente a viabilidade celular de todas as linhagens investigadas, em comparação com os seus respectivos controles, de forma dependente do tempo e da concentração.

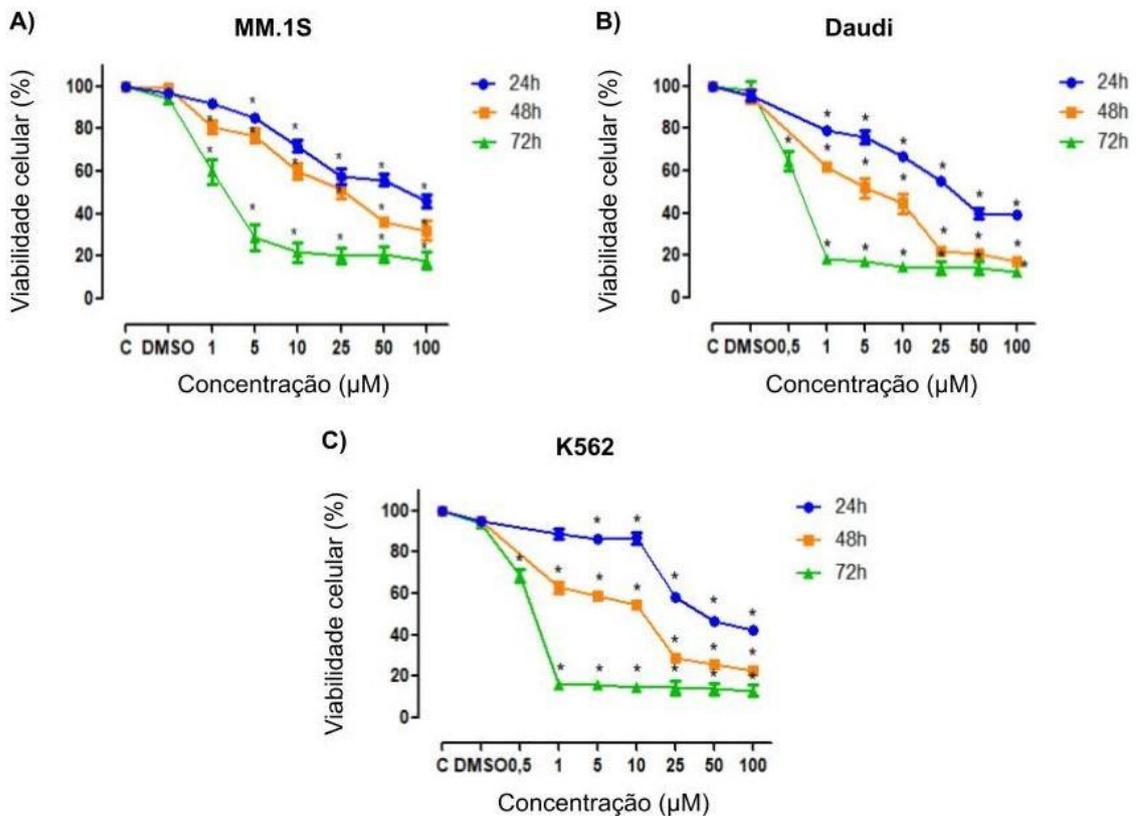
Figura 7 – Citotoxicidade da 4NC sobre linhagens celulares humanas de neoplasias hematológicas.





(A-C) Citotoxicidade do composto 4NC em concentrações crescentes, sobre células MM.1S (A), Daudi (B) e K562 (C) após 24 horas, 48 horas e 72 horas de incubação. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto da curva representa a média \pm EPM de três experimentos independentes. * Diferença significativa, $p \leq 0,05$, quando comparado ao grupo controle, ANOVA *One-way*, seguido do pós teste de Bonferroni. Fonte: A autora.

Figura 8 – Citotoxicidade do DETC sobre linhagens celulares humanas de neoplasias hematológicas.



(A-C) Citotoxicidade do composto DETC em concentrações crescentes, sobre células MM.1S (A), Daudi (B) e K562 (C) após 24 horas, 48 horas e 72 horas de incubação. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto da curva representa a média \pm EPM de três experimentos independentes. * Diferença

significativa, $p \leq 0,05$, quando comparado ao grupo controle, ANOVA *One-way*, seguido do pós teste de Bonferroni. Fonte: A autora.

Os valores de CI_{50} da 4NC e do DETC para as linhagens MM.1S, Daudi e K562, estão apresentados na Tabela 2. A partir desses resultados, é possível identificar que, de forma geral, apesar de as CI_{50} de 24 horas serem altas (com exceção da 4NC sobre células K562), após 72 horas de incubação foram obtidos valores de CI_{50} baixos, todos abaixo de $10 \mu\text{M}$.

Tabela 2 – Valores de CI_{50} calculados para 4NC e DETC após 24, 48 e 72 horas de incubação sobre as linhagens MM.1S, K562 e Daudi.

4NC			
Tempo	MM.1S (média ± EPM)	K562 (média ± EPM)	Daudi (média ± EPM)
24 horas	49,56 ± 1,15 μM	7,48 ± 0,50 μM	45,61 ± 1,37 μM
48 horas	11,51 ± 0,81 μM	2,28 ± 0,52 μM	14,39 ± 0,62 μM
72 horas	7,25 ± 0,37 μM^*	2,23 ± 0,63 $\mu\text{M}^{*\#}$	3,81 ± 0,73 μM^*
DETC			
Tempo	MM.1S (média ± EPM)	K562 (média ± EPM)	Daudi (média ± EPM)
24 horas	58,85 ± 2,12 μM	43,33 ± 1,14 μM	25,76 ± 1,27 μM
48 horas	23,72 ± 0,97 μM	10,06 ± 0,72 μM	5,80 ± 0,74 μM
72 horas	2,44 ± 0,54 μM^*	0,69 ± 0,16 μM^*	0,64 ± 0,13 μM^*

*Diferença significativa quando comparado às respectivas CI_{50} de 24 horas, $p \leq 0,05$, teste *t* de Student.

#Diferença significativa quando comparado à CI_{50} de 72 horas da linhagem celular MM.1S, $p \leq 0,05$, teste *t* de Student. Fonte: Elaborada pela Autora.

Em uma análise comparativa entre as CI_{50} de 72 horas, verificou-se que a citotoxicidade do DETC foi semelhante para as três linhagens celulares investigadas. Em relação ao composto 4NC, esse foi mais efetivo em induzir a morte em células de LMA (K562), em relação à linhagem de mieloma múltiplo, porém o mesmo não foi observado quando comparado com as células de linfoma de burkitt (Tabela 2). Considerando que a K562 é uma linhagem neoplásica de células mielóides imaturas, e que a MM.1S e a Daudi são linhagens neoplásicas de células linfóides B maduras, os dados comparativos obtidos para a 4NC não permitem fazer uma correlação entre a citotoxicidade desse composto e a origem das células acometidas pela transformação neoplásica (linfóide ou mielóide), bem como em relação ao estágio de diferenciação celular.

Tendo em vista que os protocolos de tratamento para mieloma múltiplo, linfoma de Burkitt e LMA são baseados em ciclos de quimioterapia que duram vários dias (ACS, 2023; NICE, 2016; NICE, 2021), possivelmente os dados obtidos a partir do tratamento das células por 72 horas são aqueles que mais se assemelham a uma aplicabilidade terapêutica. Esses resultados, extrapolados para uma realidade clínica, sugerem que baixas concentrações dos compostos 4NC e DETC já seriam eficazes na indução da remissão das doenças em questão. No entanto, afirmações a esse respeito só podem ser discutidas após a realização de ensaios clínicos, nos quais seriam consideradas as características clínicas dos pacientes.

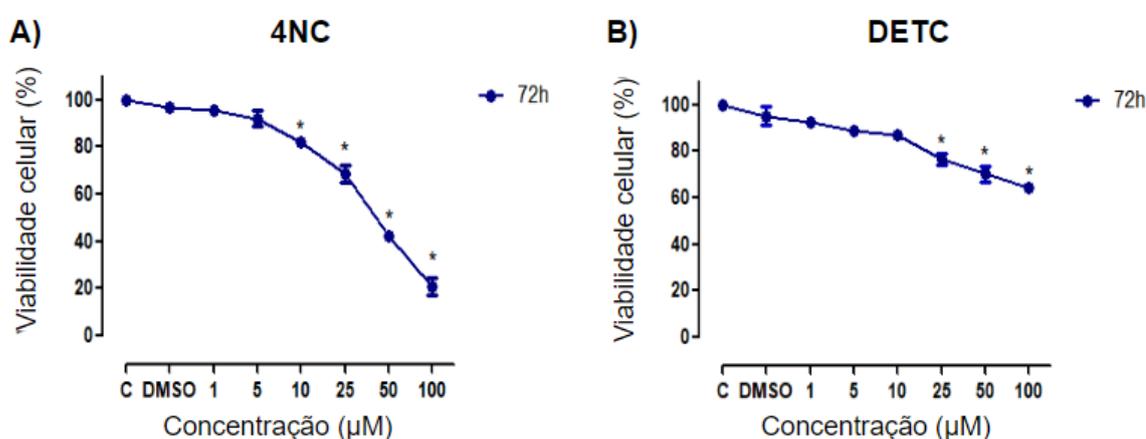
Resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo foram relatados por Maioral et al. (2020), que demonstraram o efeito citotóxico de duas chalconas sintéticas inéditas sobre uma grande variedade de modelos de neoplasias malignas, dentre eles as linhagens celulares K562 e MM.1S, com CI_{50} de 72 horas de $3,2 \pm 0,5 \mu\text{M}$ e $3,9 \pm 0,6 \mu\text{M}$ para células K562, e $6,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$ e $9,8 \pm 1,4 \mu\text{M}$ para MM.1S. Outro estudo, conduzido por Jacques et al. (2021), reportou a atividade citotóxica promissora de três chalconas sintéticas sobre a linhagem celular K562, com CI_{50} de 72 horas que variaram entre $1,03 \pm 6,26 \mu\text{M}$ e $6,60 \pm 0,24 \mu\text{M}$. Vitorovic-Todorovic et al. (2013) também investigaram o efeito citotóxico de uma série de derivados sintéticos de chalconas sobre células K562 e reportaram resultados de CI_{50} de 72 horas majoritariamente $< 2 \mu\text{M}$, o que está de acordo com os resultados apresentados neste trabalho. Até o momento não foram encontrados estudos que avaliaram o efeito de chalconas e seus derivados sobre linhagens celulares humanas de linfoma de Burkitt.

Em relação ao DETC, o único estudo encontrado na literatura que avaliou o efeito de um composto da classe dos ditioicarbamatos sobre uma linhagem de neoplasia hematológica, relatou o oposto dos resultados obtidos neste trabalho. Kanno et al. (2003) reportaram uma possível inatividade de um dietilditioicarbamato sobre células K562, com um valor de concentração efetiva 50% (EC_{50} , do inglês *50% effective concentration*) de $3.133,3 \pm 469,9 \mu\text{M}$, após 24 horas de tratamento. O estudo em questão não apresentou resultados que possibilitassem uma discussão da relação estrutura atividade comparativa com o DETC, que pudesse justificar a diferença de citotoxicidade identificada.

5.3 SELETIVIDADE DA 4NC E DO DETC PARA AS LINHAGENS CELULARES DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

As curvas de concentração-resposta apresentadas na Figura 9 mostram que após 72 horas de incubação, a 4NC e o DETC foram significativamente citotóxicos para as células HS-5 a partir das concentrações de 10 μM e 25 μM , respectivamente. Após esse tempo de tratamento, as CI_{50} obtidas foram $40,11 \pm 0,72 \mu\text{M}$ para a 4NC, e $>100 \mu\text{M}$ para DETC.

Figura 9 – Citotoxicidade dos compostos 4NC e DETC sobre linhagem celular humana de estroma de medula óssea (HS-5).



(A-B) Citotoxicidade dos compostos 4NC (A) e DETC (B) em concentrações crescentes (1-100 μM), sobre células HS-5 após 72 horas de incubação. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto da curva representa a média \pm EPM de três experimentos independentes. * Diferença significativa, $p \leq 0,05$, quando comparado ao grupo controle, ANOVA *One-way*, seguido do pós teste de Bonferroni. Fonte: A autora.

O IS foi calculado a fim de avaliar quantas vezes os compostos investigados são seletivos para as linhagens celulares de neoplasias hematológicas, em relação às células não neoplásicas presentes no microambiente da medula óssea (HS-5). Pode-se observar na Tabela 3 que a 4NC apresentou baixa seletividade para a linhagem de mieloma múltiplo (MM.1S) e alta seletividade para as células K562 e Daudi. Já o DETC demonstrou alta seletividade para as células MM.1S, porém o IS para K562 e Daudi não pôde ser calculado, pois a CI_{50} para as células não neoplásicas (HS-5) foi maior do que a concentração máxima testada na curva concentração-resposta. Dessa forma, pode-se afirmar apenas que, se a CI_{50} do DETC para as células HS-5 fosse 100 μM , o IS seria >100 para K562 e para Daudi, sugerindo uma alta seletividade do DETC para essas linhagens celulares neoplásicas também.

Tabela 3 – IS dos compostos 4NC e DETC para as células de neoplasias hematológicas.

Compostos	IS MM.1S (72 horas)	IS K562 (72 horas)	IS Daudi (72 horas)
4NC	5,38	17,98	10,52
DETC	52,09	NC	NC

NC: Não é calculável. Baixa seletividade: ≤ 5 ; moderada seletividade: 6 – 9; alta seletividade: ≥ 10 .

Fonte: Elaborada pela Autora.

As células estromais presentes no microambiente da medula óssea secretam citocinas que são importantes para os processos de proliferação, diferenciação e maturação celular na hematopoiese. Assim, a influência do componente estromal no desenvolvimento e manutenção de neoplasias hematológicas vem despertando o interesse dos pesquisadores na área da onco-hematologia (BOTTCHEER et al., 2022; LEE et al., 2008; ZIEGLER et al., 2016).

Estudos recentes demonstram que células do estroma da medula óssea dão suporte à sobrevivência de células leucêmicas, bem como células de outras neoplasias hematológicas, e conferem quimiorresistência à essas células (BAR-NATAN et al., 2017; BOTTCHEER et al., 2022; MANGOLINI; RINGSHAUSEN, 2020). Assim, ao considerar o cenário neoplásico, o desenvolvimento de novos quimioterápicos que apresentem atividade citotóxica também sobre o componente estromal parece ser uma estratégia interessante, à primeira vista. Contudo, é importante ponderar que, embora a indução das células estromais à morte possa contribuir para o sucesso da quimioterapia, essa estratégia pode apresentar consequências graves sobre a hematopoiese normal (células não neoplásicas), resultando até mesmo em aplasia de medula.

