



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

JOSÉ DE BRITO VIEIRA NETO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO DE ANÁLOGOS INTERMEDIÁRIOS
DO (7-CLOROQUINOLIN-4-IL) TIOSSEMICARBAZIDA E O PERFIL DE
MORTE CELULAR DA LINHAGEM KASUMI-1.**

FORTALEZA-CE

2018

JOSÉ DE BRITO VIEIRA NETO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO DE ANÁLOGOS INTERMEDIÁRIOS
DO (7-CLOROQUINOLIN-4-IL) TIOSSEMICARBAZIDA E O PERFIL DE
MORTE CELULAR DA LINHAGEM KASUMI-1.**

Dissertação apresentada à Coordenação do programa de pós graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- V715a Vieira Neto, José de Brito.
AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO DE ANÁLOGOS INTERMEDIÁRIOS DO (7-
CLOROQUINOLIN-4-IL) TIOSSEMICARBAZIDA E O PERFIL DE MORTE CELULAR DA
LINHAGEM KASUMI-1. / José de Brito Vieira Neto. – 2019.
75 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Claudia do Ó Pessoa.

1. Câncer. 2. Quinolínicos. 3. Tiazodilínicos. 4. Citotoxicidade. 5. Leucemia. I. Título.

CDD 615.1

JOSÉ DE BRITO VIEIRA NETO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO DE ANÁLOGOS INTERMEDIÁRIOS
DO (7-CLOROQUINOLIN-4-IL) TIOSSEMICARBAZIDA E O PERFIL DE
MORTE CELULAR DA LINHAGEM KASUMI-1.**

Dissertação apresentada à Coordenação do programa de pós graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Cláudia do Ó Pessoa
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dra. Maria Izabel Gallão
Universidade Federal do Ceará-UFC

Dr. Bruno Coelho Cavalcanti
Universidade Federal do Ceará-UFC

Dr. Gilvan Pessoa Furtado
Fundação Oswaldo Cruz

À Gloria ao Criador do Universo, a
minha mãe e a minha família.

Àquele que lhe é agradável Deus dá sabedoria,
ciência e alegria; mas ao pecador ele dá a tarefa
de recolher e acumular bens, que depois passará
a quem lhe agrada. Isto é ainda vaidade e vento
que

passa.

(Eclesiastes 2:3)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, pois é dEle que vem toda a força e conforto nos momentos de dificuldades e alegrias. Pois, independentemente das minhas falhas, Deus sempre me olha com olhar de amor e perdão.

À minha mãe, **Sueli Souto Vieira**, por ser uma pessoa que desde sempre abdicou de seus desejos para que pudesse ter uma oportunidade de estudar e realizar meus sonhos acadêmicos. Por nunca deixar de acreditar em mim e por sempre sonhar os meu sonhos comigo. Mãe, eu tenho plena consciência que se não fosse pela a senhora, eu não seria capaz de alcançar mais essa vitória. Essa conquista é nossa, te amo.

Agradeço à professora **Cláudia do Ó Pessoa**, minha orientadora, que me acolheu em seu laboratório, esteve sempre me incentivando a crescer e dando todo o suporte estrutural e científico e por servir de inspiração para todos aqueles que almejam ser pesquisadores e professores bem-sucedidos.

Agradeço aos meus **amigos do LOE**, pela ajuda no desenvolvimento na minha pesquisa e pelas brincadeiras que tornam o ambiente de pesquisa muito mais agradável.

À **Associação Boa Terra**, a família que Deus me deu, para que através dela eu pudesse vivenciar o verdadeiro amor de Cristo.

E aos meus amigos **Renato, Diego, Ícaro, Jonas, Rafael e Elias**, por todos esses anos de amizade, pela fidelidade, conselhos e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos.

Agradeço à minha namorada, **Vitória Teles**, por estar sempre ao meu lado, ouvindo as minhas aflições, por me aconselhar e por estar sempre disposta a me ajudar a crescer e dar o meu melhor.

E um agradecimento mais que especial à minha família, aos meus tios **Jaqueline, regia, Marcelo, Samuel** e à minha prima **Raphaelli**, por sempre apoiarem meus sonhos e se alegrarem com as minhas conquistas. Amo vocês.

E um agradecimento à minha avó, **Maria do Carmo Souto Vieira**, que não se encontra mais nessa terra, mas que desde que eu era pequeno cuidou de mim e me ajudou na minha formação como homem.

Agradeço à minha **banca de qualificação** pelas correções, as quais foram de grande valia para a escrita final deste trabalho.

E por fim, agradeço a todos aqueles que nesta caminhada contribuíram de forma direta ou indireta para o meu crescimento como pessoa e como estudante. Para que no final dessa jornada eu pudesse concluir meus objetivos com êxito.

RESUMO

AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO DE ANÁLOGOS INTERMEDIÁRIOS DO (7-CLOROQUINOLIN-4-IL) TIOSSEMICARBAZIDA E O PERFIL DE MORTE CELULAR DA LINHAGEM KASUMI-1.

Câncer pode ser definido como um conjunto de doenças correlacionadas, onde algumas células do corpo passam a crescer de forma desordenada; e quando migram para outros tecidos, esse processo é chamado de metástase. Dentre os tipos de câncer, a leucemia apresenta uma alta taxa de mortalidade e é um termo abrangente que faz referência aos tipos de câncer que afetam as células sanguíneas. A leucemia está entre os dez tipos de câncer que mais acomete a população brasileira. Devido a complexidade no tratamento do câncer existe uma busca por novas moléculas, sendo o processo de hibridação bastante utilizado para o desenvolvimento de novas moléculas sintéticas com atividade antitumoral. Dentre as classes químicas com potencial de atividade antitumoral se tem os quinolínicos e os tiazodilínicos, ambos apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas, a atividade antitumoral comprovada por diferentes estudos. Para o presente trabalho, foi avaliado o perfil citotóxico de análogos intermediários do (7-cloroquinolin-4-il) tiossemicarbazida e o mecanismo de perfil de morte celular da linhagem KASUMI-1 induzida pela molécula mais promissora: Cloroacetoacetato de etila (168). Dentre os análogos avaliados, três mostraram potencial antiproliferativo nas linhagens SF-295, HL-60, PC-3 e HCT-116, onde a linhagem mais suscetível a ação destes intermediários foi a linhagem leucêmica, sendo o análogo 168 o que apresentou maior seletividade para linhagem HL-60 com valor de CI_{50} de $2,41\mu M$, enquanto que, quando avaliado o índice de seletividade entre a CI_{50} das células não tumorais (L929) com as de células tumorais, o índice foi >2 . Devido a maior atividade do análogo 168 para a linhagem leucêmica, esta molécula foi avaliada frente a um painel com quatro linhagens leucêmicas no tempo de incubação de 24 horas, na qual a KASUMI-1, uma linhagem de leucemia mielóide aguda, foi selecionada para os experimentos de delineamento de perfil de morte celular induzido pelo análogo 168. As células foram tratadas com diferentes concentrações do análogo 168 ($5\mu M$, $10\mu M$ e $20\mu M$) por 24 horas. No que se refere a viabilidade celular foi observado uma diminuição na integridade de membrana de maneira concentração dependente nas células de KASUMI-1, nas concentrações de $10\mu M$ e $20\mu M$. Entretanto, na concentração de $5\mu M$ a molécula foi capaz de reduzir o número de células sem interferir na viabilidade celular. Além disso, a análise da externalização da fosfatidilserina apresentou um padrão apoptótico nas duas maiores concentrações. Ao analisar o ciclo celular, foi observado um acúmulo de células em G0/G1 com uma drástica redução da população em S, em todas as concentrações testadas. O análogo 168 também induziu o aumento da população de células em subG1, como também causou uma série de alterações morfológicas, a exemplo alteração nuclear e o aparecimento de “blebs” na membrana celular com indícios de apoptose. Desse modo, os resultados apresentados sugerem que, o análogo 168, poderá ser considerado um novo protótipo com potencial antitumoral.

Palavras-chave: Câncer, Quinolínico, Tiazodilínico, Citotoxicidade, Leucemia.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE CYTOTOXIC PROFILE OF INTERMEDIATE ANALYSIS OF (7-CHLOROQUINOLIN-4-IL) THYROSSEMICARBAZIDA AND THE CELL DEATH PROFILE OF THE KASUMI-1.