Nesse contexto, os resultados obtidos para a 4NC e o DETC são promissores, pois indicam que, após 72 horas de incubação, a CI_{50} dos compostos para as linhagens celulares neoplásicas investigadas é menor do que a concentração que começa a ser citotóxica para as células do estroma de medula óssea. Assim, extrapolando para uma perspectiva clínica, os resultados sugerem que a 4NC e o DETC podem ser efetivos para as doenças investigadas, sem a necessidade de causar danos às células estromais não neoplásicas presentes no microambiente tumoral, o que pode implicar na redução de efeitos adversos para os pacientes, e, dessa forma, aumentar a adesão e melhorar a resposta ao tratamento, bem como a qualidade de vida dos mesmos.

Na literatura, não foram encontrados estudos que avaliaram o efeito de compostos da classe das chalconas e/ou da classe dos ditio-carbamatos sobre a linhagem celular HS-5, para fazer uma análise comparativa com os resultados deste trabalho. No entanto, um estudo

interessante foi identificado, o qual avaliou o efeito citotóxico de quimioterápicos já utilizados na clínica para o tratamento de algumas neoplasias hematológicas. Lee et al (2008) demonstrou que a DL₅₀ de 48 horas da citarabina, vincristina, daunorrubicina e doxorubicina sobre a linhagem celular HS-5 foi de 1,0 µM, 0,01 µM, 0,1 µM e 0,2 µM, respectivamente. Nesse mesmo estudo, verificou-se que, *in vivo*, os fármacos supracitados apresentaram um efeito supressor da hematopoiese, o que condiz com os seus perfis de efeitos adversos observados na clínica.

5.4 POTENCIAL HEMOLÍTICO DA 4NC E DO DETC

Ainda com a finalidade de investigar o efeito da 4NC e do DETC sobre células não neoplásicas, foi realizado o ensaio de hemólise para avaliar a biocompatibilidade desses compostos com os eritrócitos isolados do SP de indivíduos autodeclarados saudáveis.

Conforme apresentado na Tabela 4, o composto 4NC induziu hemólise significativa a partir da concentração de 148,68 µM, o que corresponde a concentração de três vezes a CI₅₀ de 24 horas para a linhagem celular mais resistente à 4NC (MM.1S). Já em relação ao DETC, o composto apresentou atividade hemolítica significativa somente a partir da concentração de 1.117,00 µM, que corresponde a 20 vezes a CI₅₀ de 24 horas para as células MM.1S.

Tabela 4 – Hemólise induzida por 4NC e DETC em eritrócitos humanos.

4NC		
Concentração		Taxa de hemólise Média ± EPM
1x CI ₅₀	49,56 µM	1,66 ± 1,3
2x CI ₅₀	99,12 µM	2,62 ± 0,9
3x CI ₅₀	148,68 µM	14,89 ± 1,0 *
DETC		
Concentração		Taxa de hemólise
1x CI ₅₀	58,85 µM	0,30 ± 0,2
2x CI ₅₀	117,70 µM	0,35 ± 0,1
3x CI ₅₀	176,55 µM	0,64 ± 0,2
10x CI ₅₀	588,50 µM	1,64 ± 0,4
15x CI ₅₀	882,75 µM	2,43 ± 1,3
20x CI ₅₀	1.177,00 µM	3,18 ± 1,0*

*Diferença significativa quando comparado ao grupo controle negativo, $p \leq 0,05$, teste *t* de Student.

Fonte: Elaborada pela Autora.

O ensaio de hemólise auxilia na avaliação da biocompatibilidade sistêmica de futuros fármacos. Compostos que apresentam atividade hemolítica comprometem a homeostase sanguínea e, independentemente de sua potencial atividade biológica, tem o seu uso terapêutico invalidado (HARPE et al., 2019; MOCAN, 2010; POPESCU et al., 2017). Os resultados apresentados neste trabalho são importantes do ponto de vista clínico, pois sugerem uma segurança na administração de altas concentrações da 4NC e do DETC pela via endovenosa, e indicam aproximadamente até onde chega a biocompatibilidade desses compostos com os eritrócitos humanos.

A baixa atividade hemolítica das chalconas vem sendo reportada na literatura há anos. Saxena et al. (2010) demonstraram que seis chalconas com atividade antineoplásica não foram citotóxicas para os eritrócitos humanos, de acordo com a análise da taxa de hemólise e da fragilidade osmótica dos eritrócitos. De forma semelhante, Sashidhara et al. (2015) publicaram um estudo acerca do efeito antibacteriano de uma chalcona híbrida e reportaram que a mesma não apresentou atividade hemolítica sobre eritrócitos humanos, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Mais recentemente Maioral et al. (2020) e Jacques et al. (2021) avaliaram a citotoxicidade de chalconas sintéticas inéditas sobre células não neoplásicas e, em concordância com os outros estudos supracitados e com os resultados obtidos neste trabalho, revelaram que as chalconas investigadas não apresentaram hemólise significativa sobre as hemácias do SP de voluntários saudáveis, mesmo na concentração de duas vezes a CI_{50} de 24 horas obtidas para as células neoplásicas.

Com relação à classe dos ditiocarbamatos, ao contrário dos resultados obtidos para o DETC no ensaio de hemólise, foram encontrados estudos antigos que demonstraram a atividade hemolítica do ácido dietilditiocarbâmico (ÀGAR; MAHONEY JR; EATON, 1991) e de complexos contendo dietilditiocarbamatos (GINSBURG et al., 1999; LAURIAULT; O'BRIEN, 1991), no entanto, estudos atuais avaliando o efeito hemolítico dos dietilditiocarbamatos isoladamente, que fossem comparáveis com os dados apresentados neste trabalho, não foram identificados na literatura.

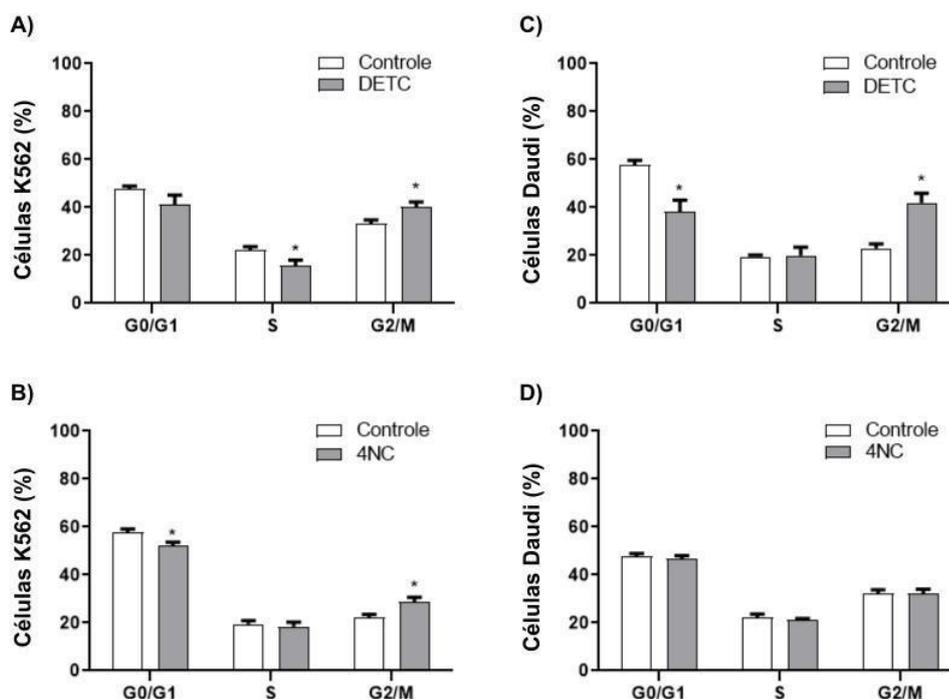
5.5 EFEITO DA 4NC E DO DETC SOBRE O CICLO CELULAR DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS

A investigação dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade dos compostos 4NC e DETC foi realizada somente com as duas linhagens celulares mais sensíveis a esses compostos, ou seja, com a K562 e a Daudi.

Com relação ao efeito da 4NC e do DETC sobre o ciclo celular, os resultados mostram que, quando comparado aos respectivos grupos controle, houve um aumento significativo na porcentagem de células K562 e Daudi na fase Sub G0/G1 após tratamento com ambos os compostos (K562: 39,2% para DETC e 47,8% para 4NC; Daudi: 45,3% para o DETC e 35,4% para 4NC). Isso comprova a morte celular induzida pelo efeito citotóxico da 4NC e do DETC nessas linhagens.

Conforme demonstrado na Figura 10, o composto DETC diminuiu significativamente a proporção de células K562 e Daudi nas fases S e G0/G1, respectivamente (K562: 30,0%; Daudi: 33,8%), e aumentou de forma significativa a proporção de ambas as linhagens celulares na fase G2/M (K562: 21,5%; Daudi: 82,6%). Esse conjunto de resultados demonstra a capacidade do DETC em induzir um bloqueio do ciclo celular em G2/M, tanto em células K562 quanto em células Daudi.

Figura 10 – Efeito da 4NC e do DETC sobre o ciclo celular das linhagens K562 e Daudi.



Fases do ciclo celular das linhagens K562 e Daudi (1×10^6 cél/poço) após incubação com os compostos DETC

(A e C) e 4NC (B e D) nas respectivas CI_{50} de 24 horas por 18 horas, avaliadas por citometria de fluxo e comparadas aos respectivos grupos controles (células não incubadas com os compostos) na mesma fase do ciclo.

Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa, $p \leq 0,05$, quando comparado ao grupo controle, ANOVA *One-way*, seguido do pós teste de Bonferroni. Fonte: A autora.

No que se refere ao efeito da 4NC sobre o ciclo das células Daudi, observa-se que não houve diferença entre os grupos comparados (células incubadas com o composto e as células sem tratamento) (Figura 10). Esse resultado sugere que a citotoxicidade da 4NC sobre essa linhagem celular ocorre por meio de outros mecanismos, sem envolver o bloqueio do ciclo celular. Já em relação a linhagem K562, é possível identificar que a exposição à 4NC resultou em uma diminuição significativa da proporção de células na fase G0/G1 (9,62%) e um aumento significativo da proporção de células em G2/M (22,28%), o que sugere um bloqueio nessa fase do ciclo celular.

De forma geral, os registros na literatura são heterogêneos e demonstram o potencial das chalconas em induzir um bloqueio em diferentes fases do ciclo celular. Contudo, na análise do efeito dessa classe de compostos sobre células K562, a grande maioria dos estudos indicam bloqueio na fase G2/M (JI et al., 2013; LIU et al., 2019; MAIORAL et al., 2013; MOURA et al., 2021; TAKAC et al., 2018; ZHANG et al., 2018), o que está em acordo com os resultados obtidos neste trabalho. Já em relação a 4NC sobre as células Daudi, não foram encontrados estudos que avaliaram o efeito de chalconas e/ou seus derivados sobre linhagens celulares humanas de linfoma de burkitt para fins de comparação.

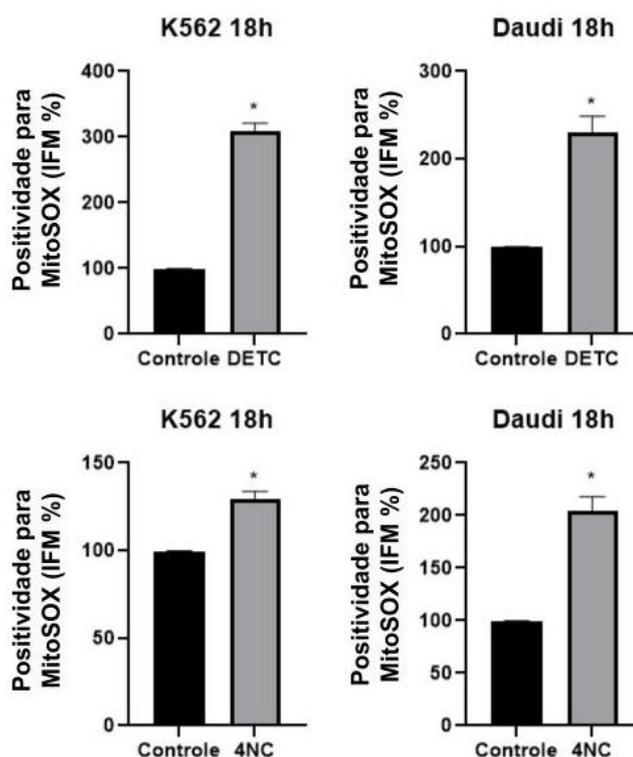
Quanto à classe dos ditiocarbamatos, os resultados encontrados para o DETC neste trabalho, com ambas as linhagens celulares investigadas, concordam com o estudo conduzido por Viola-Rhenals et al., (2007), no qual foi demonstrado que o efeito citotóxico do dietilditiocarbamato de cobre sobre linhagens de melanoma e adenocarcinoma de mama envolve o bloqueio do ciclo celular na fase G2, com uma diminuição na porcentagem de células na fase G1. O mesmo foi observado por Hadizadeh et al., (2014) ao analisar o efeito de um complexo de paládio, derivado do dietilditiocarbamato, sobre uma linhagem celular de carcinoma de células escamosas esofágicas. Além disso, de forma semelhante, Ishak et al., (2018) relataram que dois compostos derivados do dietilditiocarbamato de bismuto induzem bloqueio nas fases S e G2/M do ciclo de células HepG2 (carcinoma hepatocelular). Contudo, não foram identificados outros estudos na literatura que avaliaram o efeito de compostos da classe dos ditiocarbamatos sobre o ciclo celular das linhagens K562 e Daudi, especificamente.

5.6 MECANISMO DE MORTE CELULAR INDUZIDO PELA 4NC E PELO DETC

Tendo em vista que o desequilíbrio no metabolismo oxidativo das células pode influenciar diretamente nos mecanismos de morte celular (GALLUZZI et al., 2018; MOLONEY; COTTER, 2017), buscou-se avaliar se o efeito citotóxico da 4NC e do DETC envolve a produção de EROs.

Conforme observado na Figura 11, a exposição das células K562 e Daudi à ambos os compostos resultou em um aumento significativo na marcação com o corante *MitoSOX Red* (K562: 209,3% para DETC e 29,2% para 4NC; Daudi: 129,9% para DETC e 109,9% para 4NC) em relação ao controle, ou seja, células não tratadas, o que reflete um aumento significativo na produção de EROs pelos compostos investigados.