Cancer is as a set of correlated diseases, where some cells in the body start to grow disorderly and migrate to other tissues, a process called metastasis. Among cancers, leukemia has a high mortality rate and is a comprehensive term that refers to the types of cancer that affect blood cells. In the search for new molecules for the treatment of cancer, the hybridization process has been widely used for the development of new synthetic molecules with antitumor activity. Among the chemical classes with potential for antitumor activity, there are quinolines and thiazolidines, both of which present several biological activities, among them the antitumor activity proven by different studies. For the present study, the cytotoxic profile of intermediate analogs of (7-chloroquinolin-4-yl) thiosemicarbazide and the mechanism of cell death of the KASUMI-1 lineage induced by the most promising molecule: ethyl chloroacetoacetate (168) were evaluated. Among the analyzed analogues, three showed antiproliferative potential in the lines SF-295, HL-60, PC-3 and HCT-116, where the cell line most susceptible to the action of these intermediates was the leukemic line, selectivity for HL-60 lineage with IC₅₀ value of 2.41 μM, whereas for non-tumor lineage (L929), the IC₅₀ value was > 25 μM. Due to the selectivity of the 168 analog for leukemic lines, it was tested on a panel with 4 leukemic lines for 24 hour incubation time, where KASUMI-1, an acute myeloid leukemia lineage was selected for the mechanism of action of the analog 168. Cells were treated with different concentrations of analog 168 (5 μM, 10 μM and 20 μM) for 24 hours. A cytostatic effect was observed in KASUMI-1 cells, from the concentration of 5 μM and cytotoxic effect at concentrations of 10 μM and 20 μM, when evaluated by flow cytometry. In addition, the phosphatidylserine externalization analysis showed an apoptotic pattern at the two highest concentrations. Moreover, the cell cycle analysis, showed an accumulation of cells in G₂ / M phase with a drastic reduction of the population in S, from the concentration of 10 μM. The analog 168 also induced an increase in the cell subG₁ population, and also caused a number of morphological changes, for example nuclear change and the appearance of blebs in the cell membrane with evidence of apoptosis. Thus, the presented results suggest that, analogue 168, could be considered a new prototype with antitumor potential.

Key-words: Cancer, Quinoline, Thiazolidine, Cytotoxicity, Leukemia.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de reagentes e soluções.....	35
Tabela 2. Lista de equipamentos.....	36
Tabela 3. Análogos intermediários do (7-cloroquinolin-4-il) tiossemicarbazida.....	38
Tabela 4. Linhagens celulares utilizadas no ensaio do MTT	39
Tabela 5. Avaliação citotóxica dos análogos sintéticos derivados do (7-cloroquinolin-4-il) tiossemicarbazida em concentração única frente a três linhagens tumorais, avaliados pelo método do MTT após incubação de 72 horas de incubação.....	46
Tabela 6. Avaliação da atividade citotóxica dos compostos sintéticos 168 (Cloroacetoacetado de etila), 183 (2-bromoacetofenona) e 184 (1,2-Dibromoetano) frente as linhagens de células tumorais e não tumoral avaliados pelo ensaio do MTT após 72 horas de incubação.....	47
Tabela 7. Avaliação da citotoxicidade do composto 168 frente a linhagens leucêmicas avaliadas pelo método do MTT após de 24 horas de incubação.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As características do câncer.....	18
Figura 2. Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018-2019 por sexo no Brasil, exceto pele não melanoma.....	18
Figura 3. Carcinogênese: Formação e heterogeneidade de tumores malignos.....	20
Figura 4. Centro quinolínico.....	23
Figura 5. Drogas com centro quinolínico.....	24
Figura 6. Moléculas híbridas sintetizadas contendo o centro quinolínico e suas respectivas mudanças em seus grupos R.....	24
Figura 7. Centro tiazodilínico.....	25
Figura 8. Molécula com centro tiazodilínicos com atividade antitumoral frente a linhagem leucêmica.	26
Figura 9. Molécula de curcumina e derivados sintéticos híbridos da molécula de curcumina com centro quinolínico.....	27
Figura 10. Análogos sintéticos derivados do intermediário (7-cloroquinolin-4-il) tiossemicarbazida.....	27
Figura 11. Fases do ciclo celular e seus respectivos complexos ciclina-CDKs.....	29
Figura 12. Via extrínseca da apoptose.....	31
Figura 13. Via intrínseca da apoptose.....	32
Figura 14. Análogo intermediário, 1-(Z) -etil-2- (2- (7-cloroquinolin-4-il) hidrazono) -4- metil-2,3-diidrotiazol-5- carboxilato.....	37
Figura 15. Curva de ação antiproliferativa da substância 168 em 4 linhagens leucêmicas após incubação por 24 horas.....	47
Figura 16. Imagens da morfologia das células de KASUMI-1 após período de incubação de 24 horas. Coradas com kit panótico rápido. Células visualizadas por microscopia óptica no aumento de 20x. (A e B) Controle negativo e doxorrubicina (2uM), respectivamente. Células tratadas com a molécula 168 5uM, 10uM, 20uM (C, D e E), respectivamente.....	59

Figura 17. Os gráficos mostram as populações de células pelos parâmetros de tamanho celular (Forward scatter) e de granulosidade (Side scatter). Células avaliadas por técnica de citometria de fluxo. Controle negativo (A), controle positivo (B), células tratadas com a amostra 168 nas concentrações de 5 uM, 10 uM e 20uM (C,D e E), respectivamente.....	50
Figura 18. Efeito da substância 168 sobre a morfologia celular das células KASUMI-1, avaliado por granulosidade e tamanho celular, determinada por citometria de fluxo.....	52
Figura 19. Efeito do análogo 168 sobre a proliferação celular das células KASUMI-1, avaliado pela integridade de membrana (A) e densidade de células (B), determinada por citometria de fluxo.....	53
Figura 20. Análise do ciclo celular das células da KASUMI-1 tratadas com a molécula 168. Células avaliadas por técnica de citometria. Controle negativo (A), controle positivo (B), células tratadas com a amostra 168 nas concentrações de 5 uM, 10 uM e 20uM (C,D e E), respectivamente.....	55
Figura 21. Efeito da amostra 168 sobre a fragmentação de DNA das células KASUMI-1, determinada por citometria de fluxo.....	56
Figura 22. Efeito da molécula 168 em células KASUMI-1 sobre a externalização da fosfatidilserina avaliada por citometria de fluxo após 24 horas de tratamento.....	57
Figura 23. Efeito da molécula 168 sobre o $\Delta\psi_m$ de células KASUMI-1 após 24 horas de incubação, avaliada por citometria de fluxo.....	58
Figura 24. Esqueleto quiniolínico.....	60
Figura 25. Dois derivados tiazodilínicos sintéticos.....	60
Figura 26. Derivado sintético tiazodilínico.....	61
Figura 27. Composto híbrido de centro quiniolínico e tiazodilínico.....	61
Figura 28. Estrutura química do análogo D3CLP.....	62
Figura 29. Uma revisão da resposta de dano ao DNA.....	66

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

AMC	American Cancer Society
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated
ATR	Ataxia-telangiectasia and Rad3
ANOVA	Análise de Variância
CI ₅₀	Concentração Inibitória Média
CDk	Quinases Dependentes de Ciclinas
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium
INCA	Instituto Nacional de Câncer
NCI	National Cancer Institute
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio
PBS	Phosphate Buffer Solution
RPMI	Roswell Parrk Memorial Institute Medium
SBF	Soro Bovino Fetal
SF-295	Linhagem celular de Glioblastoma
HCT116	Linhagem celular de carcinoma colorretal
HL 60	Linhagem celular de Leucemia Prómielocítica Humana
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
L929	Linhagem celular de fibroblasto murinho
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
PI	Iodeto de propídeo
Rpm	Rotações por minuto
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 LEUCEMIA: LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA E LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA.....	20
1.2 CLASSES QUÍMICAS.....	22
1.2.1 QUINOLÍNICOS.....	22
1.2.2 TIAZODILÍNICOS.....	25
1.3 HIBRIDAÇÃO DE MOLÉCULAS COMO ESTRATÉGIA PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVAS SUBSTÂNCIAS ANTITUMORAIS.....	26
1.4 CICLO CELULAR.....	28
1.5 MORTE CELULAR.....	29
1.5.1 APOPTOSE.....	30
1.5.2 NECROSE.....	32
1.6 JUSTIFICATIVA.....	33
2. OBJETIVOS.....	33
2.1 OBJETIVO GERAL.....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 MATERIAL UTILIZADO.....	34
3.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	34
3.1.2 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	34
3.1.3 EQUIPAMENTOS.....	35
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	36
3.3 METODOLOGIA.....	36
3.3.1 SINTETIZAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS ATIVOS.....	36
3.3.2 CITOTOXICIDADE.....	37
3.3.2.1 CULTIVO CELULAR.....	37
3.3.2.2 TESTE DO MTT.....	38

3.3.2.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	39
3.3.3 ESTUDO DE MECANISMO DE AÇÃO.....	40
3.3.3.1 CITOMETRIA DE FLUXO.....	40
3.3.3.2 DETERMINAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA, DENSIDADE, MORFOLOGIA CELULAR E CRESCIMENTO CELULAR.....	40
3.3.3.3 ANÁLISE DE CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DE DNA.....	41
3.3.3.4 AVALIAÇÃO DA EXTERNALIZAÇÃO DA FOSFATIDILSERINA-ANEXINA V.....	41
3.3.3.5 ESTUDO DOS EFEITOS DO COMPOSTO SINTÉTICO SOBRE O POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO MITOCONDRIAL ($\Delta\psi_m$) SOBRE A CÉLULA KASUMI-1....	42
4. RESULTADOS.....	44
4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS DERIVADOS SINTÉTICOS HÍBRIDOS QUINOLÍNICOS E TIAZODILÍNICOS.....	44
4.2 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DA LINHAGEM KASUMI- 1 APÓS O TRATAMENTO COM O COMPOSTO 168.....	48
4.2.1 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DA LINHAGEM KASUMI-1 POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	49
4.3 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA MOLÉCULA 168.....	52
4.3.1 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA E DA DENSIDADE CELULAR.....	52
4.3.2 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS KASUMI-1 TRATADAS COM A MOLÉCULA 168.....	54
4.3.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MORTE CELULAR.....	55
4.3.6 EFEITO DA MOLÉCULA 168 SOBRE O POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO ($\Delta\psi_m$) DAS CÉLULAS KASUMI-1.....	57
5. DISCUSSÃO.....	59
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	68
7. CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	70