Figura 11 – Efeito da 4NC e do DETC sobre a produção de EROs.



Porcentagem de células K562 e Daudi (1×10^6 cél/poço) positivas para a marcação com o corante *MitoSOX Red*, após 18 horas de incubação com os compostos 4NC e DETC nas respectivas CI_{50} de 24 horas, avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes.

*Diferença significativa, $p \leq 0,05$, quando comparado ao grupo controle, teste *t* de Student. Fonte: A autora.

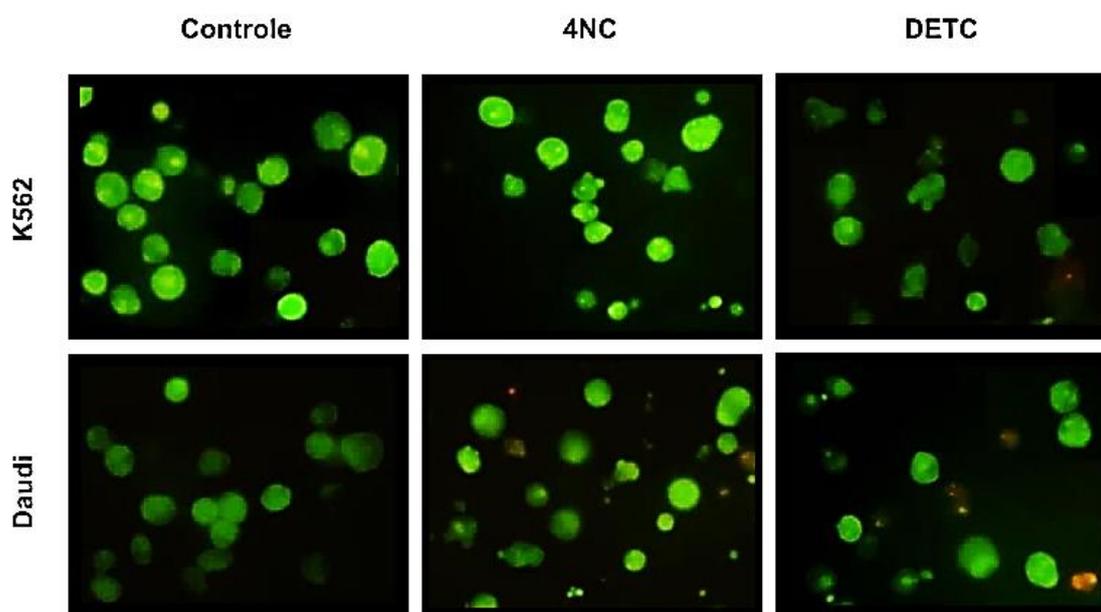
Esses resultados, em conjunto com as análises do ciclo celular, sugerem que a sobrecarga de EROs pode estar relacionada com o bloqueio no ciclo das células de LMA (K562)

incubadas com DETC e 4NC, e das células de linfoma de Burkitt (Daudi) incubadas com o DETC.

Já com relação a linhagem celular Daudi incubada com a 4NC, observa-se que, embora o aumento da produção de EROs seja significativo em relação às células sem tratamento, esse aumento foi menos expressivo do que em células K562. Ao analisar juntamente com os resultados do ciclo celular, observa-se que a sobrecarga de EROs resultante do tratamento das células Daudi com esse composto não foi suficiente para induzir um bloqueio no ciclo das células de linfoma de Burkitt.

Na sequência, foi analisado se o mecanismo de citotoxicidade desses compostos envolve a indução da morte celular por apoptose. Como pode ser observado na Figura 12, as células K562 e Daudi incubadas com o composto 4NC apresentaram alterações morfológicas características de apoptose, como a diminuição do volume celular, condensação da cromatina, formação de prolongamentos citoplasmáticos (denominados de “*blebs*”) e, na linhagem celular Daudi, também foram identificadas algumas células com perda da integridade da membrana plasmática.

Figura 12 – Morfologia das células K562 e Daudi incubadas com 4NC e DETC.



Morfologia das células K562 e Daudi (1×10^6 cél/poço) após 18 horas de incubação com os compostos 4NC e DETC nas respectivas CI_{50} de 24 horas, visualizadas por microscopia de fluorescência (aumento de 400x) com a marcação dos corantes BE e LA. Os grupos controles correspondem às células não incubadas com os compostos.

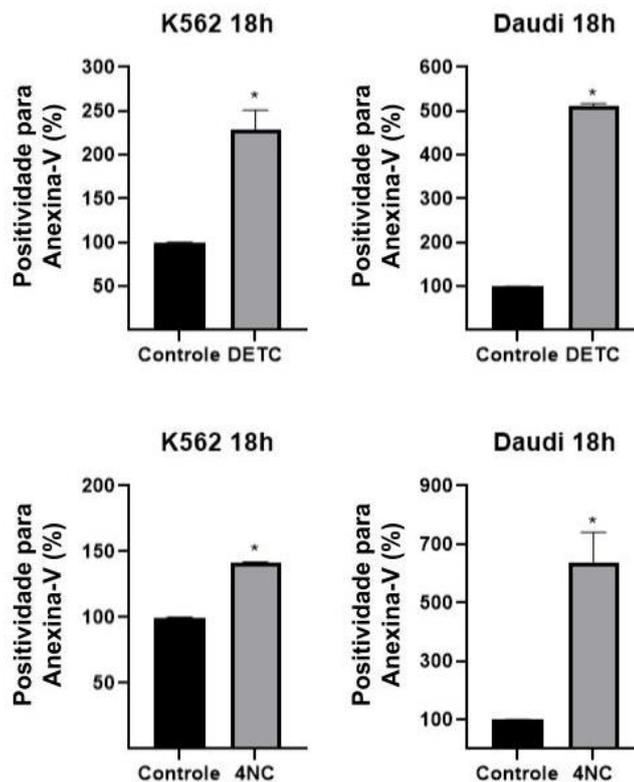
As imagens correspondem a campos representativos digitalizados com câmera do telefone celular.

Fonte: A Autora.

Essas mesmas características morfológicas também ficaram evidentes nas células K562 após a incubação com o DETC por 18 horas. No entanto, em relação à linhagem Daudi, o padrão morfológico das células incubadas com esse composto foi um pouco diferente. A diminuição do volume celular e a condensação da cromatina foram características dominantes e, além disso, foram observadas muitas células com perda da integridade da membrana plasmática. Além disso, não foram identificadas células Daudi apresentando “*blebs*” após a incubação com DETC.

Em seguida, a análise da exposição dos resíduos de fosfatidilserina foi realizada para avaliar, sob outra perspectiva, o possível envolvimento da apoptose na citotoxicidade dos compostos. A Figura 13 demonstra que o efeito tanto da 4NC quanto do DETC resultaram em um aumento significativo na proporção de células K562 e Daudi com exposição dos resíduos de fosfatidilserina (proporção de células positivas para anexina-V).

Figura 13 – Efeito da 4NC e do DETC sobre a exposição dos resíduos de fosfatidilserina em células K562 e Daudi.

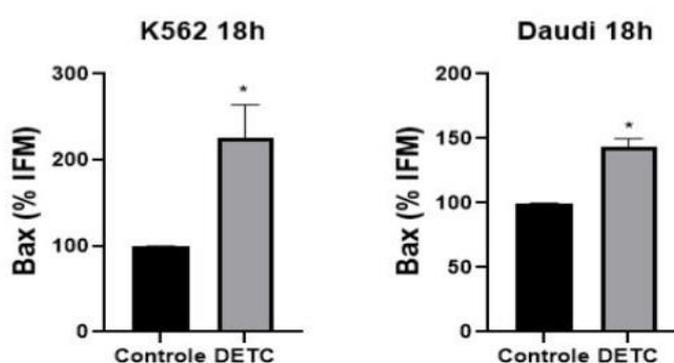


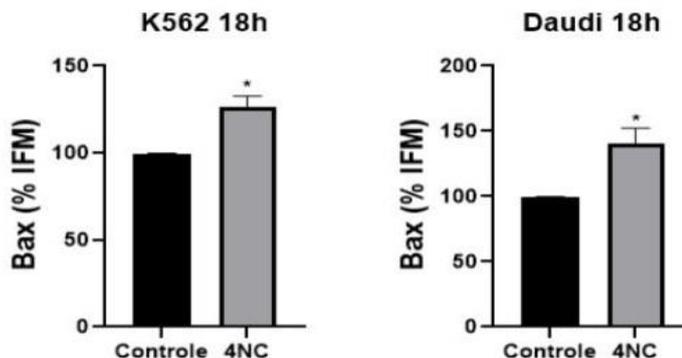
Exposição dos resíduos de fosfatidilserina determinado pela marcação com Anexina-V-FITC em células K562 e Daudi (1×10^6 cél/poço), após 18 horas de incubação com os compostos 4NC e DETC nas respectivas CI_{50} de 24 horas, avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa, $p \leq 0,05$, quando comparado ao grupo controle, teste *t* de Student. Fonte: A autora.

Esses resultados reforçam os achados morfológicos sugestivos de apoptose, contudo, a fim de confirmar a indução desse mecanismo de morte celular pelos compostos, foi realizada a avaliação da expressão de proteínas pró e antiapoptóticas, incluindo a caspase-3 ativada (efetora da apoptose), e do receptor de morte celular FasR, após o tratamento das células Daudi e K562 com a 4NC e o DETC.

Nessa perspectiva, primeiramente foi realizada a avaliação da expressão de proteínas relacionadas à via de sinalização da apoptose intrínseca. Pode-se observar nas Figura 14 e 15 que a incubação das células neoplásicas com ambos os compostos resultou em um aumento significativo na expressão da proteína pró-apoptótica Bax, e uma redução significativa na expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 em células K562 e Daudi incubadas com a 4NC. Já as células Daudi incubadas com o DETC apresentaram um aumento significativo na expressão de Bcl-2, enquanto que em células K562 incubadas com o DETC não houve diferença significativa na expressão dessa proteína, em relação às células sem tratamento.

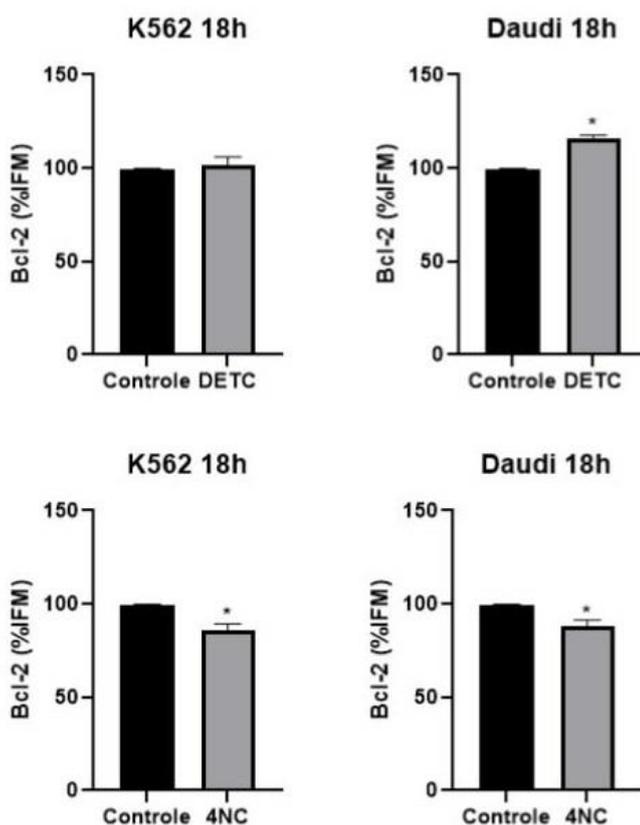
Figura 14 – Expressão da proteína pró-apoptótica Bax em células K562 e Daudi incubadas com 4NC e DETC.





Expressão da proteína Bax em células K562 e Daudi (1×10^6 cél/poço), após 18 horas de incubação com os compostos 4NC e DETC nas respectivas CI_{50} de 24 horas, avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa, $p \leq 0,05$, quando comparado ao grupo controle, teste *t* de Student. Fonte: A autora.

Figura 15 – Expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 em células K562 e Daudi incubadas com 4NC e DETC.



Expressão da proteína Bcl-2 em células K562 e Daudi (1×10^6 cél/poço), após 18 horas de incubação com os compostos 4NC e DETC nas respectivas CI_{50} de 24 horas, avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa, $p \leq 0,05$, quando comparado ao grupo controle, teste *t* de Student. Fonte: A autora.

Em conjunto, os resultados mostram que a incubação das células neoplásicas K562 e Daudi com ambos os compostos resultou em uma predominância na expressão de Bax em relação a Bcl-2 (Tabela 5).

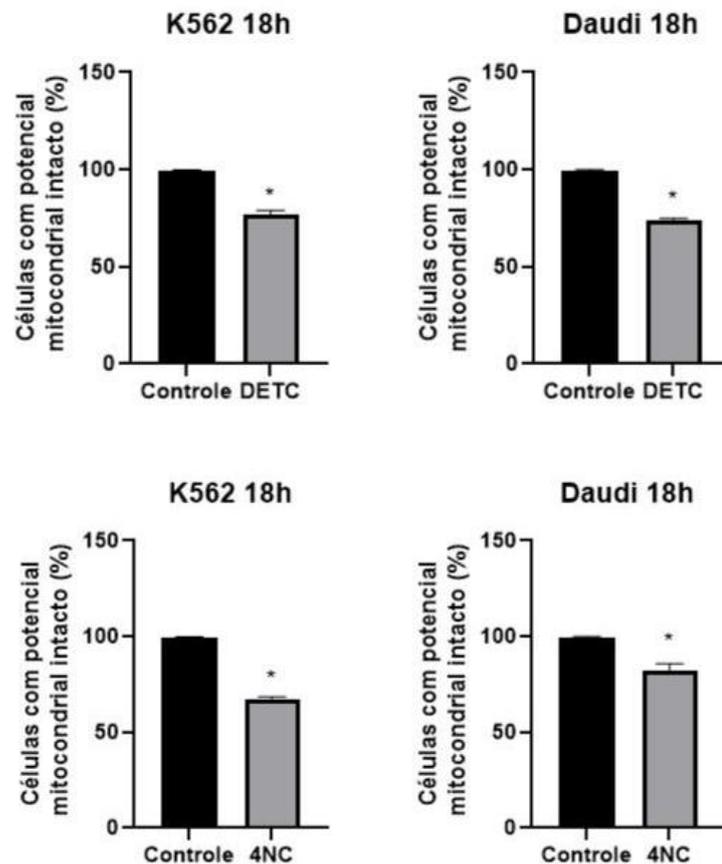
Tabela 5 – Razão entre a expressão da proteína Bcl-2 e a proteína Bax em células K562 e Daudi incubadas com os compostos 4NC e DETC.