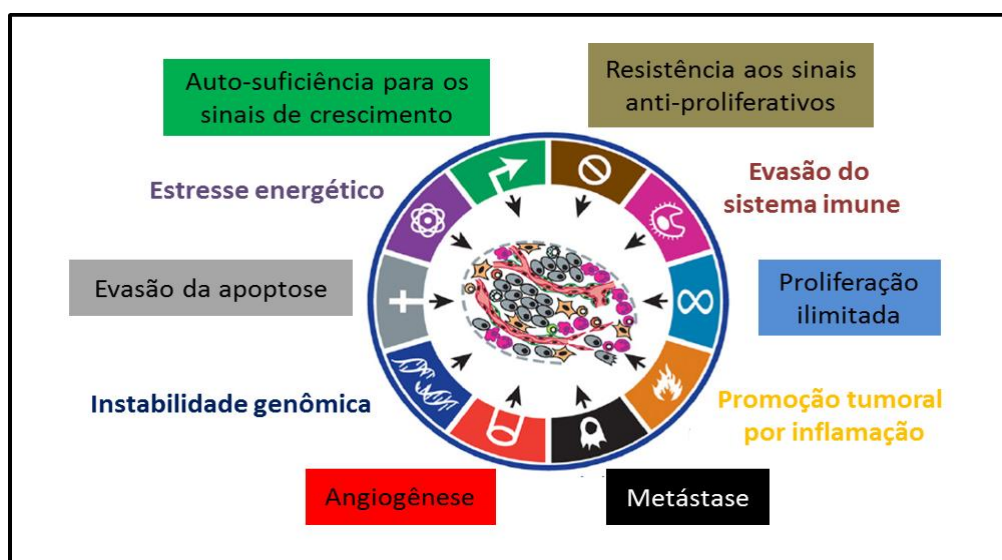
1 INTRODUÇÃO

Câncer pode ser definido como um conjunto de doenças correlacionadas, onde algumas células do corpo passam a crescer de forma desordenada e quando migram para outros tecidos, o processo é chamado de metástase. As células normais do corpo são controladas por diversos mecanismos que comandam o seu crescimento e divisão, quando estas envelhecem ou sofrem algum tipo de dano, elas morrem e novas células são formadas. Entretanto, as células cancerosas quebram este ciclo, pois passam a se proliferar de forma ilimitada (NATIONAL CANCER INTITUTE, 2015).

Outra característica das células cancerosas é que o genoma pode possuir diferentes mutações somáticas, como mudanças na sequência do DNA, através de deleções, inserções ou substituições das bases nitrogenadas. Além disso, essas células têm inseridos ao seu genoma sequências completas de DNA a partir de fontes exógenas, como as do vírus papiloma humano e o vírus da hepatite B, os quais são conhecidos por contribuírem com a gênese de diferentes tipos de câncer. Outro fator que altera o genoma são as mudanças epigenéticas, que alteram a condensação da cromatina levando ao aumento da expressão de determinados genes e diminuindo a de outros (STRATTON et al., 2009).

Duas classes de genes estão fortemente relacionadas com o desenvolvimento do câncer, os oncogenes e os genes supressores de tumor. Quando ocorrem mutações nos proto-oncogenes, estes se tornam oncogenes, os quais são responsáveis pelos processos de proliferação celular e sobrevivência da célula. Já os genes supressores de tumores atuam principalmente controlando o ciclo celular e o processo de apoptose. Quando ambas as classes de genes estão com alterações em seu DNA, as células cancerosas passam a se proliferar de forma descontrolada, podendo assim migrar para outros órgãos (HARRINGTON, 2011).

Em 2011, Hanahan e Weinberg descreveram as dez principais características biológicas adquiridas no câncer (**Figura 1**). Na qual, a instabilidade genômica e mutações, proporciona um meio para o surgimento dos outros fatores que controlam o desenvolvimento do câncer, como manutenção dos sinais de proliferação, resistência a morte celular, ativação de imortalidade replicativa, angiogênese e a capacidade de invadir tecidos próximos e desenvolver metástase. Todos estes fatores permitem a proliferação descontrolada e a sobrevivência das células cancerosas.

Figura 1. As características do câncer.

Fonte: adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

O câncer encontra-se entre as principais causas de morte devido à sua complexidade. Em trabalho relatado pela WHO (2014), em 2012 ocorreram 14 milhões de novos casos, com mais 8 milhões de pessoas mortas em decorrência do câncer. Além disso, é estimado o surgimento de aproximadamente 22 milhões de novos casos para as próximas duas décadas. Sendo assim, se faz necessária uma compreensão sobre a ocorrência de casos de câncer a fim de haver o desenvolvimento de novas políticas públicas que visem a diminuição do número de casos e para os estabelecimentos de novas formas de controle do câncer (STEWART, WILD, 2014).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que para o biênio 2018-2019 haverá mais de 500 mil novos casos de câncer. Sendo os principais tipos de câncer de próstata, traqueia, brônquio e pulmão respectivamente para os homens e nas mulheres mama, colón e reto (**Figura 2**).

Figura 2. Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018-2019 por sexo no Brasil, exceto pele não melanoma.

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA (2018)

De acordo com o INCA (2018), dentre os principais fatores para muitos tipos de cânceres, encontra-se o consumo excessivo de álcool, o tabagismo, a obesidade, uma dieta com alto teor de alimentos industrializados e a falta de atividade física. Além disso, a idade e o sexo são outros fatores importantes para epidemiologia do câncer (INCA, 2018).

Como o câncer apresenta uma alta incidência e complexidade, diferentes formas de tratamentos se fazem necessárias. As três principais formas de tratamento para o câncer são a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia, porém a imunoterapia vem crescendo como um novo caminho para combater o câncer.

Atualmente a utilização da radioterapia ou cirurgia pode fornecer uma taxa de cura de até um terço dos pacientes, quando o tumor encontra-se no seu local inicial. Entretanto, quando o diagnóstico é feito de forma tardia, a utilização da quimioterapia sozinha ou em associação, passa a ser o melhor caminho para o tratamento sistêmico da doença (RANG, DALE, 2011).

Os quimioterápicos utilizados nos tratamentos do câncer, podem ser divididos em grupos;

- 1 Agentes alquilantes: este grupo de medicamentos atuam causando dano ao DNA, assim impedindo que a célula se multiplique. Estes quimioterápicos não são ciclo específico. Como exemplos se tem a carboplatina e a cisplatina.
- 2 Antimetabólitos: esta classe de drogas é conhecida por inibir a síntese e a função do DNA quanto a do RNA. Dentre os compostos desta classe estão a gencitabina e a 5-fluorouracil.
- 3 Antibióticos anti-tumorais: os antibióticos utilizados no tratamento do câncer têm o mecanismo de ação pela intercalação às moléculas de DNA e pela inibição a síntese do DNA e RNA. A doxorubicina e a mitomicina C são exemplos desta classe.
- 4 Inibidores de topoisomerase: esta classe de substâncias tem a capacidade de interagir com as enzimas responsáveis por ajudarem na separação das fitas de DNA, quando estas estão no processo de duplicação. Com isso impedindo que novas fitas de DNA sejam formadas. Como exemplos se tem toposídeo e irinotecan.
- 5 Inibidores mitóticos: estes compostos impedem que enzimas ajudem no processo de formação das proteínas responsáveis pelo processo de divisão celular. Paclitaxel e vimblastina são duas drogas com estas características.

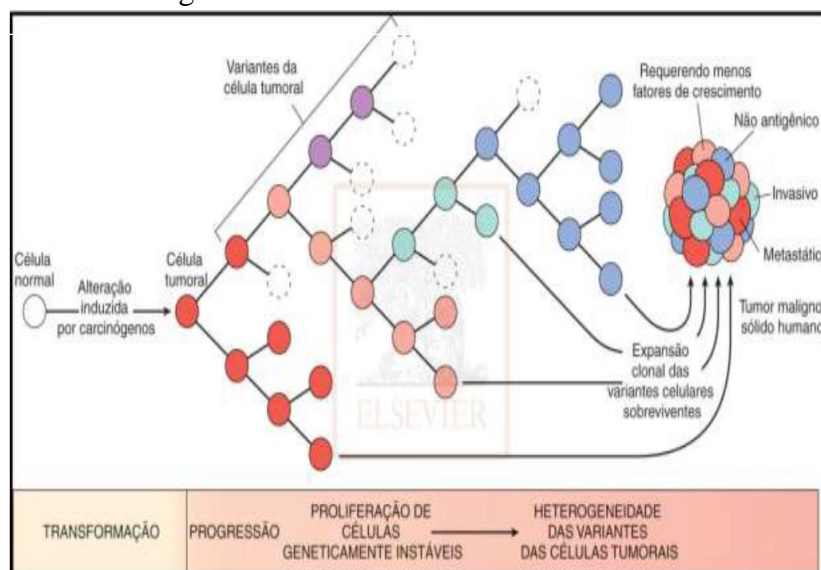
(AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016 ; RANG, DALE, 2011)

A quimioterapia tem o potencial de causar danos às células cancerosas, porém em muitas situações lesam as células não tumorais, levando a efeitos colaterais nos pacientes (ACS, 2016). Estes efeitos colaterais atingem a vida do paciente em diversos aspectos, como

estado emocional, saúde física e consequentemente na qualidade de vida (PEARCE , 2017). De uma forma geral, os quimioterápicos têm como efeitos colaterais: náusea, vômitos e diarreia. Classes específicas de quimioterápicos, como os alquilantes devido à sua característica carcinogênica possuem um efeito colateral, o qual é o surgimento de câncer secundário, como a leucemia mielóide aguda (RANG; DALE, 2011).