K562			
Compostos	Bax (% IFM)	Bcl-2 (% IFM)	Bcl-2 / Bax
4NC	126,1	86,2	0,68
DETC	225,0	101,8	0,45
Daudi			
Compostos	Bax (% IFM)	Bcl-2 (% IFM)	Bcl-2 / Bax
4NC	143,2	88,1	0,61
DETC	140,0	116,2	0,83

Fonte: A autora

Seguindo as análises, conforme demonstrado na Figura 16, houve uma redução na porcentagem de células com potencial mitocondrial intacto após a incubação das células neoplásicas com ambos os compostos investigados. O tratamento das células K562 e Daudi com a 4NC resultou em uma diminuição significativa de 32,6% e 18,1%, respectivamente, ao passo que a incubação com o DETC levou à redução significativa de 22,5% e 63,5%, respectivamente. Esse resultado sugere que o desequilíbrio entre expressão das proteínas pró e antiapoptóticas da família Bcl-2, com predominância da sinalização de Bax em relação a Bcl-2, o que resultou em uma despolarização da membrana e consequente perda do $\Delta\Psi_m$ em células K562 e Daudi.

Figura 16 – Efeito da 4NC e do DETC sobre o $\Delta\Psi_m$ de células K562 e Daudi.

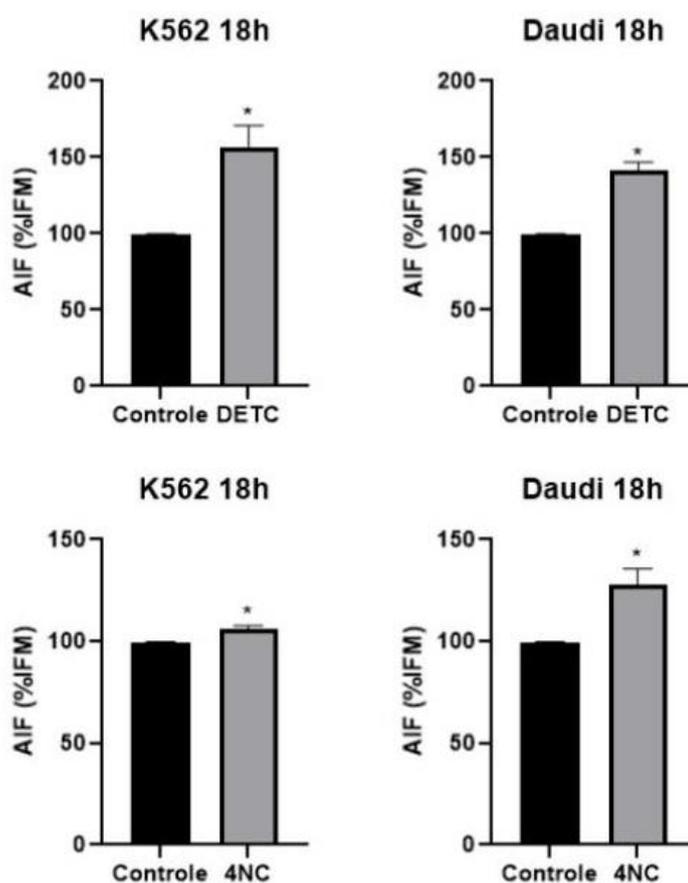


Percentual de células K562 e Daudi (1×10^6 cél/poço) com $\Delta\Psi_m$ intacto, após 18 horas de incubação com os compostos 4NC e DETC nas respectivas CI50 de 24 horas, avaliados por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa, $p \leq 0,05$, quando comparado ao grupo controle, teste t de Student. Fonte: A autora.

Sabe-se que a sinalização na apoptose intrínseca ocorre pela via mitocondrial e é dependente da liberação de proteínas pró-apoptóticas pela mitocôndria após a perda do $\Delta\Psi_m$ (GALLUZZI et al. 2018). Assim, foi avaliada a expressão de AIF nas células neoplásicas incubadas com a 4NC e o DETC.

Como pode ser observado na Figura 17, houve um aumento significativo de 6,0% e 56,8% na expressão da proteína pró-apoptótica AIF em células K562 incubadas com 4NC e DETC, respectivamente. De forma semelhante, o tratamento das células Daudi com esses compostos levou a um aumento significativo de 27,7% (4NC) e 41,7% (DETC) na expressão de AIF.

Figura 17 – Expressão da proteína pró-apoptótica AIF em células K562 e Daudi incubadas com 4NC e DETC.



Expressão de AIF em células K562 e Daudi (1×10^6 cél/poço), após 18 horas de incubação com os compostos 4NC e DETC nas respectivas CI_{50} de 24 horas, avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa, $p \leq 0,05$, quando comparado ao grupo controle, teste *t* de Student. Fonte: A autora.

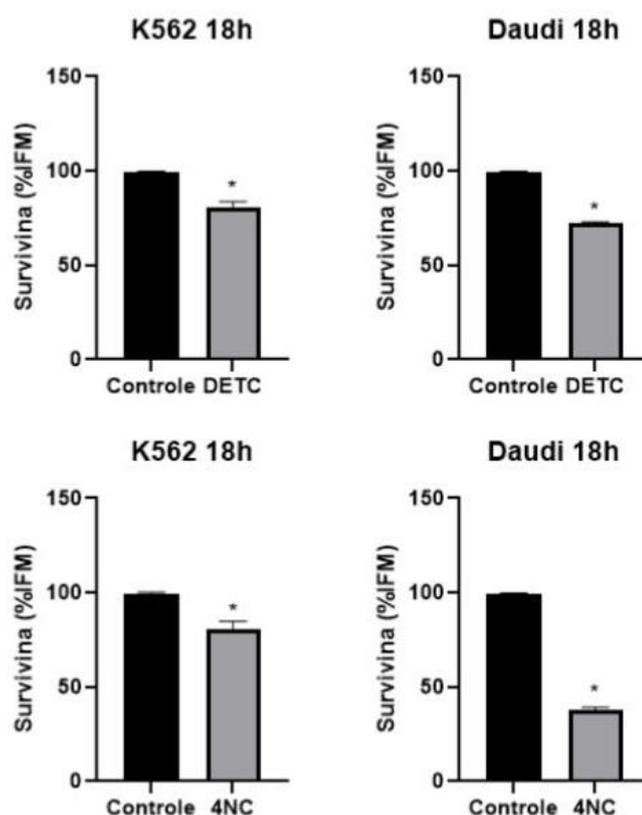
Os resultados apresentados acima refletem a liberação da proteína pró-apoptótica AIF da mitocôndria para o citosol, sugerindo a propagação do sinal apoptótico. Contudo, o aumento na expressão de AIF, por si só, não pode ser interpretado como confirmação de apoptose intrínseca, pois como descrito na literatura, pode haver o envolvimento dessa proteína em outros mecanismos de morte celular regulada, de forma independente de caspases (GALLUZZI et al., 2018).

A survivina é outra proteína que foi avaliada no presente estudo, a qual apresenta a capacidade de inibir a apoptose, por meio da inibição das caspases -9, -3 e -7. Essa proteína é superexpressa na maioria das neoplasias humanas, e tem sido relacionada à resistência à

radioterapia e à quimioterapia (EBRAHIMIYAN et al., 2018; FULDA, 2009; GALLUZZI et al., 2018; LYU et al., 2018).

A partir da Figura 18 é possível observar que houve uma diminuição significativa na expressão dessa proteína antiapoptótica tanto na linhagem celular humana de LMA (K562) quanto na linhagem celular humana de linfoma de Burkitt (Daudi) incubadas com ambos os compostos (4NC: 19,4% em K562 e 62,4% em Daudi; DETC: 19,5% em K562 e 27,6% em Daudi).

Figura 18 – Expressão da proteína antiapoptótica survivina em células K562 e Daudi incubadas com 4NC e DETC.

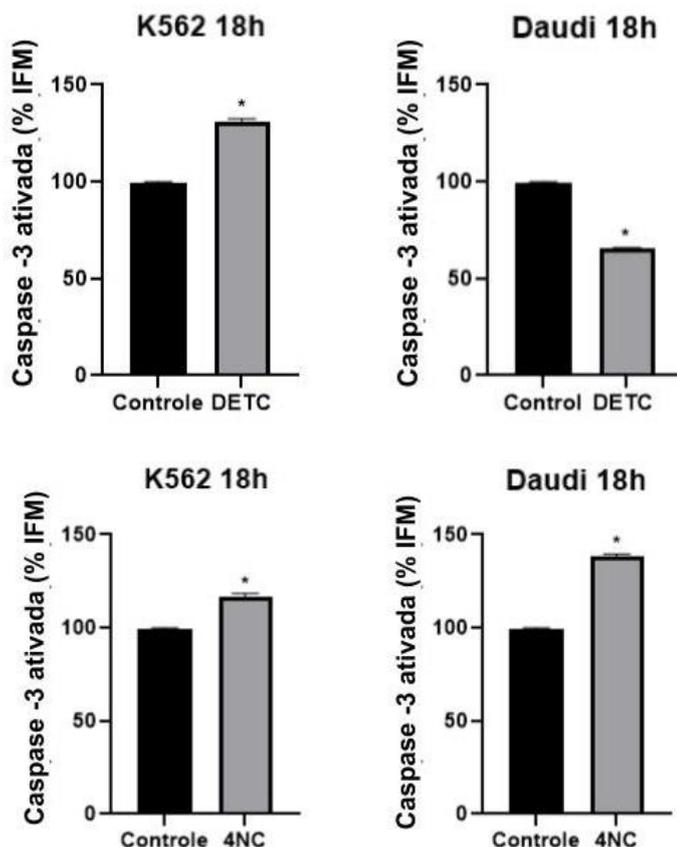


Expressão de survivina em células K562 e Daudi (1×10^6 cél/poço), após 18 horas de incubação com os compostos 4NC e DETC nas respectivas CI_{50} de 24 horas, avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa, $p \leq 0,05$, quando comparado ao grupo controle, teste *t* de Student. Fonte: A autora.

Esses resultados demonstram a capacidade dos compostos 4NC e DETC em inibir a expressão da survivina em células K562 e Daudi, permitindo que a propagação do sinal apoptótico chegue até a cascata das caspases.

Assim, a confirmação de apoptose intrínseca ocorreu por meio da avaliação da expressão da caspase-3 ativada (efetora da apoptose) (Figura 19).

Figura 19 – Expressão de caspase-3 ativada em células K562 e Daudi incubadas com 4NC e DETC.



Expressão de caspase -3 ativada em células K562 e Daudi (1×10^6 cél/poço), após 18 horas de incubação com os compostos 4NC e DETC nas respectivas CI_{50} de 24 horas, avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa, $p \leq 0,05$, quando comparado ao grupo controle, teste t de Student. Fonte: A autora.

O aumento significativo de 16,6% e 38,5% na expressão da caspase -3 ativada em células K562 e Daudi tratadas com 4NC, respectivamente, confirmam os resultados anteriores sugestivos de morte celular por apoptose (Figura 19). Mais especificamente, o conjunto de resultados apresentados acima demonstram o envolvimento da apoptose intrínseca no mecanismo de citotoxicidade desse composto sobre as células de neoplasias hematológicas avaliadas (K562 e Daudi).

Em relação ao DETC, pode-se observar na Figura 19 que houve um aumento significativo na expressão de caspase-3 ativada em células K562 incubadas com esse composto

(30,9 %), em comparação ao controle, o que consolida a suspeita de apoptose intrínseca nessa linhagem celular. No entanto, o mesmo não foi observado em relação ao efeito do DETC sobre as células Daudi. A análise estatística apontou que o tratamento dessas células com o DETC resultou em uma redução significativa de 34,7 % na expressão da caspase -3 ativada, quando comparado às células controle. Esse resultado, associado aos achados morfológicos identificados por microscopia de fluorescência, indica que, possivelmente, a citotoxicidade do DETC sobre a linhagem celular humana de linfoma de Burkitt, Daudi, contempla outro mecanismo de morte celular regulada, o qual envolve a externalização dos resíduos de fosfatidilserina e perda do potencial de membrana mitocondrial, mas é independente de caspase.

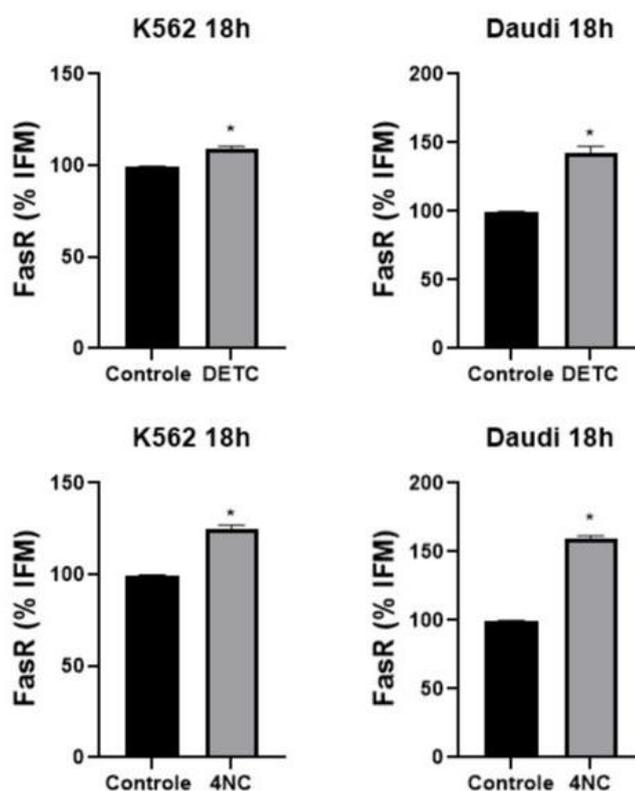
Assim, dentre os diversos tipos de morte celular descritos na última atualização do CNMC, a necrose induzida pela transição de permeabilidade mitocondrial apresenta características bioquímicas e morfológicas semelhantes às identificadas no efeito do DETC sobre a linhagem celular Daudi, sendo definida como uma forma específica de morte celular regulada desencadeada por perturbações do microambiente intracelular e dependente de ciclofilina D. O evento principal desse processo de morte celular é a formação de um complexo de poros de transição de permeabilidade mitocondrial, regulado por membros pró e antiapoptóticos da família Bcl-2 (incluindo Bax e Bcl-2, investigados no presente trabalho), proteína DRP1 (do inglês, *dynamin-1-like protein*) e proteína p53 (GALLUZZI et al., 2018). Não há ativação da cascata das caspases nesse processo e as células apresentam características morfológicas semelhantes à apoptose tardia / necrose, como o aumento da permeabilidade de membrana observado em células Daudi incubadas com o DETC.

Além desse, parthanatos é outro mecanismo de morte celular regulada que poderia estar envolvido na atividade citotóxica do DETC sobre as células de linfoma de Burkitt, Daudi. Iniciado pela hiperativação de PARP1, esse processo de morte celular é dependente da formação de poros de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial e translocação do AIF da mitocôndria para o núcleo (GALLUZZI et al., 2018). Os mecanismos bioquímicos que medeiam esses eventos não são completamente elucidados, mas acredita-se que há o envolvimento dos membros pró e antiapoptóticos da família Bcl-2 (incluindo Bax e Bcl-2). De acordo com a literatura, parthanatos parece ocorrer não apenas como consequência de danos graves/prolongados no DNA, mas também em resposta ao estresse oxidativo, hipóxia, hipoglicemia ou estímulos inflamatórios. Trata-se de um mecanismo de morte celular regulada que não é dependente de caspases, mas a ativação desse grupo de proteínas pode ocorrer em sua fase tardia. De forma semelhante a apoptose, nesse processo de morte celular ocorre

externalização dos resíduos de fosfatidilserina, fragmentação do DNA e perda da integridade de membrana plasmática (característica comum a apoptose e necrose) (DAVID et al., 2009; FATOKUN et al., 2014; GALLUZZI et al., 2018).

Sabe-se que, na prática, mais de um mecanismo de morte celular pode ocorrer simultaneamente, sendo ativados por diferentes vias de sinalização bioquímica. Nesse contexto, com o intuito de investigar o envolvimento da apoptose extrínseca na citotoxicidade dos compostos investigados, foi avaliada a expressão do FasR em células K562 e Daudi incubadas com a 4NC e com o DETC (Figura 20).

Figura 20 – Expressão de FasR em células K562 e Daudi incubadas com 4NC e DETC.



Expressão de FasR em células K562 e Daudi (1×10^6 cél/poço), após 18 horas de incubação com os compostos 4NC e DETC nas respectivas CI_{50} de 24 horas, avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. *Diferença significativa, $p \leq 0,05$, quando comparado ao grupo controle, teste *t* de Student. Fonte: A autora.

Com relação aos resultados obtidos para a 4NC, houve um aumento significativo de 26,6% e 59,3% na expressão de FasR após a incubação das células K562 e Daudi, respectivamente, com esse composto. Assim, além da apoptose intrínseca, a 4NC parece induzir

a morte celular também por apoptose extrínseca nas linhagens de LMA e linfoma de Burkitt investigadas no presente trabalho.

No que se refere ao DETC, foi observado um aumento significativo de 12,8% na expressão de FasR em células K562, bem como um aumento significativo de 42,8% em células Daudi. Em conjunto com os resultados referentes à caspase-3 ativada, a expressão aumentada desse receptor sobre células K562 pode estar relacionada com a apoptose extrínseca. Porém, com relação à linhagem Daudi, a superexpressão de FasR possivelmente está relacionada com outro mecanismo de morte celular que envolve a ativação desse receptor de morte, uma vez que a apoptose extrínseca é dependente da ativação da cascata das caspases.

Assim como a apoptose extrínseca, a necroptose é um tipo de morte celular iniciada por perturbações do microambiente intra ou extracelular que são detectadas por receptores de morte específicos, incluindo FasR e TNFR1 (mas não se limitando a esses), ou por receptores de reconhecimento de patógenos. Esse processo de morte se assemelha à necrose em sua aparência (morfologia das células), porém é um mecanismo de morte celular regulada dependente criticamente de MLKL (do inglês, *Mixed lineage kinase domain like pseudokinase*), RIPK3 (do inglês, *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3*) e, em algumas configurações, da atividade de RIPK1 (do inglês, *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*) (GALLUZZI et al., 2018).

Embora a discussão acima permita apresentar outros possíveis mecanismos de morte celular regulada envolvidos no efeito do DETC sobre células de linfoma de Burkitt (Dudi), para a confirmação dessas hipóteses se fazem necessários estudos mais aprofundados, que avalie especificamente os fatores reguladores de cada via de sinalização sugeridas como hipótese.

Os resultados da investigação do mecanismo de morte celular envolvido na citotoxicidade do composto 4NC sobre as linhagens celulares humanas de neoplasias hematológicas K562 e Daudi estão em acordo com diversos estudos na literatura, os quais demonstram que o efeito antineoplásico de chalconas e/ou seus derivados envolve a indução da morte celular por apoptose (ALAELODIN et al., 2021; DONG et al., 2018; LEN et al., 2021; MAIORAL et al., 2020; SU et al., 2017; ZHANG et al., 2018). Mais especificamente, Kwak et al. (2021) demonstrou que a 3-desoxisappanchalcona induz apoptose intrínseca mediada pela produção de EROs e pelo bloqueio do ciclo celular na fase G2/M em células humanas de câncer de esôfago. De forma semelhante, Yang et al. (2022) reportou que um novo derivado sintético de chalconas (2,4,6-trimetoxi-4'-nitrochalcona) exerceu efeitos antitumorais pelo acúmulo de

EROs e induziu a apoptose em células humanas de câncer de esôfago. Também em conformidade com o presente trabalho, He et al (2021) revelou que o efeito antileucêmico da isobavachalcona sobre células de LMA envolve a produção de EROs e apoptose pela via mitocondrial.

Ainda nesse contexto, foram encontrados outros estudos na literatura que reportaram, além da apoptose intrínseca, o envolvimento da apoptose extrínseca no efeito citotóxicos de chalconas e/ou seus derivados sobre diferentes linhagens celulares de tumores sólidos e neoplasias hematológicas (HSEU et al., 2012; JACQUES et al., 2021; SHU et al., 2005; WINTER et al., 2014; YUN et al., 2006).

Em acordo com os resultados do DETC sobre células K562, a apoptose é amplamente reportada na literatura como um mecanismo de morte celular induzido por metabólitos/compostos da classe dos ditiocarbamatos sobre células neoplásicas (ALHOSHANI et al., 2021; CHAN et al., 2021; PANG et al., 2007), incluindo neoplasias hematológicas (KANNO et al., 2003; MA et al., 2020; XU et al., 2017).

No presente trabalho ficou evidenciado um aumento na produção de EROs em células K562 e Daudi incubadas com o DETC e, dessa forma, foi sugerido que o desequilíbrio no metabolismo oxidativo levou as células K562 à morte celular por apoptose, bem como está envolvido na indução de um outro tipo de morte celular, diferente de apoptose, em células Daudi. Nessa perspectiva, Zha et al. (2014) apresentaram resultados semelhantes ao avaliar indiretamente, por meio da administração do fármaco dissulfiram, o efeito de um complexo contendo dietilditiocarbamato de sódio e cobre denominado $\text{Cu}(\text{deDTC})_2$ sobre uma linhagem de células de leucemia linfoblástica aguda humana. Nesse estudo, ficou demonstrado que a apoptose induzida pelo $\text{Cu}(\text{deDTC})_2$ pode estar relacionada com a produção de EROs, bem como pode ser ter relação com a ativação da via JNK e a inibição de NF- κ B e Nrf2. Também em consonância com os resultados apresentados no presente trabalho, Yip et al. (2011) reportou que o dietilditiocarbamato (avaliado por meio do dissulfiram) associado ao cloreto de cobre induziu a produção de EROs em linhagem celular de câncer de mama, bem como inibiu a atividade constitutiva de NF- κ B e levou as células à apoptose intrínseca.

No entanto, foi identificada apenas uma referência na literatura que relatou a capacidade de um dietilditiocarbamato em induzir outro tipo de morte celular, diferente de apoptose (KIMOTO-KINOSHITA et al., 2004). No referido estudo, foi demonstrado que a citotoxicidade do dietilditiocarbamato sobre células de leucemia promielocítica aguda está relacionada com a

produção de EROS. Dessa forma, a depender do estado de hipóxia da cultura celular, bem como da concentração do composto (alta ou baixa), o efeito do mesmo envolve a indução de apoptose e necrose, ou apenas apoptose.

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A 4NC e o DETC são compostos já descritos na literatura que apresentam uma diversidade de atividades biológicas conhecidas, incluindo a antineoplásica. Os resultados dos estudos computacionais apresentados neste trabalho sugerem que ambos os compostos apresentam propriedades físico-químicas adequadas à uma boa biodisponibilidade oral, e permitiram a identificação de algumas propriedades farmacocinéticas que podem ser melhoradas, no caso de a 4NC e o DETC serem usados como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos. No entanto, estudos experimentais futuros são necessários para corroborar e aprofundar essas análises.

As investigações *in vitro* acerca do efeito da 4NC e do DETC sobre células de neoplasias hematológicas demonstraram que os compostos são citotóxicos para todas as linhagens celulares avaliadas (MM.1S, Daudi e K562), sendo efetivos em induzir à morte células de linfoma de Burkitt (Daudi) e de LMA (K562). Além disso, o cálculo do índice de seletividade sugere que a 4NC e o DETC são seletivos na indução das células neoplásicas à morte, e os resultados do ensaio de hemólise indicam que esses compostos apresentam potencial hemolítico apenas em altas concentrações.

No que tange aos mecanismos envolvidos no efeito citotóxico da 4NC e do DETC, o presente trabalho demonstrou que os compostos induzem um bloqueio do ciclo celular na fase G2/M em células Daudi e K562 (com exceção da 4NC sobre células Daudi), e que a citotoxicidade desses compostos envolve a produção de EROs em ambas as linhagens celulares investigadas. Adicionalmente, foram apresentadas evidências da indução de morte celular por apoptose intrínseca e extrínseca após a incubação de células K562 com 4NC e com DETC, e de células Daudi com 4NC. Já o efeito do DETC sobre as células Daudi parece não envolver a indução da apoptose. Outros mecanismos de morte celular regulada podem estar envolvidos na citotoxicidade desse composto sobre as células de linfoma de Burkitt investigadas no presente trabalho, porém estudos adicionais e mais aprofundados são necessários para confirmar essa hipótese.

7 PERSPECTIVAS

- Aprofundar a investigação do mecanismo de morte celular envolvido na citotoxicidade do DETC sobre células de linfoma de Burkitt, Daudi.
- Avaliar o efeito dos compostos após co-cultivo com células do microambiente da medula óssea.
- Avaliar o sinergismo da 4NC e do DETC com fármacos já utilizados na clínica para o tratamento de leucemias e linfomas.
- Avaliar a atividade citotóxica da 4NC e do DETC nanoencapsulados sobre as linhagens celulares K562, Daudi e HS-5.
- Avaliar o efeito dos compostos sobre modelos animais.

8 REFERÊNCIAS

- AGAR, N. S.; ÀGAR; MAHONEY, J. R; EATON, J. W. Hemolytic and microbicidal actions of diethyldithiocarbamic acid. **Biochem Pharmacol**, v. 41, n. 6-7, p. 985-993, Mar 1991.
- AGARWAL, S. *et al.* Venetoclax for the treatment of elderly or chemotherapy-ineligible patients with acute myeloid leukemia: a step in the right direction or a game changer? **Expert Rev Hematol**, v. 14, n. 2, p. 199-210, Fev. 2021.
- AJIBOYE, T. O. *et al.* The Versatility in the Applications of Dithiocarbamates. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 3, p. 1317, Jan 2022.
- ALAELELDIN, R. *et al.* Modulation of Apoptosis and Epithelial-Mesenchymal Transition E-cadherin/TGF- β /Snail/TWIST Pathways by a New Ciprofloxacin Chalcone in Breast Cancer Cells. **Anticancer Res**, v. 41, n. 5, p. 2383-2395, Mai 2021.
- ALAGGIO R. *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. **Leukemia**, v. 36, n. 7, p. 1720-1748, Jun 2022.
- ALEXANDER, T. B.; ORGEL, E. Mixed Phenotype Acute Leukemia: current approaches to diagnosis and treatment. **Curr Oncol Rep**, v. 23, n. 2, Fev 2021.
- ALHOSHANI, A. *et al.* Anticancer Activity and Apoptosis Induction of Gold(III) Complexes Containing 2,2'-Bipyridine-3,3'-dicarboxylic Acid and Dithiocarbamates. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 3973, Jun 2021.
- ALMEIDA, A. *et al.* Emerging protein targets for metal-based pharmaceutical agents: an update. **Coord Chem Rev**, v. 257, n. 19-20, p. 2689-2704, Out 2013.
- ALQAHTANI, S. *et al.* In silicoADME-Tox modeling: progress and prospects. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 13, n. 11, p. 1147-1158, Out 2017.
- AMARANTE-MENDES, G. P.; GRIFFITH, T. S. Therapeutic applications of TRAIL receptor agonists in cancer and beyond. **Pharmacol Ther**, v. 155, p. 117-131, Nov 2015.
- AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). Acute myeloid leukemia (AML) Subtypes and prognostic factors (2018). Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/detection-diagnosis-staging/how-classified.html>>. Acesso em: 27 Mar 2023
- AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). Treating acute myeloid leukemia (AML). Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/treating.html>> Acesso em: 27 Mar 2023.
- AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). Multiple myeloma. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/multiple-myeloma.html>>. Acesso em: 27 mar 2023.
- APLENC, R. *et al.* Bortezomib with standard chemotherapy for children with acute myeloid leukemia does not improve treatment outcomes: a report from the children's oncology group. **Haematologica**, v. 105, n. 7, p. 1879-1886, Fev 2020.
- ASPATWAR, A. *et al.* Cloning, purification, kinetic and anion inhibition studies of a recombinant β -carbonic anhydrase from the Atlantic salmon parasite platyhelminth *Gyrodactylus salaris*. **J Enzyme Inhib Med Química**, v. 35, p. 65-71, Dez 2020.