Um dos principais fatores que dificultam a cura do câncer é a heterogeneidade tumoral (**Figura 3**), que é a variação genética de sub-populações dentro do tumor, que variam com o tempo. Tais mudanças se devem a fatores epigenéticos, genéticos , transcriptoma e mudanças fenotípicas. Esta característica tumoral mostra que o câncer é uma doença dinâmica e este fator é uma das principais causas de desenvolvimento de resistência às drogas (DAGOGO; SHAW, 2017). Sendo assim, uma melhor compreensão da dinâmica tumoral se torna fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias e drogas para o tratamento do câncer (DAGOGO; SHAW, 2017).

Figura 3. Carcinogênese: Formação e heterogeneidade de tumores malignos.



Fonte: KUMAS; ABBAS; ASTER (2013)

1.1 LEUCEMIA: LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA E LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA.

Leucemia é um termo abrangente que faz referência aos tipos de câncer que afetam às células sanguíneas. A classificação é feita baseada no tipo de células do tecido

sanguíneo que sofrem mutações e na velocidade de crescimento das mesmas (NCI, 2017). Devido a isso, a leucemia pode ser classificada em quatro tipos, leucemia mielóide aguda e crônica, como também leucemia linfóide aguda e crônica (INCA, 2018)

De acordo com o INCA, no biênio 2018-2019 estão previsto quase 10000 novos casos de leucemia, com uma maior prevalência nos homens. Na região nordeste, a leucemia está entre os dez principais tipos de câncer, tanto para homem quanto para mulher (INCA, 2018).

A leucemia mielóide aguda (LMA) é caracterizada por uma proliferação clonal e heterogênea de células do sistema hematopoiético, anormalmente ou pouco diferenciadas na medula óssea que alcançam o sangue e outros tecidos (DOHNER et al., 2015). Além disso, a LMA é o tipo mais comum de leucemia em adultos e ainda contém a menor taxa de sobrevivência dentre todas as leucemias, com isso apresentando ser uma das doenças mais complexas e desafiadoras dentre os tipos de cânceres (DESCHLER; LUBBERT, 2006). Idade é um fator importante quanto ao surgimento de LMA, sendo prevalente em adultos com idade ≥ 65 anos e apenas 15% em jovens ≤ 15 anos. Com relação ao gênero e a etnia há diferença no surgimento da LMA nestes grupos (DESCHLER; LUBBERT, 2006).

Além disso a LMA apresenta alguns marcadores genéticos, como $t(8;21)(q22;q22)$; $RUNX1-RUNX1T1$, $t(3;3)(q21;q26.2)$; $GATA2-MECOM$, $t(15;17)(q24;q21)$ PML-RARA, a mutação do NPM1 e uma dupla mutação alélica do CEBPA (DOHNER et al., 2015; ARBER, 2016). As presenças destes marcadores genéticos são de grande relevância clínica, pois direcionam para o tratamento mais adequado, como também ajudam na melhor compreensão do desenvolvimento da doença e auxiliam nos estudos para a produção de novos fármacos.

A translocação $t(8;21)(q22;q22)$ é presente em pelo menos 12% dos casos de LMA em adultos e em aproximadamente em 30% de LMA em crianças (HATLEN et al., 2011; DOHNER et al., 2015). Esta translocação leva a formação de uma proteína quimérica AML1- ETO, a porção AML1 é responsável por diferentes etapas da diferenciação das células sanguíneas, já a parte ETO corresponde a codificação de co-repressores transcricionais (BRAS et al., 2014). Sendo assim, à proteína AML1-ETO não permite uma diferenciação das células mielóidicas e induz um processo de auto-renovação dessas células (HATLEN et al., 2011). Como exemplo de linhagem para estudar este tipo de translocação, pode-se citar a linhagem celular KASUMI-1.

O tratamento para LMA varia com o perfil dos pacientes, mas a quimioterapia padrão é feita pela combinação de citarabina e daunorrubicina (ZEIDAN et al., 2015). O uso de terapia alvo também é uma alternativa para tratar paciente com LMA, por exemplo

os inibidores das proteínas IDH e FLT3, que estão relacionados com a maturação e proliferação celular (ACS, 2016). Uma parte complementar no tratamento é o transplante de células troncos, que pode ser transplantada do próprio paciente (autologos) ou transplantada de um doador (alogenico). O transplante permite que doses maiores de quimioterápicos possam ser aplicadas ao paciente (ACS, 2016).

O outro tipo de leucemia é a mielóide crônica (LMC), que é vista como o resultado de modificações genéticas em células pluripotentes do tecido hematopoiético (MUGHAL,T, 2013). Seu principal marcador genético é a translocação t(9;22)(q34;q11.2), chamado de cromossomo Philadelphia, resultado da fusão dos genes BCR-ABL1, o qual produz a oncoproteína BCR-ABL1, que promove o aumento das atividades das tirosinas quinase (ROUSSELOT et al., 2017).

A incidência de casos de LMC em países não ocidentais são muito baixas apontando valor de 0,4/100.000 pessoas, já os dados para os EUA é mais elevado chegando a ser 1,75/100.000 pessoas. Em relação a fatores como idade, a LMC é mais prevalente em adultos ≥ 60 anos e rara em criança. No que se norteia em relação ao gênero, a LMC é mais presente em homens do que em mulheres com uma diferença de 1,2-1,7 (HOGLUND et al., 2015)

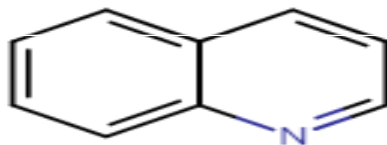
O tratamento padrão utilizado para pacientes com LMC é baseado nos diagnósticos moleculares relacionados aos genes BL1, GUSB ou BCR, no qual o imatinibe e os inibidores de tirosino quinase de segunda geração são as principais escolhas para o tratamento da LMC (CROSS et al., 2015).

1.2 CLASSES QUÍMICAS

1.2.1 QUINOLÍNICOS

O grupo quinolínico é definido como um composto orgânico heterocíclico aromático, que é caracterizado por um anel de benzeno junto com uma piridina na duas posições dos átomos de carbonos adjacentes (**Figura 4**). Os quinolínicos podem ser retirados de diferentes fontes naturais (plantas, animais e microorganismos), como também possuem uma estrutura relativamente simples facilitando seu processo de síntese. Compostos quinolínicos de origem natural quanto seus derivados sintéticos apresentam diversas atividades biológicas, como a de agente antimalárico, antifúngico, antiinflamatória, antimicrobiano e anti HIV (JAIN et al., 2016).

Figura 4. Centro quinolínico



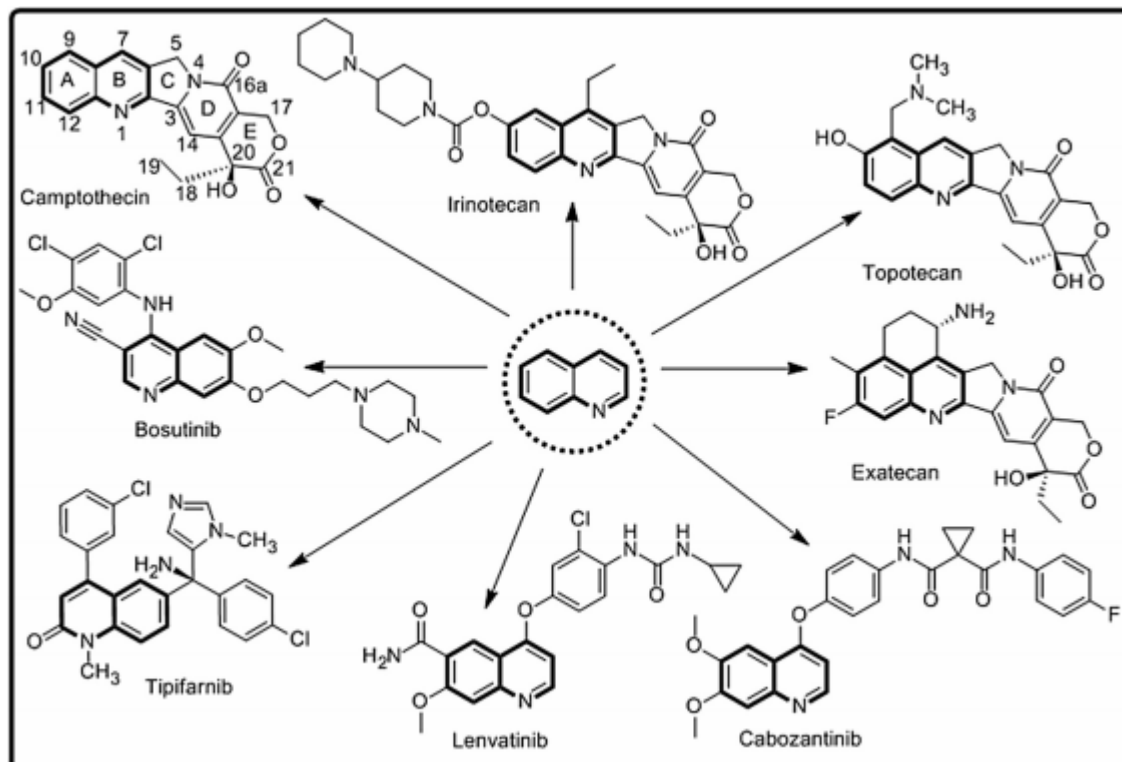
Fonte: Aatoria própria (2018)

Os compostos quinolínicos também apresentam uma proeminente ação antitumoral, que teve seus estudos avançados com a descoberta da camptotecina e a partir dela foram sintetizadas novas moléculas como o irinotecano, o topotecano e o exatecano (**Figura 5**) (AFZAL et al., 2015). Com a descoberta dos quinolínicos, diferentes moléculas passaram a ser sintetizadas e com diferentes alvos, como inibidores de tirosina quinase e inibidores de farnesiltransferase, os quais já se encontram em teste de fase clínica (AFZAL et al., 2015).

Os análogos quinolínicos apresentam diversos mecanismos de ações contra linhagens tumorais, como parada de ciclo celular, indução de apoptose, inibição de angiogênese, inibição de tirosina quinase, polimerização de tubulina, indução de reparo de DNA, inibição de topoisomerase I e II e proteassomas (AFZAL et al., 2015; JAIN et al., 2016).

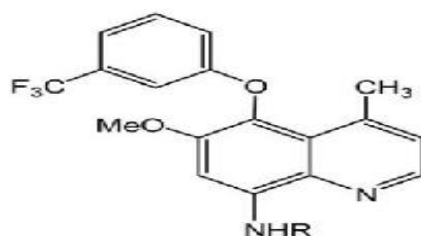
Sendo assim, compostos com centros quinolínicos vêm mostrando atividade antitumoral, como em trabalho realizado por Shi e colaboradores (2008), diversos análogos quinolínicos sofreram diversas mudanças em seus radicais (**Figura 6**) e mostraram uma atividade antitumoral promissora frente a linhagem de câncer de mama (T47D) com valores de CI_{50} na escala de nanomolar. Onde o análogo 7, com atividade mais promissora apresentou valor de CI_{50} de $15,6 \pm 3,0$ nM frente a linhagem T47D. Com isso mostrando o potencial de análogos quinolínicos como moléculas promissoras para o tratamento do câncer.

Figura 5. Drogas com centro quinolínico.



Fonte: AFZAL et al., 2014 (adptado)

Figura 6. Moléculas híbridas sintetizadas contendo o centro quinolínico e suas respectivas mudanças em seus grupos R.



1 : R = $CH_2CH_2CH_2NH_2$

2 : R = CH_2CH_2CN

3 : R = $CH_2CH_2C(=NH)OCH_2CH_3$

4 : R = $CH_2CH_2C(=NH)NH_2$

5 : R =

6 : R =

7 : R =

Fonte: SHIN et al., 2008 (adaptado)

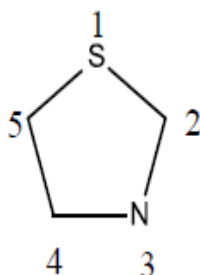
Arafa e colaboradores (2013) sintetizaram novos compostos fazendo alterações conformacionais e físico-químicas na posição oitava do núcleo quinolínico e obtiveram 16 moléculas, das quais grande parte apresentaram atividade antitumoral frente as linhagens

tumorais HT29 (colon) e MDA-MB231(mama). Entretanto evidencia-se que essas moléculas apresentaram uma melhor atividade frente a linhagem de câncer de mama, com CI_{50} variando de 13-50 μ M.

1.2.2 TIAZODILÍNICOS

É uma classe de composto heterocíclico orgânico com um grupamento de tioéter e amina, na posição 1 e 3 respectivamente (**Figura 7**) (PANDEY et al.,2011).

Figura 7. Centro tiazodilínico



Fonte: PANDEY et al.,2011 (adaptado)

Os tiazodilínicos são conhecidos por apresentarem diversas atividades biológicas, como antimalárica, antimicrobiana, anti HIV, anti-inflamatória, antioxidante e antiproliferativa (PANDEY et al., 2011).

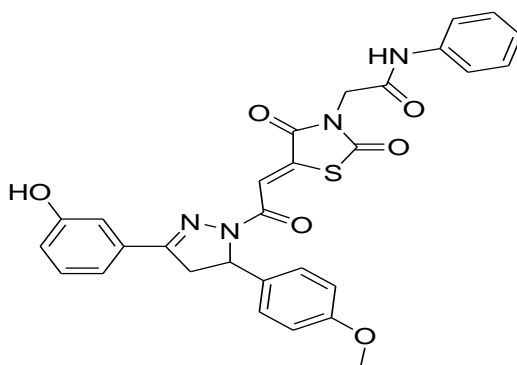
No que tange a suas atividades antitumorais os tiazodilínicos apresentam indução de fragmentação de DNA, apoptose, parada de ciclo celular, diferenciação celular e atuam como agonista do receptor (PPAR γ) que está presente em diversos tipos de cânceres (W.A. BARROS et al., 2012; TROTSKO et al, 2018). A atividade dos tiazodilínicos está estritamente ligada com sua ação como agonista de PPAR γ pois sua ativação leva a apoptose via recrutamento de co-ativadores e dissociação de co-repressores, a partir disso é aumentado o nível de proteínas pro-apoptóticas como o p53. Além disso a ligação com o PPAR γ permite a parada no ciclo celular, pois diminuem a quantidade das ciclinas, proteínas que regulam o progresso das fases do ciclo celular, como também elevam a quantidade de proteínas inibidoras de ciclinas, dependente de quinase, p21 e p27 (JAIN et al, 2013).

Diferentes estudos testaram as drogas rosiglitazona e ciglitazona, ambas são tiazodilínicos já usados para o tratamento de diabetes, que apresentam efeito antitumoral tanto *in vitro* e *in vivo* frente a diferentes tipos de tumores como câncer de pulmão, de mama e de colon. A ação dessas drogas ocorreu através de ligação com o receptor PPAR- γ , na qual

ativação desse receptor teve como consequência uma morte por apoptose, parada de ciclo celular ou diferenciação celular (BLANQUICETTE et al., 2008).

Trabalhos com moléculas sintéticas contendo centros tiazodilínicos apresentam atividade antitumoral, como em trabalho realizado por Havrylyuk e colaboradores (2013), foi demonstrada a atividade potencial anticâncer do derivado (59) (**Figura 8**) frente a linhagem leucêmica CCRF-CEM, onde este apresentou uma CI50 de 2,85 μM .

Figura 8. Molécula com centro tiazodilínicos com atividade antitumoral frente a linhagem leucêmica.



Fonte: HAVRYLYUK et al., 2013.

1.3 HIBRIDAÇÃO DE MOLÉCULAS COMO ESTRATÉGIA PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVAS SUBSTÂNCIAS ANTITUMORAIS

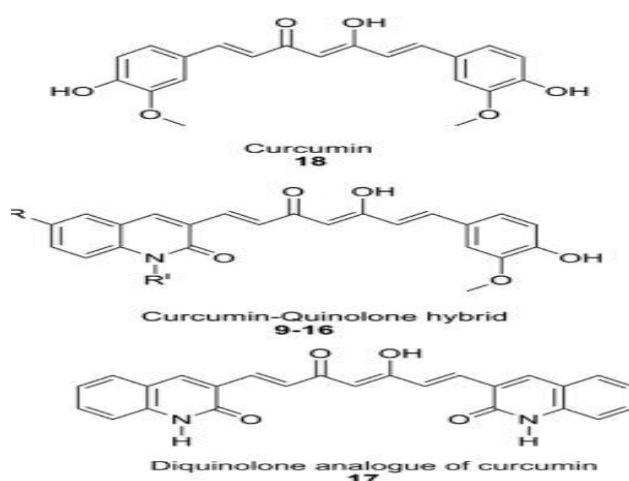
A hibridação molecular é um desenvolvimento racional de novos compostos, a qual tem como objetivo unir duas estruturas bioativas, conhecendo individualmente suas características farmacodinâmicas e farmacocinéticas para que assim possa se gerar uma molécula, mantendo-se as características dos protótipos, permitindo gerar um composto com menor toxicidade e aperfeiçoando o mecanismo de ação (VIEGAS-JUNIOR, 2007).

Em estudo reportado por Raghavan e colaboradores (2015), foram sintetizados compostos através da hibridação de curcumina com um núcleo quinolínico. A curcumina, que é um composto natural reconhecido por ser um potente agente quimiopreventivo, sendo, inclusive, já testada em fases clínicas, entretanto, tem suas limitações. Visando superar isto, a conjugação com um grupo quinolínico, conhecido por seus diversos mecanismos de ação é uma forma de gerar novos compostos anticâncer. Os compostos híbridos, quando

comparados a curcumina ou ao derivado quinolínico (**Figura 9**), apresentaram menores valores de CI_{50} , e o composto 14 apresentou o valor 12.5 μ M frente a linhagem tumoral SKOV3 e não apresentou citotoxicidade frente a linhagem não tumoral NIH3T3 (RAGHAVAN,2015).