- ASSOLINI, J. P. *et al.* 4-nitrochalcone exerts leishmanicidal effect on *L. amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes, and the 4-nitrochalcone encapsulation in beeswax copaiba oil nanoparticles reduces macrophages cytotoxicity. **Eur J Pharmacol.**, v. 884, p. 173392, Out 2020.
- BAIG, S. *et al.* Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: where do we stand? **Cell Death Dis**, v. 7, n. 1, p. 2058, Jan 2016.
- BAR-NATAN, M. *et al.* Bone marrow stroma protects myeloma cells from cytotoxic damage via induction of the oncoprotein MUC1. **Br J Haemato**, v. 176, n. 6, p. 929-938, Mar 2017.
- BARNUM, K. J.; O'CONNELL, M. J.. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. **Methods mol biol**, v. 1170, p. 29-40, Mai 2014.
- BATOOL, M.; AHMAD, B.; CHOI, S. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 11, p. 2783, Jun 2019.
- BLASS, B. E. **Basic principles of drug discovery and development**. Philadelphia: Academic Press, 2015.
- BONAKDAR. *et al.* Synthesis and Anticancer Activity Assay of Novel Chalcone-Sulfonamide Derivatives. **Iran J Pharm Res**, v.16, n. 2, p. 565-568, Abr 2017.
- BOSE, P.; GRANT, S. Rational Combinations of Targeted Agents in AML. **J Clin Med**, v. 4, n. 4, p. 634-664, Abr 2015.
- BÖTTCHER M., *et al.* Bone marrow stroma cells promote induction of a chemoresistant and prognostic unfavorable S100A8/A9high AML cell subset. **Blood Adv**, v. 8, n. 6, p. 5685-5697, Nov 2022.
- BOZDAG, M. *et al.* Synthesis of a new series of dithiocarbamates with effective human carbonic anhydrase inhibitory activity and antiglaucoma action. **Bioorg Med Chem**, v. 23, n. 10, p. 2368-2376, Mai 2015.
- BRAGA, M. M. *et al.* Brain zinc chelation by diethyldithiocarbamate increased the behavioral and mitochondrial damages in zebrafish subjected to hypoxia. **Sci Rep**, v. 6, n. 1, Fev 2016.
- BRAZ, C. L. *et al.* Drugs with activity on the cytochrome P450 used by elderly at home. **Rev Méd MG**, v. 28, p. 1927, Abr 2018.
- BRISSOT, E.; MOHTY, M. Which Acute Myeloid Leukemia Patients Should Be Offered Transplantation? **Semin Hematol**, v. 52, n. 3, p. 223-231, jul 2015.
- CALLANDER, N. S. *et al.* NCCN Guidelines® Insights: multiple myeloma, version 3.2022. **J Natl Compr Canc Netw**, v. 20, n. 1, p. 8-19, Jan 2022.
- CARNEIRO, B. A.; EL-DEIRY, W. S. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 17, n. 7, p. 395-417, Mar 2020.
- CELES, F. S. *et al.* DETC-based bacterial cellulose bio-curatives for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Sci Rep**, v. 6, n. 1, p. 1-11, Dez. 2016.
- CHAN, P. F. *et al.* A bismuth diethyldithiocarbamate compound induced apoptosis via mitochondria-dependent pathway and suppressed invasion in MCF-7 breast cancer cells. **Biomaterials**, v. 34, n. 2, p. 365-391, Fev 2021.

- CHEN J. *et al.* Reactive oxygen species-activated self-amplifying prodrug nanoagent for tumor-specific Cu-chelate chemotherapy and cascaded photodynamic therapy. **Biomaterials**, v. 284, p. 121513, Abr 2022.
- CHENG, J. W.; FRISHMAN, W. H.; ARONOW, W. S. Updates on Cytochrome P450-Mediated Cardiovascular Drug Interactions. **Am J Ther**, v. 16, n. 2, p. 155-163, Mar 2009.
- CHIEN, C. H. *et al.* Enrichment of superoxide dismutase 2 in glioblastoma confers to acquisition of temozolomide resistance that is associated with tumor-initiating cell subsets. **J Biomed Sci**, v. 26, n. 1, p. 0, Out. 2019.
- CHU, J.; GUO, C. L. Design and Discovery of Some Novel Chalcones as Antioxidant and Anti-Inflammatory Agents via Attenuating NF- κ B. **Arch Pharm**, v. 349, n. 1, p. 63-70, Dez 2015.
- COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS (CONITEC). Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas da Leucemia Mieloide Aguda do Adulto. Disponível em: <<https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/protocolos/ddt/leucemiamieloideaguda-adulto.pdf>>. Acesso em: 27 abr. 2023.
- CORDEIRO, A. P. *et al.* In vitro synergic activity of diethyldithiocarbamate and 4-nitrochalcone loaded in beeswax nanoparticles against melanoma (B16F10) cells. **Mater Sci Eng C**, v. 120, p. 111651, Jan 2021.
- COSTA, A. M. *et al.* Cancer Statistics over Time in Northwestern São Paulo State, Brazil: incidence and mortality. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 31, n. 4, p. 707-714, Fev 2022.
- CREUTZIG, U. *et al.* Acute myelogenous leukemia in adolescents and young adults. **Pediatr Blood Cancer**, v. 65, n. 9, p. 27089, Abr 2018.
- CROMBIE, J.; LACASCE, A. The treatment of Burkitt lymphoma in adults. **Blood**, v. 137, n. 6, p. 743-750, Fev 2021.
- CVEK, B.; DVORAK, Z. The value of proteasome inhibition in cancer. **Drug Discov Today**, v. 13, n. 15-16, p. 716-722, Ago 2008.
- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, Mar 2017.
- DALLA VIA, L. *et al.* DNA-targeting pyrroloquinoline-linked butenone and chalcones: synthesis and biological evaluation. **Eur. J Med Chem**, v. 44, n. 7, p. 2854-2861, Jul 2009.
- DANESE, A. *et al.* Calcium regulates cell death in cancer: roles of the mitochondria and mitochondria-associated membranes (mams). **Biochim Biophys Acta Bioenerg**, v. 1858, n. 8, p. 615-627, Ago 2017.
- DAS, M.; MANNA, K. Chalcone Scaffold in Anticancer Armamentarium: a molecular insight. **J Toxicol**, v. 2016, p. 1-14, Jan 2016.
- DAVID, K. K. *et al.* Parthanatos, a messenger of death. **Front Biosci**, v. 1, n. 14, p. 1116-11128, Jan 2009.
- DI, L.; KERNS, E. H. **Drug-like properties: concepts, structure design and methods**. from ADME to toxicity optimization. Elsevier: Amsterdam, 2015.

- DING, Y. *et al.* Potential Regulation Mechanisms of P-gp in the Blood-Brain Barrier in Hypoxia. **Curr Pharm Des**, v. 25, n. 10, p. 1041-1051, Ago 2019.
- DONG, N. *et al.* Apoptosis-inducing effects and growth inhibitory of a novel chalcone, in human hepatic cancer cells and lung cancer cells. **Biomed Pharmacother**, v. 105, p. 195-203, Set 2018.
- DOVAL, D. *et al.* Cytarabine ears – A side effect of cytarabine therapy. **J Oncol Pharm Pract**, v. 26, n. 2, p. 471-473, Mai 2019.
- DUFOUR, P. *et al.* Sodium ditioarb as adjuvant immunotherapy for high risk breast cancer: a randomized study. **Biotherapy**, v. 6, n. 1, p. 9-12, Jan 1993.
- DUNLEAVY, K; LITTLE, R. F.; WILSON, W. H. Update on Burkitt Lymphoma. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 30, n. 6, p. 1333-1343, Dez. 2016.
- EBRAHIMIYAN, H. *et al.* Survivin and autoimmunity; the ins and outs. **Immunol Lett**, v. 193, p. 4-24, Jan 2018.
- EGAN, W. J. *et al.* Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. **J. Med. Chem.**, v. 43, n. 21, p. 3867-3877, Set 2000.
- ELGARTEN, C. W. *et al.* Pediatric acute myeloid leukemia: updates on biology, risk stratification, and therapy. **Curr Opin Pediatr**, v. 32, n. 1, p. 57-66, Fev 2020.
- ELMAN, I.; SILVA, M. E. Crianças portadoras de leucemia linfóide aguda: análise dos limites de detecção dos gostos básicos. **RBC**, v. 53, n. 3, p. 297-303, Out 2007.
- ELSHOURY, A. *et al.* Advancing treatment of acute myeloid leukemia: the future of flt3 inhibitors. **Expert Rev. Anticancer Ther**, v. 19, n. 3, p. 273-286, Fev 2019.
- EVANS, B. C. *et al.* Ex Vivo Red Blood Cell Hemolysis Assay for the Evaluation of pH-responsive Endosomolytic Agents for Cytosolic Delivery of Biomacromolecular Drugs. **J Vis Exp**, n. 73, Mar 2013.
- FATOLUN, A. A. *et al.* Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. **Br J Pharmacol**, v. 171, n. 8, p. 2000-2016, Abr 2014.
- FENG, J. *et al.* DpdtC-Induced EMT Inhibition in MGC-803 Cells Was Partly through Ferritinophagy-Mediated ROS/p53 Pathway. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2020, p. 1-14, Mar 2020.
- FEUSER, P. E. *et al.* Antineoplastic activity of free 4-nitrochalcone and encapsulated in poly(thioether-ester) nanoparticles obtained by thiol-ene polymerization in two human leukemia cell lines (Jurkat and K562). **J Drug Deliv Sci Technol**, v. 67, p. 102924, Jan 2022.
- FEUSER, P. E. *et al.* Co-encapsulation of sodium diethyldithiocarbamate (DETC) and zinc phthalocyanine (ZnPc) in liposomes promotes increases phototoxic activity against (MDA-MB 231) human breast cancer cells. **Colloids Surf B**, v. 197, p. 111434, Jan 2021.
- FOKOUÉ, H. *et al.* Há algo novo no reconhecimento molecular aplicado à química medicinal? **Química Nova**, v. 43, n. 1, p. 78-89, Jan 2020.
- FREYER, D. R. *et al.* Interventions for cisplatin-induced hearing loss in children and adolescents with cancer. **Lancet Child Adolesc Health**, v. 3, n. 8, p. 578-584, Ago 2019.

- FULDA, S. Tumor resistance to apoptosis. **Int J Cancer**, v. 124, p. 511–515, Out 2008.
- GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. **Cell Death Differ**, v. 25, n. 3, p. 486-541, Jan 2018.
- GENG, Y. J. *et al.* Caspase-3-induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells exposed to proinflammatory cytokines. **Eur J Cell Biol**, v. 77, n. 4, p. 294-302, Dez 1998.
- GHOSE, A. K. *et al.* A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. **J Comb Chem.**, v. 1, n. 1, p. 55-68, Dez 1998.
- GINSBURG, I. *et al.* Hemolysis of human red blood cells induced by the combination of diethyldithiocarbamate (DDC) and divalent metals: modulation by anaerobiosis, certain antioxidants and oxidants. **Free Radic Res**, v. 31, n. 2, p. 79-91, Jan 1999.
- GLOBOCAN - The Global Cancer Observatory. Disponível em:
<<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/35-Multiple-myeloma-fact-sheet.pdf>>.
Acesso em: 27 mar 2020.
- GOLDAR, S. *et al.* Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 6, p. 2129-2144, Abr 2015.
- GOPAL, S.; GROSS, T. G. How I treat Burkitt lymphoma in children, adolescents, and young adults in sub-Saharan Africa. **Blood**, v. 132, n. 3, p. 254-263, Jul 2018.
- GRETEN, F. R.; GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and Cancer: triggers, mechanisms, and consequences. **Immunity**, v. 51, n. 1, p. 27-41, Jul 2019.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por apoptose. **RBC**, v. 3, n. 53, p.335-343, Jul 2007.
- GUIDO, R. V. *et al.* Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Rev Est Avan.** v.24, n.70, p.81-98, Set 2010.
- HAAKE, A. R.; POLAKOWSKA, R. R. Cell Death by Apoptosis in Epidermal Biology. **J. Invest Dermatol**, v. 101, n. 2, p. 107-112, Ago 1993.
- HADIZADEH, S. *et al.* Cytotoxic Effects of Newly Synthesized Palladium(II) Complexes of Diethyldithiocarbamate on Gastrointestinal Cancer Cell Lines. **Biochem Res Int**, v. 2014, p. 1-9, Abr 2014.
- HAKKOLA, J. *et al.* Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update. **Arch Toxicol**, v. 94, n. 11, p. 3671-3722, Out 2020.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000.
- HANAHAHAN, D. Hallmarks of Cancer: new dimensions. **Cancer Discov**, v. 12, n. 1, p. 31-46, Jan 2022.
- HARASHIMA, H.; DISSMEYER, N.; SCHNITTGER, A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. **Trends Cell Biol**, v. 23, n. 7, p. 345-356, Jul 2013.

- HARRIS, M. *et al.* Genetic Testing in the Diagnosis and Biology of Acute Leukemia. **Am J Clin Pathol**, v. 152, n. 3, p. 322-346, Jul 2019.
- HAY, M. *et al.* Clinical development success rates for investigational drugs. **Nat Biotechnol**, v. 32, n. 1, p. 40-51, Jan 2014.
- HE H. *et al.* Repurposing disulfiram for cancer therapy via targeted nanotechnology through enhanced tumor mass penetration and disassembly. **Acta Biomater**. v. 1, n. 68, p. 113-124, Mar 2018.
- HE, H. *et al.* Isobavachalcone inhibits acute myeloid leukemia: Potential role for ROS-dependent mitochondrial apoptosis and differentiation. **Phytother Res**, v. 35, n. 6, Fev 2021.
- HOU, X. *et al.* How to improve docking accuracy of AutoDock4.2: a case study using different electrostatic potentials. **J Chem Inf Model**, v. 28, n.53, p. 188-200, Jan 2013.
- HSEU, Y. C. *et al.* The chalcone flavokawain B induces G2/M cell-cycle arrest and apoptosis in human oral carcinoma HSC-3 cells through the intracellular ROS generation and downregulation of the Akt/p38 MAPK signaling pathway. **J Agric Food Chem**, v. 7, n. 60, p. 2385, Fev 2012. Mar.
- HUANG, T. *et al.* Growth Inhibition of a Novel Iron Chelator, DpdtC, against Hepatoma Carcinoma Cell Lines Partly Attributed to Ferritinophagy-Mediated Lysosomal ROS Generation. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2018, p. 1-13, Ago 2018.
- INCA – Instituto Nacional de Câncer. Mortalidade. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/app/mortalidade>>. Acesso em: 27 mar 2023.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. Disponível em: <<https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/3700#:~:text=Resultados%3A%20S%C3%A3o%20esperados%20704%20mil,71%20mil%20casos%20novos%2C%20respectivamente.>>. Acesso em: 27 mar 2022.
- ISHAK, D. H. *et al.* A bismuth diethyldithiocarbamate compound promotes apoptosis in HepG2 carcinoma, cell cycle arrest and inhibits cell invasion through modulation of the NF- κ B activation pathway. **J Inorg Biochem**, v. 130, p. 38-51, Jan 2014.
- JACQUES, A. V. *et al.* Synthesis of chalcones derived from 1-naphthylacetophenone and evaluation of their cytotoxic and apoptotic effects in acute leukemia cell lines. **Bioorg Chem**, v. 116, p. 105315, Nov 2021.
- JI, T. *et al.* Flavokawain B, a kava chalcone, inhibits growth of human osteosarcoma cells through G2/M cell cycle arrest and apoptosis. **Mol Cancer**, v. 12, n. 1, Jun 2013.
- JIANG, N. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of new coumarin-dithiocarbamate hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. **Eur. J Med Chem**, v. 146, p. 287-298, Fev 2018.
- KALISZ, K. *et al.* An update on Burkitt lymphoma: a review of pathogenesis and multimodality imaging assessment of disease presentation, treatment response, and recurrence. **Insights Imaging**, v. 10, n. 1, Mai 2019.
- KANNO, S. I. *et al.* Diethyldithiocarbamate-Induced Cytotoxicity and Apoptosis in Leukemia Cell Lines. **Biol Pharm Bull**, v. 26, n. 7, p. 964-968, Jul 2003.

- KASHYAP, D.; GARG, V. K.; GOEL, N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: role in cancer development and prognosis. **Adv Protein Chem Struct Biol**, v. 125, p. 73-120, Abr 2021.
- KAST, R. E. *et al.* A conceptually new treatment approach for relapsed glioblastoma: coordinated undermining of survival paths with nine repurposed drugs (cusp9) by the international initiative for accelerated improvement of glioblastoma care. **Oncotarget**, v. 4, n. 4, p. 502-530, Abr 2013.
- KAUL, L. *et al.* The revival of dithiocarbamates: from pesticides to innovative medical treatments. **iScience**, v. 24, n. 2, p. 102092, Fev 2021.
- KERR, J. F. *et al.* Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer** v. 26, n. 4, p. 239-257, Ago 1972.
- KHOURY J. D. *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. **Leukemia**, v. 36, p. 1703–1719, Jun 2022.
- KIMOTO-KINOSHITA, S. *et al.* Diethyldithiocarbamate can induce two different type of death: apoptosis and necrosis mediating the differential map kinase activation and redox regulation in hl60 cells. **Mol Cell Biochem**, v. 265, n. 1/2, p. 123-132, Out 2004.
- KOFF, J. *et al.* A Time to Kill: targeting apoptosis in cancer. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 2, p. 2942-2955, Jan 2015.
- KOOPMAN, G. *et al.* Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**. v. 84, n. 5, p. 1415-1420, Set 1994.
- KOUCHKOVSKY, I; ABDUL-HAY, M. ‘Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. **Blood Cancer J**, v. 6, n. 7, p. 441, Jul 2016.
- KROEMER, G. *et al.* Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. **Physiol Rev**, v. 87, n. 1, p. 99-163, Jan 2007.
- KRUG, U. *et al.* The Treatment of Elderly Patients With Acute Myeloid Leukemia. . **Dtsch Arztebl**, v. 108, n. 52, p.863- 870, 2011.
- KUMAR, S. K. *et al.* Multiple myeloma. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, p. 17046, Jul 2017.
- KUMAR, V; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. DNA Damage. In: KUMAR, V; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Basic Pathology**. 10th ed. Philadelphia: Elsevier, 2018a.
- KUMAR, V; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Neoplasia. In: KUMAR, V; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Basic Pathology**. 10th ed. Philadelphia: Elsevier, 2018b.
- KUMAR, V; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Proliferation and the Cell cycle. In: KUMAR, V; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Basic Pathology**. 10th ed. Philadelphia: Elsevier, 2018c.
- KWAK, A. H. *et al.* Licochalcone H Synthesized by Modifying Structure of Licochalcone C Extracted from *Glycyrrhiza inflata* Induces Apoptosis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells. **Cell Biochem Biophys**, v. 78, p. 65–76, Mar 2020.
- HARPE, K. L. *et al.* The Hemocompatibility of Nanoparticles: a review of cell nanoparticle interactions and hemostasis. **Cells**, v. 8, n. 10, p. 1209, Out 2019.

MOCAN, T. Hemolysis as expression of nanoparticles-induced cytotoxicity in red blood cells. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, v. 1, n. 1, p. 6, Mar 2010.

LAURIAULT, V. V.; O'BRIEN, P. J.. Disulfiram may mediate erythrocyte hemolysis induced by diethyldithiocarbamate and 1,4-naphthoquinone-2-sulfonate. **Arch Biochem Biophys**, v. 284, n. 1, p. 207-214, Jan 1991.

LEE, H.; BAE, Y. J. Pharmaceutical Differences Between Block Copolymer Self-Assembled and Cross-Linked Nanoassemblies as Carriers for Tunable Drug Release. **Pharm Res**, v. 30, n. 2, p. 478-488, Out 2012.

LEE, Y. C. *et al.* Macrophage inflammatory protein-3 α influences growth of K562 leukemia cells in co-culture with anticancer drug-pretreated HS-5 stromal cells. **Toxicology**, v. 249, n. 2-3, p. 116-122, Jul 2008.

LEN, J. M. *et al.* A Novel Dialkylamino-Functionalized Chalcone, DML6, Inhibits Cervical Cancer Cell Proliferation, In Vitro, via Induction of Oxidative Stress, Intrinsic Apoptosis and Mitotic Catastrophe. **Molecules**, v. 26, n. 14, p. 4214, Jul 2021.

LIPINSKI, C. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, Mar 2001.

LIU, X. *et al.* Xanthohumol chalcone acts as a powerful inhibitor of carcinogenesis in drug-resistant human colon carcinoma and these effects are mediated via G2/M phase cell cycle arrest, activation of apoptotic pathways, caspase activation and targeting Ras /MEK/ERK pathway. **J Buon**, v. 24, n. 6, p. 2442-2447, Abr 2019.

LOPEZ, J.; TAIT, S. W. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. **Br J Cancer**, v. 112, n. 6, p. 957-962, Mar 2015.

LYU, H. *et al.* Epigenetic mechanism of survivin dysregulation in human cancer. **Sci China Life Sci**, v. 61, n. 7, p. 808-814, Jul 2018.

MA, J.; GE, Z. Comparison Between Decitabine and Azacitidine for Patients With Acute Myeloid Leukemia and Higher-Risk Myelodysplastic Syndrome: a systematic review and network meta-analysis. **Front Pharmacol**, v. 12, p. 701690, Ago 2021.

MA, Y. *et al.* Combination of diethyldithiocarbamate with 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate inhibits the growth of human myeloid leukemia HL-60 cells in vitro and in xenograft model. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 84, n. 10, p. 2069-2076, Out 2020.

MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Anti-cancer chalcones: structural and molecular target perspectives. **Eur J Med Chem**, v. 98, p. 69-114, Jun. 2015.

MAIORAL, M. F. *et al.* Aldehyde biphenyl chalcones induce immunogenic apoptotic-like cell death and are promising new safe compounds against a wide range of hematologic cancers. **Future Med Chem**, v. 12, n. 8, p. 673-688, Abr 2020.

MAIORAL, M. F. *et al.* Apoptotic events induced by synthetic naphthylchalcones in human acute leukemia cell lines. **Biochimie**, v. 95, n. 4, p. 866-874, Abr 2013.

MAJI, S. K. Luminescence-Tunable ZnS-AgInS₂ Nanocrystals for Cancer Cell Imaging and Photodynamic Therapy. **ACS Appl Bio Mater**, v. 21, n. 5, p. 1230-1238, Fev 2022.

MALARD, F.; MOHTY, M. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, v. 395, n. 10230, p. 1146-1162, Abr 2020.

- MALUF, S. W. et al. **Citogenética humana**. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- MANGOLINI, M.; RINGSHAUSEN, I. Bone Marrow Stromal Cells Drive Key Hallmarks of B Cell Malignancies. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 21, p. 1466, Fev 2020.
- MANIKANDAN, P.; NAGINI, S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: a review. **Curr Drug Targets**, v. 19, n. 1, Jan 2018.
- MCCARTHY, P. L. et al. Lenalidomide Maintenance After Autologous Stem-Cell Transplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: a meta-analysis. **J Clin Oncol**, v. 35, n. 29, p. 3279-3289, Out 2017.
- MENDANHA, D. et al. A New Chalcone Derivative with Promising Antiproliferative and Anti-Invasion Activities in Glioblastoma Cells. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3383, Jun 2021.
- MICHALKOVA, R. et al. Molecular Mechanisms of Antiproliferative Effects of Natural Chalcones. **Cancers**, v. 13, n. 11, p. 2730, Mai 2021.
- MOLONEY J. N.; COTTER T. G. ROS signalling in the biology of cancer. **Semin Cell Dev Biol**, v. 80, p. 50-64, Jun 2017.
- MOLYNEUX, E. M. et al. Burkitt's lymphoma. **Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1234-1244, Mar 2012.
- MONTESINOS, P. et al. Update on management and progress of novel therapeutics for R/R AML: an iberian expert panel consensus. **Ann Hematol**, v. 98, n. 11, p. 2467-2483, Out 2019.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dez 1983.
- MOSNA, F.; CAPELLI, D.; GOTTARDI, M. Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia: still a work in progress? **J Clin Med**, v. 6, n. 6, p. 57, Jun. 2017.
- MOURA, A. F. et al. New synthetic sulfonamide chalcone induced cell cycle arrest and cell death in colorectal adenocarcinoma metastatic cells (SW-620). **Anti-Cancer Agents Med Chem**, v. 21, n. 13, Dez 2021.
- MUEGGE, I. et al. Simple Selection Criteria for Drug-like Chemical Matter. **J. Med. Chem.**, v. 44, n. 12, p. 1841-1846, Mai 2001.
- MUKHAMETOV, A.; RAEVSKY O. A. On the mechanism of substrate/non-substrate recognition by P-glycoprotein. **J Mol Graph Model**, v. 71, p. 227-232, Jan 2017.
- MUKHERJEE, S.; SEKERES, M.A. Novel Therapies in Acute Myeloid Leukemia. **Semin Oncol Nurs**, v. 35, n. 6, p. 150955, Dez. 2019.
- MUKHTAR, F. et al. Survival predictors of Burkitt's lymphoma in children, adults and elderly in the United States during 2000-2013. **Int J Cancer**, v. 140, n. 7, p. 1494-1502, Jan 2017.
- Muller, T. et al. Chemical Synthesis, Pharmacokinetic Properties and Biological Effects of JM-00266, a Putative Non-Brain Penetrant Cannabinoid Receptor 1 Inverse Agonist. **Int J Mol Sci**, v. 8, n. 23, p. 2923, Mar 2020.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Cancer types. Leukemia - health professional version. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp>>. Acesso em: 27 mar. 2023.

- NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Understanding Câncer. Whais is Cancer, 2021. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso em: 27 mar. 2023.
- NEWELL, L. F.; COOK, R. J. Advances in acute myeloid leukemia. **Br Med J**, [S.L.], v. 375, p. 2026, Out 2021.
- OH, J. M. *et al.* Potent and selective inhibition of human monoamine oxidase-B by 4-dimethylaminochalcone and selected chalcone derivatives. **Int J Biol Macromol**, v. 137, p. 426-432, Set 2019.
- OLIVEIRA, J. W. *et al.* Application of Dithiocarbamates as Potential New Antitrypanosomatids-Drugs: approach chemistry, functional and biological. **Molecules**, v. 24, n. 15, p. 2806, Ago 2019.
- OLIVEIRA, J. W. *et al.* Insights of antiparasitic activity of sodium diethyldithiocarbamate against different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Sci Rep**, v. 11, n. 1, Mai 2021.
- OLSZEWSKI, A. J. *et al.* Human immunodeficiency virus-associated lymphomas in the antiretroviral therapy era: analysis of the national cancer data base. **Cancer**, v. 122, n. 17, p. 2689-2697, Jun 2016.
- PANG, H. *et al.* Sodium diethyldithiocarbamate, an AIDS progression inhibitor and a copper-binding compound, has proteasome-inhibitory and apoptosis-inducing activities in cancer cells. **Int J Mol Med**, v. 19, p. 809 - 816, Mai 2007.
- PAPPALARDO, F. *et al.* In silico clinical trials: concepts and early adoptions. **Brief Bioinformatics**, v. 20, n. 5, p. 1699-1708, Jun 2018.
- PAREDES, J. *et al.* Prospective randomized trial of high-dose cisplatin and fluorouracil infusion with or without sodium diethyldithiocarbamate in recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. **J Clin Oncol**, v. 6, n. 6, p. 955-962, Jun 1988.
- PELCOVITS A.; NIROULA R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. **R I Med J (2013)**, v. 103, n. 3, p. 38-40, Abr 2020.
- PEÑA-MORÁN, O. *et al.* Cytotoxicity, Post-Treatment Recovery, and Selectivity Analysis of Naturally Occurring Podophyllotoxins from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* on Breast Cancer Cell Lines. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1013, Ago 2016.
- PETERS, C.; BROWN, S. Antibody–drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. **Biosci Rep**, v. 35, n. 4, p. 0, Jul 2015.
- POPESCU, R. C. *et al.* Fabrication and Cytotoxicity of Gemcitabine-Functionalized Magnetite Nanoparticles. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1080, Jun 2017.
- POZAROWSKI, P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry. **Checkpoint Contr Canc**, p. 301-312, 2004.
- PRATT-HYATT, M. *et al.* Mechanism-Based Inactivation of Human CYP2E1 by Diethyldithiocarbamate. **Drug Metab Dispos**, v. 38, n. 12, p. 2286-2292, Set 2010.
- RENVOIZÉ, C. *et al.* Apoptosis: identification of dying cells. **Cell Biol Toxicol**, v. 14, n. 2, p. 111-120, Mar 1998.