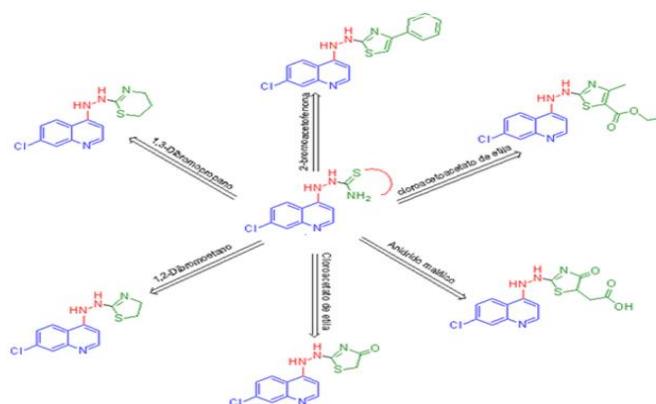
Em trabalho de dissertação realizado por Silva Santos Junior (2017) 6 análogos híbridos possuindo tanto o centro quinolínico e tiazodilínico foram sintetizados a partir do composto do intermediário (7-cloroquinolin-4-il) tiossemicarbazida (**Figura 10**).

Figura 9. Molécula de curcumina e derivados sintéticos híbridos da molécula de curcumina com centro quinolínico



Fonte: RAGHAVAN et al., 2015 (adaptado)

Figura 10. Análogos sintéticos derivados do intermediário (7-cloroquinolin-4-il) tiossemicarbazida.



Fonte: SILVA SANTOS JUNIOR, 2017 (adaptado)

O desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento do câncer visa diminuir a capacidade que a células cancerosas possuem de crescer de forma desordenada e

a capacidade de se evadirem do processo de morte. E essa diminuição ocorre através de parada de ciclo celular e da indução de morte celular, ocasionada pela ação dessas novas moléculas.

1.4 CICLO CELULAR

A desregulação do ciclo celular pode levar a formação do câncer, pois nesta doença as células se multiplicam em uma velocidade muito maior do que as células normais (Volotskova, 2012). Sendo assim, uma das formas de tratar o câncer é tendo como alvo o ciclo celular dessas células, fazendo com que elas não se multipliquem mais (Lie, 2017).

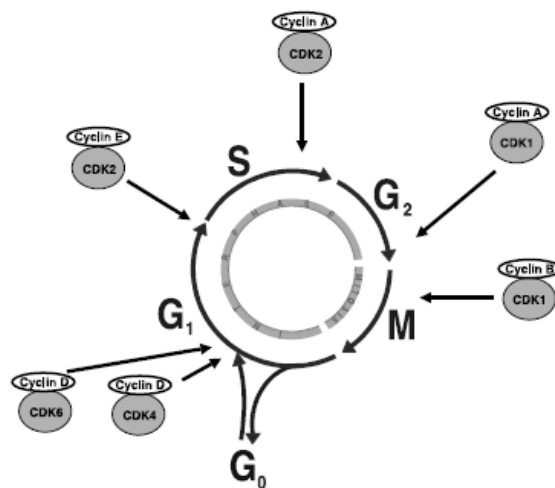
Todos os organismos, para crescerem e se multiplicarem necessitam passar pelo processo de ciclo celular tanto para que possam duplicar seu material genético e suas organelas, quanto repassar isso para suas células filhas (HARASHIMA et al., 2013). Para que este evento ocorra de forma segura, existe um fino controle molecular que visa manter fielmente as informações genéticas e evitar divisões celulares desnecessárias. A continuação do ciclo celular é controlada por fatores transcripcionais, epigenéticos, fatores de crescimento e de sinalização de proteínas que controlam a integridade genética (LIE et al., 2016; OTTO et al., 2017)

Entretanto, grande parte das células do corpo humano não estão em processo de ciclo celular e sim em estágio fora de ciclo. Onde as células que se encontram em processo de divisão são as que se encontram no tecido epitelial e na medula óssea. Muitas células estão em um estado irreversível de entrada no ciclo celular e outras em fase quiescente (G0), como os neurônios e hepatócitos, respectivamente (WILLIANS et al., 2012).

O progresso no ciclo celular ocorre através de 4 fases distintas, G0/G1, S, G2 e M (OTTO et al., 2017). A fase S é considerada uma das mais importantes, pois ocorre a replicação do DNA e a fase M é onde ocorre a divisão celular em duas células filhas. A fase G0, G1 e G2 são chamadas de “gap phase”, pois nelas ocorrem o controle para que a célula migre de uma fase para outra (WILLIANS et al., 2012). A fase G1 representa a fase após a mitose, que é sensível para receber sinais positivos ou negativos de fatores de crescimento. A fase G2 se inicia depois da fase S, e é o momento onde a célula se prepara para entrar em mitose. E por fim o G0 representa um estágio quiescente, onde as células não estão se dividindo devido a uma alta densidade celular ou falta de mitógeno (WILLIANS et al., 2012).

A passagem de fase dentro do ciclo celular (**Figura 11**) é controlada pelas proteínas ciclinas dependente de quinase (CDK), representadas pelas CDK1 CDK2, CDK4 e CDK 6, as quais são ativadas formando um complexo com as ciclinas A, B, D e E (OTTO, 2017).

Figura 11. Fases do ciclo celular e seus respectivos complexos ciclica-CDKs.



Fonte: WILLIANS et al., 2012 (adaptado)

No início do ciclo celular as células em G₀ são estimuladas por mitógeno ou fatores de crescimento que ativam e sinalizam para as CDK4 e CDK6, as quais se ligam à ciclina D para guiarem a progressão do ciclo celular de G₀ para G₁. Para a progressão de G₁ para S se faz necessário o complexo CDK2-ciclina E, e ainda na fase S para a progressão até G₂, o complexo CDK2-ciclina A é requisitado. Em G₂ o complexo ciclina A e CDK1 promove a entrada da célula na fase M. Durante a mitose a regulação é feita pela ciclina B e CDK1 (VERMEULEM, 2003). As CDKs, além de serem controladas pelas ciclinas, também são controladas pelos inibidores de ciclina dependente de quinase (CDKIs), como as proteínas membros da família INK4 (p16, p15, p18 e p19), as quais bloqueiam especificamente as CDK4 e CDK 6. Já os inibidores pertencentes a família CIP/KIP, como o p21, p27 e o p57 não são específicos e acabam por se ligar a qualquer complexo ciclina-CDK (OTTO, 2017).

1.5 MORTE CELULAR

A morte celular pode ser definida como um processo de dano das funções vitais da célula, tanto na produção de ATP quanto no processo de homeostase redox, levando a uma perda de integridade ou a uma fragmentação celular. O processo de morte celular é visto

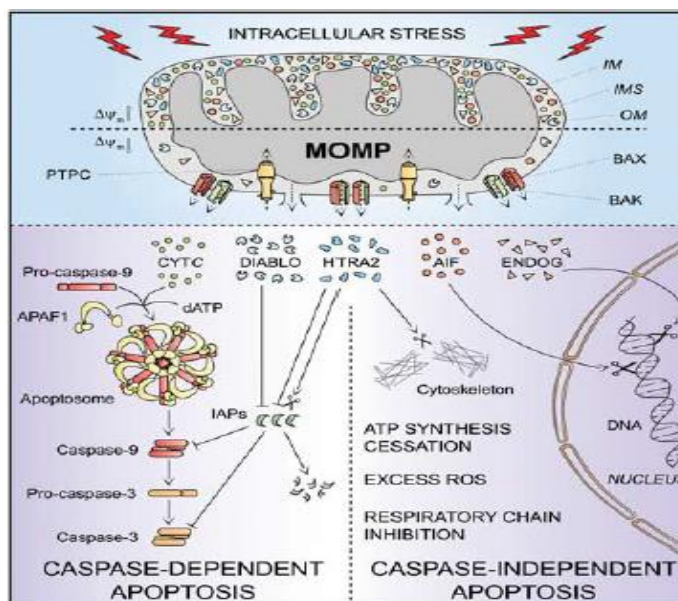
como um processo inevitável da vida celular, o qual promove a eliminação de células com danos irreversíveis ou danosas para o corpo, mantendo assim a homeostase e ajudando no desenvolvimento animal (FUCHS et al., 2015; GALLUZZI et al., 2018).

A morte celular regulada (MCR) é baseada em um complexo maquinário molecular que pode ser modificado por fatores farmacológicos e genéticos. Além disso, a MCR pode ser iniciada de duas formas diferentes, via mecanismos que buscam a homeostase do organismo sem nenhuma interferência exógena (GALLUZZI et al., 2018). E a outra forma é ativação por estímulos intracelulares ou extracelulares que geram uma grande perturbação na célula e precisa lidar com o estresse ou restaurar a homeostase celular. A MCR pode ser dividida em diferentes tipos, que variam tanto em características morfológicas quanto bioquímicas, mas as principais são apoptose, autofagia e necrose (GALLUZZI et al., 2018). Além da MCR existe a morte celular acidental (MCA, que é caracterizada quando a célula é exposta a um dano instantâneo e catastrófico que pode ser de origem química, mecânica e física (GALLUZZI et al., 2018).