- RÖDER, C. *et al.* Impact of death receptor signaling on the malignancy of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Eur J Cell Biol**, v. 90, n. 6-7, p. 450-455, Jun 2011.
- RODRIGUES, G. *et al.* O uso de softwares livres em aula prática sobre filtros moleculares de biodisponibilidade oral de fármacos. **Química Nova**, v. 44, n. 8, p. 1036-1044, Mar 2021.
- RODRÍGUEZ-MOLINERO, A.; LÓPEZ-DIÉGUEZ, M.; BENEGAS, J. R. Tissue homeostasis and cancer. **Med Hypotheses**, v. 68, n. 6, p. 1333-1341, Jan 2007.
- ROSE-INMAN, H. *et al.* Acute Leukemia. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 31, n. 6, p. 1011-1028, Dez. 2017.
- RUBNITZ, J.E. *et al.* Childhood Acute Myeloid Leukemia. **Curr Treat Options Oncol**, v. 9, n. 1, p. 95-105, Fev 2008.
- RUBNITZ, J. E.; KASPERS A. J.. How I treat pediatric acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 138, n. 12, p. 1009-1018, Jun 2021.
- SANTOS, P. C. *et al.* Antitumor activity associated with hyperthermia and 4-nitrochalcone loaded in superparamagnetic poly(thioether-ester) nanoparticles. **J Biomater Sci Polym Ed**, v. 31, n. 15, p. 1895-1911, Jul 2020.
- SANTOS M. O. *et al.* Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **RBC**, v. 69, n. 1, p.213700, Jan 2023.
- SASHIDHARA, K.V. *et al.* Novel Chalcone–Thiazole Hybrids as Potent Inhibitors of Drug Resistant Staphylococcus aureus. **ACS Med Chem Lett**, v. 6, n. 7, p. 809-813, Jun 2015.
- SATOU, A. *et al.* Epstein-Barr Virus (EBV)-positive Sporadic Burkitt Lymphoma. **Am J Surg Pathol**, v. 39, n. 2, p. 227-235, Fev 2015.
- SAXENA, H. *et al.* Synthesis of chalcone derivatives on steroidal framework and their anticancer activities☆. **Steroids**, v. 72, n. 13, p. 892-900, Nov 2007.
- SHAIK, A. *et al.* Antimicrobial, Antioxidant, and Anticancer Activities of Some Novel Isoxazole Ring Containing Chalcone and Dihydropyrazole Derivatives. **Molecules**, v. 25, n. 5, p. 1047, Fev 2020.
- SHERIF, H. A. *et al.* Treatment outcome of doxorubicin versus idarubicin in adult acute myeloid leukemia. **Leuk Res Rep**, v. 16, p. 100272, Out 2021.
- SIVAGNANAM, U. *et al.* The role of human phospholipid scramblases in apoptosis: an overview. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Res**, v. 1864, n. 12, p. 2261-2271, Dez 2017.
- SU, Y. K. *et al.* Methoxyphenyl chalcone sensitizes aggressive epithelial cancer to cisplatin through apoptosis induction and cancer stem cell eradication. **Tumour Biol**, v. 39, n. 5, p. 101042831769168, Maio 2017.
- SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, v. 71, n. 3, p. 209-249, Fev 2021.
- SWERDLOW, S. H. *et al.* **WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon, França: IARC, 2017

SYKES, D. B. *et al.* Discovering Small Molecules that Overcome Differentiation Arrest in Acute Myeloid Leukemia. **Probe Reports From The Nih Molecular Libraries Program**. EUA: Bethesda (Md), 2015.

TAKAC, P. *et al.* New chalcone derivative exhibits antiproliferative potential by inducing G2/M cell cycle arrest, mitochondrial-mediated apoptosis and modulation of MAPK signalling pathway. **Chem Biol Interact**, v. 292, p. 37-49, Ago 2018.

TAN, E. P. *et al.* The sweet side of the cell cycle. **Biochem Soc Trans**, v. 45, n. 2, p. 313-322, Abr 2017.

TENNANT, J. R. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. **Transplantation**, v. 2, n. 6, p. 685-694, Nov 1964.

TERAS, L. R. *et al.* 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 6, p. 443-459, Set 2016.

The National Institute for Health and Care Excellence (NCI). Myeloma: diagnosis and management (2016). Disponível em: <<https://www.nice.org.uk/guidance/ng35/resources/myeloma-diagnosis-and-management-pdf-1837394042821>>. Acesso em: 29 Mar 2023.

The National Institute for Health and Care Excellence (NCI). Non-Hodgkin lymphoma (2021). Disponível em: <<https://www.nice.org.uk/guidance/ng52/resources/nonhodgkin-lymphoma-pdf-3306777546949>>. Acesso em: 29 Mar 2023.

TOPPING, R. J.; JONES, M. M. Optimal dithiocarbamate structure for immunomodulator action. **Med Hypotheses**, v. 27, n. 1, p. 55-57, Set 1988.

TSANG, R. Y.; AL-FAYEA, T.; AU, H. J. Cisplatin Overdose. **Drug Safety**, v. 32, n. 12, p. 1109-1122, Dez 2009.

VALENTE, T. J. Apoptose: destrinchando a "morte celular programada". SANAR (2021). Disponível em: <<https://www.sanarmed.com/apoptose-destrinchando-a-morte-celular-programada-colunistas>>. Acesso em: 28 Mar 2023.

VAN DE DONK, N. W; PAWLYN, C.; YONG, K. L. Multiple myeloma. **Lancet**, v. 397, n. 10272, p. 410-427, Jan. 2021.

VEBER, D. F. *et al.* Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **J. Med. Chem**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, Mai 2002.

VIOLA-RHENALS, M. *et al.* Role of peroxidases, thiols and Bak/Bax in tumor cell susceptibility to Cu[DEDTC]₂. **Biochem Pharmacol**, v. 74, n. 6, p. 841-850, Set 2007.

VITOROVIĆ-TODOROVIĆ, M. D. *et al.* (E)-4-Aryl-4-oxo-2-butenic acid amides, chalcone-aroilacrylic acid chimeras: design, antiproliferative activity and inhibition of tubulin polymerization. **Eur J Med Chem**, v. 62, p. 40-50, Abr. 2013.

WANG, D. *et al.* Natural Chalcones in Chinese Materia Medica: Licorice. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 16, n. 2020, p. 3821248, Mar 2020.

WANG F. C. *et al.* Synthesis and cytotoxic activity of chalcone analogues containing a thieno[2,3-d]pyrimidin-2-yl group as the A-ring or B-ring. **Bioorg Chem**, v. ;94, p. 103346, Jan 2020.

- WANG, J. J. *et al.* Lipid nanoparticles with different oil/fatty ester ratios as carriers of buprenorphine and its prodrugs for injection. **Eur J Pharm Sci**, v. 38, n. 2, p. 138-146, Set 2009.
- WARING, R. H. Cytochrome P450: genotype to phenotype. **Xenobiotica**, v. 50, n. 1, p. 9-18, Ago 2019.
- WICKMAN, G. *et al.* How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 5, p. 735-742, Mar 2012.
- WILD C.P.; WEIDPASS E.; STEWART B.W. **World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention**. Lyon, França: IARC, 2020. Disponível em: <<http://publications.iarc.fr/586>>. Acesso em: 27 mar. 2023.
- WIMAN, K. G.; ZHIVOTOVSKY, B.. Understanding cell cycle and cell death regulation provides novel weapons against human diseases. **J Intern Med**, v. 281, n. 5, p. 483-495, Abr 2017.
- WINTER, E. *et al.* Involvement of extrinsic and intrinsic apoptotic pathways together with endoplasmic reticulum stress in cell death induced by naphthylchalcones in a leukemic cell line: Advantages of multi-target action. **Toxicol In Vitro**, v. 28, n. 5, p. 769-777, Ago 2014.
- World Health Organization (WHO). Fact Sheets. Detail. Cancer, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 27 mar. 2023.
- XU, B. *et al.* Disulfiram/copper selectively eradicates AML leukemia stem cells in vitro and in vivo by simultaneous induction of ROS-JNK and inhibition of NF- κ B and Nrf2. **Cell Death Dis**, v. 8, n. 5, p. 2797, Mai 2017.
- XU, M. *et al.* Chalcone derivatives and their antibacterial activities: current development. **Bioorg Chem**, v. 91, p. 103133, Out 2019.
- XU, X.; HAI, Y.; HUA, Z. C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. **Biosci Rep**, v. 39, n. 1, Jan 2019.
- YANG, Y. *et al.* The novel dithiocarbamate, DpdtC suppresses HER2-overexpressed cancer cells by up-regulating NDRG1 via inactivation of HER2-ERK 1/2 signaling. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 8-3398, Fev 2018.
- YANG, Y. A novel synthetic chalcone derivative, 2,4,6-trimethoxy-4'-nitrochalcone (Ch-19), exerted anti-tumor effects through stimulating ROS accumulation and inducing apoptosis in esophageal cancer cells. **Cell Stress Chaperones**, v. 27, n. 6, p. 645-657, Nov 2022.
- YIP, N. C. *et al.* Disulfiram modulated ROS-MAPK and NF κ B pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like Properties. **Br J Cancer**, V. 104, P. 1564–1574, Abr 2011.
- YUN, J. M. *et al.* Induction of apoptosis and cell cycle arrest by a chalcone panduratin A isolated from *Kaempferia pandurata* in androgen-independent human prostate cancer cells PC3 and DU145. **Carcinogenesis: Integrative Cancer Research**, v. 27, n. 7, p. 1454-1464, Jul 2006.
- ZAYAC, A. S. *et al.* Burkitt lymphoma: bridging the gap between advances in molecular biology and therapy. **Leuk Lymphoma**, v. 61, n. 8, p. 1784-1796, Abr 2020.
- ZHA, J. *et al.* Disulfiram targeting lymphoid malignant cell lines via ROS-JNK activation as well as Nrf2 and NF- κ B pathway inhibition. **J Transl Med**, v. 12, n. 163, Jun 2014.

ZHANG, B. *et al.* Antineoplastic activity of isoliquiritigenin, a chalcone compound, in androgen-independent human prostate cancer cells linked to G2/M cell cycle arrest and cell apoptosis. **Eur J Pharmacol**, v. 821, p. 57-67, Feb 2018.

ZHANG, Y. Q. *et al.* A novel synthesized 3', 5'-diprenylated chalcone mediates the proliferation of human leukemia cells by regulating apoptosis and autophagy pathways. **Biomed Pharmacother**, v. 106, p. 794-804, Out 2018.

ZIEGLER P. *et al.* LPS-stimulated human bone marrow stroma cells support myeloid cell development and progenitor cell maintenance. **Ann Hematol**, v. 95, n. 2, p. 173-178, Jan 2016.

ANEXO 1 – 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 Vítor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-6294 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 2.006.107

Investigar o efeito citotóxico de compostos de origem natural e sintética com potencial antitumoral em células obtidas de amostras de GP 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 GP 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 GP

coletada por punção venosa por profissionais qualificados do Laboratório de Análises Clínicas da UFSC, portanto também não estão sujeitos a quaisquer riscos caso aceitem participar da pesquisa.

Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata o presente de um projeto de pesquisa coordenado pela 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 GP e MO de pacientes portadores de neoplasias hematológicas atendidos no HU da UFSC e também em

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer 2.006.107

amostras de GP 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 (GP) ou medula óssea (MO), as quais serão coletadas no momento do diagnóstico (antes do primeiro tratamento) no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As amostras de voluntários utilizadas como controle de modelo não neoplásico serão de sangue periférico, coletado por punção venosa no Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC. As amostras acondicionadas serão transportadas até o Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) do HU/UFSC, onde serão processadas para isolamento das células neoplásicas e células mononucleadas. As células serão então incubadas com compostos de origem natural e sintética previamente selecionados em linhagens celulares e a viabilidade celular será determinada pelo método do MTT. O estudo tem relevância científica, a documentação está completa e o TCLE apresentado atende a todas as

exigências da Resolução CNS nº466/12 e suas complementares. Assim, recomendamos a sua aprovação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes documentos obrigatórios:

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

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

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram detectadas pendências ou inadequações neste projeto.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
 Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.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_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1004163.pdf	13/08/2018 11:52:19		Acelto
Outros	carta_resposta_agosto.docx	13/08/2018 11:43:45	Mariana Franzoni Maloral	Acelto
Cronograma	cronograma_modificado_agosto.docx	13/08/2018 11:42:56	Mariana Franzoni Maloral	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado_agosto.docx	13/08/2018 11:42:47	Mariana Franzoni Maloral	Acelto
Folha de Rosto	folha.pdf	27/11/2017 15:16:51	Mariana Franzoni Maloral	Acelto
Declaração de Pesquisadores	declaracao_maclau.pdf	06/11/2017 14:46:37	Mariana Franzoni Maloral	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_hu.pdf	06/11/2017 14:45:24	Mariana Franzoni Maloral	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	pesquisa_PB.doc	07/10/2017 14:27:16	Mariana Franzoni Maloral	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 22 de Agosto de 2018

 Assinado por:
 Maria Lulza Bazzo
 (Coordenador)

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

ANEXO 2 – PRODUÇÕES CIENTÍFICAS.

Título	DOI
Synthesis of novel pyrazoline derivatives and the evaluation of death mechanisms involved in their antileukemic activity.	10.1016/j.bmc.2018.12.012
Miconidine acetate, a new selective and cytotoxic compound with synergic potential, induces cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells.	10.1007/s10637-018-0694-6
A new and efficient carboxymethyl-hexanoyl chitosan/dodecyl sulfate nanocarrier for a pyrazoline with antileukemic activity. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications.	10.1016/j.msec.2019.110051
PEO-chitosan nanofibers containing carboxymethyl-hexanoyl chitosan/dodecyl sulfate nanoparticles loaded with pyrazoline for skin cancer treatment.	10.1016/j.eurpolymj.2019.08.001
A novel thiosemicarbazone as a promising effective and selective compound for acute leukemia.	10.1097/CAD.0000000000000780
Cytotoxic mechanisms of primin, a natural quinone isolated from <i>Eugenia hiemalis</i> , on hematological cancer cell lines.	10.1097/CAD.0000000000000937
A novel sulfonamide derivative as a strong and selective apoptotic agent against hematological malignancies	10.1007/s11696-019-00984-7
Aldehyde biphenyl chalcones induce immunogenic apoptotic-like cell death and are promising new safe compounds against a wide range of hematologic cancers	10.4155/fmc-2019-0228
Anti-leukemic activity of semisynthetic derivatives of Lupeol	10.1080/14786419.2020.1737051
Synthesis of chalcones derived from 1-naphthylacetophenone and evaluation of their cytotoxic and apoptotic effects in acute leukemia cell lines	10.1016/j.bioorg.2021.105315
Antineoplastic activity of free 4-nitrochalcone and encapsulated in poly(thioether-ester) nanoparticles obtained by thiol-ene polymerization in two human leukemia cell lines (Jurkat and K562)	10.1016/j.jddst.2021.102924

Omics-based identification of an NRF2-related auranofin resistance signature in cancer: Insights into drug repurposing	10.1016/j.combiomed.2022.106347
--	---

Fonte: Elaborada pela Autora.