1.5.1 APOPTOSE

A apoptose pode ser iniciada por via intrínseca, por dano no DNA, estresse oxidativo e por via extrínseca, devido à falta de fatores de crescimento e ligação com receptores de morte.

Na via extrínseca (**Figura 12**), os receptores de morte FAS e TNF, quando ativados por seus respectivos ligantes levam a formação de um complexo multiprotéico dinâmico (DISC), que funciona como um sinal de indução de morte, a qual regula a ativação das caspase 8 e 10, onde estas caspases ativam as capases efetoras 3 e 7, levando pôr fim a execução do processo apoptótico (GALLUZZI et al., 2018; OUYANG et al.,2012). Já a família dos receptores dependentes, como o NTN1 e o DCC, quando não estão conectados com seus ligantes leva ativação direta da caspase 9 e por fim ativação da caspase efetora 3 (GALLUZZI et al.,2012).

Figura 13. Via intrínseca da apoptose

Fonte : GALLUZZI et al.,2012 (adaptado)

No que se permeia sobre as alterações morfológicas de uma célula em apoptose as modificações ocorrem tanto no núcleo quanto no citoplasma. No núcleo celular ocorre a condensação da cromatina, que se inicia na periferia da membrana nuclear e tende a formar estruturas em forma de anel. Nos estágios iniciais da apoptose ocorre a fragmentação do núcleo, porém a membrana celular permanece íntegra (ZIEGLER et al., 2004). Outra importante alteração morfológica no núcleo é a fragmentação internucleossomal das duplas fitas de DNA em tamanhos de 180bp – 200bp que é controlado por diferentes substratos de caspases (ZIEGLER et al.,2004). Além disso, outra característica apoptótica é o processo de encolhimento celular e picnose (ELMORE et al., 2007).

As células apoptóticas nos estágios iniciais perdem contato com as células vizinhas. Na sequência, mudanças na membrana do citoplasma começam a surgir, como a formação de protruções chamadas “blebs”. No estágio final da apoptose os “blebs” se separam da célula e formam os corpos apoptóticos carregados com conteúdo citoplasmático e nuclear. Outra característica marcante do apoptose é a exposição da fosfatidilserina, a qual sinaliza para o processo de fagocitose celular (ZIEGLER et al., 2004).

1.5.2 NECROSE

A necrose era caracterizada como uma morte celular não programada ou acidental, quando não existe um maquinário de controle molecular, como ocorre na apoptose (ZIEGLER et al., 2004). Entretanto, a necroptose é uma morte celular programada com características necróticas. Esse tipo de necrose programada é iniciada tanto por fatores

extracelulares quanto intracelulares, os quais são detectados por receptores de morte e receptores reconhecedores de patógeno e estão estritamente dependentes de uma ativação sequencial de RIPK3 e MLKL (GALLUZZI et al., 2018).

As células em processo de necrose tem uma morfologia bem diversificada, mas apresentam em seus estágios iniciais uma permeabilização da membrana plasmática, dilatação das organelas e em seu estágio final uma desintegração nuclear. Entretanto, não é característica comum de necrose a picnose e a fragmentação nuclear (ZIEGLER et al., 2004). Devido à perda de integridade da membrana plasmática, os conteúdos citoplasmáticos são liberados nos tecidos, enviando sinais quimiotáticos, levando, assim, ao surgimento de processos inflamatórios (ELMORE et al., 2007).

1.6 JUSTIFICATIVA.

A descoberta de novas moléculas para o tratamento do câncer ainda se faz necessária, pois o câncer apresenta ser uma doença de alta complexidade genética. É evidente que as drogas atuais não conseguem tratar todos esses tipos de câncer e além disso, muitas dessas drogas apresentam muitos efeitos colaterais para os pacientes. Sendo assim, o surgimento de moléculas que sejam capazes de combater esses diferentes tipos de leucemia e com menos efeitos colaterais são de grande valia para a clínica médica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL.

Determinar a citotoxicidade de análogos (**Tabela 4**) intermediários do (7-cloroquinolin-4-il) tiossemicarbazida e o possível de perfil de morte celular da linhagem KASUMI-1.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar atividade citotóxica dos análogos intermediários do (7-cloroquinolin-4-il) tiossemicarbazida em diferentes tempos de exposição frente a linhagens tumorais e não tumorais.
- Avaliar as modificações morfológicas causada pela molécula mais ativa (168) frente a linhagem tumoral KASUMI-1.
- Avaliar o possível mecanismo de perfil de morte celular da molécula 168 frente a linhagem tumoral KASUMI-1.

- Avaliar o efeito sobre o progresso do ciclo celular via citometria de fluxo, após incubação com a molécula 168 frente a linhagem tumoral KASUMI-1.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL UTILIZADO

3.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

As linhagens tumorais foram escolhidas de acordo com incidência e relevância de tais cânceres no contexto mundial. A lista com as linhagens celulares utilizadas e suas respectivas concentrações de plaqueamento encontra-se na tabela 3.

3.1.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Tabela 1. Lista de reagentes e soluções

Reagentes	Solução	Fabricante
Álcool Etfílico Azul	-	Vetec®
Annexin V	FITC conjugado (250uL) e 7-AAD (100uL)	Guava® Nexin
Azul de tripan 10%	10 mg de azul de tripan PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma® Sigma®
Dimetilsufóxido (DMSO)	-	Dinâmica®
Doxorrubicina 1mg/ml	1mg de Doxorrubicina 1mL DMSO	Sigma®
Entellan	-	-
Iodeto de propídeo 50 µg/ml	1 mg de iodeto de propídeo PBS q.s.p. 50 mL	Boehringer®
Meio de cultura de células RPMI 1640	Diluído em água deionizada e esterilizada, filtrado em filtro. Millipore (0,22 µm) e complementado com SBF 10%, 1% de glutamina, 1% de antibiócos, 1% de bicarbonato de sódio (0,75%) e 25 mM e HEPES	Cultilab®

MTT	20 mg de MTT PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma®
Penicilina- Estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL Estreptomicina 10 mg/mL	Cultilab®
Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de sódio 2,14 g de NaHPO ₄ .7H ₂ O 0,276 g de NaHPO ₄ .H ₂ O H ₂ O q.s.p. 1L de solução (ph=7,2)	Labsynth®
Tripsina 0,25%	50 mL de Tripsina 2,5% 0,125 g de EDTA 450 mL de PBS	Proquímios@
TritonX-100	-	Isofar®
Xilol 10%	100 mL de formaldeído H ₂ O q. s. p. 1 L	Dinâmica®
kit panótico rápido	-	Laborclin®

3.1.3 EQUIPAMENTOS

Tabela 2. Lista de equipamentos

Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2
Banho-maria, DELLTA Modelo 105Di
Centrífuga Centimicro, FANEN Modelo 212
Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403
Citômetro de fluxo, Guava
Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter
Fluxo laminar, VECO
Incubadora de células, (CO ₂ Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow Beckman Coulter
Máquina fotográfica digital, Olympus
Microscópio óptico, Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab

Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot

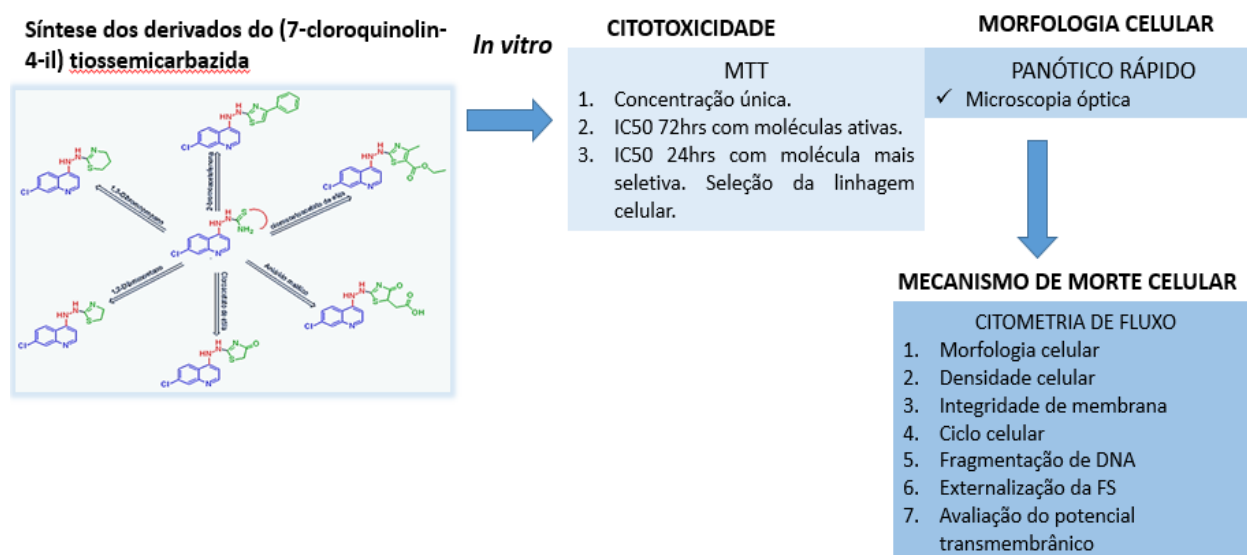
pHmetro, Micronal B474 Pipetas

Pipetas automáticas, Gilson

Sistema de Fotodocumentação, Olympus

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

O desenho experimental abaixo, representa uma sequência cronológica dos eventos de desenvolvimento do presente trabalho, desde a síntese das moléculas até o mecanismo de morte celular.

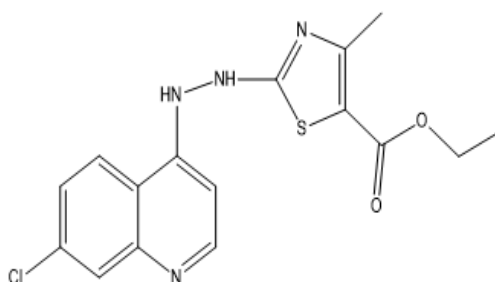


3.3 METODOLOGIA

3.3.1 SINTETIZAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS ATIVOS

As amostras foram sintetizadas pelo mestrando Paulo Fernando da Silva Santos Junior e sob orientação do professor João Xavier de Araujo Júnior da Universidade Federal de Alagoas.

Figura 14. Análogo intermediário, 1-(Z) -etil-2- (2- (7-cloroquinolin-4-il) hidrazono) -4-metil-2,3-diidrotiazol- 5-carboxilato(168).



Fonte: Silva Santos Junior,2017.

Tabela 3. Análogos intermediários do (7-cloroquinolin-4-il) tiossemicarbazida

(1-(Z) -etil-2- (2- (7-cloroquinolin-4-il) hidrazono) -4-metil-2,3-diidrotiazol- 5-carboxilato (168)

(1-(7-cloroquinolin-4-il)-2-(4-feniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazina) (183)

(1-(7-cloroquinolin-4-il)-2-(tiazolidina-2-ilideno)hidrazina) (184)

3.3.2 CITOTOXICIDADE

3.3.2.1 CULTIVO CELULAR

As linhagens celulares utilizadas para avaliação da atividade antiproliferativa foram obtidas a partir da doação pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US-NCI) e suas respectivas concentrações de plaqueamento para o teste do MTT estão descritas na tabela 3

Tabela 4. Linhagens celulares utilizadas no ensaio do MTT

Linhagens celulares	Origem	Concentração de plaqueamento
HL-60 (Leucemia promielolítica)	Humana	$0,3 \times 10^6$ céls/mL
K562 (Leucemia mielóide crônica)	Humana	$0,3 \times 10^6$ céls/mL
PC-3 (Próstata)	Humana	$0,1 \times 10^6$ céls/ mL
KASUMI-1 (Leucemia mielóide aguda)	Humana	$0,1 \times 10^6$ céls/ mL
KG1 (Leucemia mielóide aguda)	Humana	$0,1 \times 10^6$ céls/ mL
SF-295 (Glioblastoma)	Huama	$0,1 \times 10^6$ céls/ mL
L929 (Fibroblasto murina)	Murina	$0,1 \times 10^6$ céls/ mL

As linhagens celulares foram manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical e mantidas em incubadora de CO₂ a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (25 cm² e volume de 50 mL, Corning), utilizou-se o meio de cultura RPMI 1640 ou DMEM ou IMEM complementando com 10% ou 20% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (para uma concentração final de 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina). Para a manutenção de células aderidas, o meio era retirado e a garrafa era lavada 2x com PBS estéril, em seguida, adicionava-se tripsina-EDTA 0,5% (Gibco) diluída 10X em solução tampão (PBS, do inglês Phosphate Buffer Solution) e deixada por cinco minutos na incubadora, a fim de desaderir as células. Depois de desaderidas, a ação da tripsina era inibida pela adição de meio suplementado com SBF. Parte das células eram removidas da garrafa e o volume era preenchido com meio completo. Para manutenção de células suspensas, apenas trocava-se o meio.

3.3.2.2 TESTE DO MTT

PRINCIPIO DO TESTE

O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT) para formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável (MOSMANN, 1983), assim, sendo possível, quantificar a porcentagem de células viáveis para este método

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em placas de 96 poços em densidade entre $0,1 \times 10^6$ e $0,3 \times 10^6$ células/mL (ajustado para cada linhagem, como mostrado na tabela 3). As células foram incubadas durante 24 horas sem amostra e pelo período de 72 horas ou 24 horas juntamente com a (s) amostra (s) testada (s). Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada poço recebeu 100 μ L da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e foi reincubada durante 3 horas em estufa a 37°C e a 5% CO₂. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspensionado em 100 μ L de DMSO para a quantificação do sal reduzido (formazan) nas células vivas. As absorbâncias foram mensuradas através do espectrofotômetro de placa utilizando o programa Mutimode Detection Software (Beckman Coulter Inc.) no comprimento de onda de 595 nm.

ANÁLISE DE DADOS

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos desvios-padrões. O gráfico absorbância x concentração foi registrado e determinado a sua concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CI50) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%), realizados a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism Software versão 6.0.

3.3.2.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA

PRINCÍPIO DO TESTE

A coloração com kit panótico rápido (Laborclin®) permite a visualização das características morfológicas das células por meio da coloração diferenciada da membrana celular, do citoplasma e do núcleo, sendo utilizado para sugerir o possível mecanismo de morte celular, seja por apoptose, necrose ou autofagia.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As células KASUMI-1 em suspensão foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de 2×10^5 células/mL e incubadas por 24 horas com a amostra nas concentrações de 5, 10 e 20 μM . A doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo na concentração de 2 μM , e o controle negativo foi tratado apenas com o veículo (DMSO). Após os períodos de incubação, as células foram transferidas para tubos eppendorf e centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 1 mL de PBS. As lâminas foram preparadas com o uso de uma Citocentrífuga (modelo CT- 2000, Cientec). Em seguida, as lâminas foram fixadas com solução de triarilmetano a 0,1%, coradas com solução a 0,1% de xantenos e com solução de 0,1% de tiazinas (Laborclin®). O tempo de imersão em cada solução foi de aproximadamente 5 segundos. As lâminas foram lavadas com água destilada para remover o excesso de corante. Depois de secas foram montadas com lamínulas fixadas com Entellan® e visualizadas em microscópio óptico.

3.3.3 ESTUDO DE MECANISMO DE AÇÃO

3.3.3.1 CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma importante alternativa de estudo dos eventos celulares, células são individualmente conduzidas em canal de corrente fluida, em que, ao interceptar o feixe de luz, geralmente proveniente de um laser, causam sua dispersão em várias direções dependendo do tamanho, da estrutura interna, das características topográficas e da densidade óptica de cada célula. A detecção de um feixe de luz que passa pela partícula com um mínimo de desvio está relacionada com o tamanho celular, que se dá por dispersão linear (FSC, Forward Scatter), enquanto que a captação de um desvio ortogonal está relacionada com a complexidade da célula, em particular sua granuloseidade, que ocorre por

dispersão lateral (SSC, Side Scatter). Além disso, é capaz de detectar a fluorescência emitida por marcadores utilizados, classificando cada célula com um evento (SHAPIRO, 1995). No citômetro, para todos os compostos testados, dez mil eventos foram avaliados por experimento e os debris celulares foram omitidos da análise. As fluorescências de células de KASUMI-1 foram então determinadas por citômetro de fluxo Guava easyCyte™ 6-2L. Dez mil eventos foram analisados para cada replicata em pelo menos três experimentos independentes.

3.3.3.2 DETERMINAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA, DENSIDADE, MORFOLOGIA CELULAR E CRESCIMENTO CELULAR

PRINCÍPIO DO TESTE

O teste se baseia na capacidade do iodeto de propídeo (PI, do inglês, Propidium Iodide) de penetrar nas células, cuja membrana esteja rompida (não-viáveis), e se ligar ao DNA, emitindo alta fluorescência vermelha quando é excitado pelo laser. As células com membrana íntegra emitem baixa fluorescência (SHAPIRO, 1995).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Após o período de 24 horas uma alíquota de 100 µL de suspensão de células da linhagem KASUMI-1 tratadas e não tratadas foi incubada com 100 µL de uma solução de PI a 50 µg/mL (diluído em tampão fosfato). Após 5 minutos as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. (DARZYNKIEWICZ et al., 1992).

ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram submetidos ao teste de normalidade e depois comparados por análise de variância (ANOVA), seguida por Teste de Newman Keuls, com nível de significância de 5%. ($p < 0,05$). A morfologia celular foi analisada pelo programa FlowJO 10.

3.3.3.3 ANÁLISE DE CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DE DNA

PRINCÍPIO DO TESTE

Esse teste baseia-se na capacidade do PI de se ligar ao DNA. Inicialmente, a membrana plasmática das células foi permeabilizada por um detergente, permitindo que o iodeto de propídeo ligue-se ao DNA de todas as células. Células com o núcleo íntegro emitirão alta fluorescência, e aquelas que apresentam núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado incorporam menos o iodeto de propídeo e por isso emitem menor fluorescência. Além disso, o PI se intercala proporcionalmente à quantidade de DNA da célula, permitindo mensurar as fases do ciclo celular por meio da quantidade de DNA presente em cada fase do ciclo.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Uma alíquota de 100 µL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100 µL de uma solução de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1 % de Triton X-100 e 2 µg/mL iodeto de propídeo em PBS). Após o período de incubação por 40 minutos no escuro, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo.

ANÁLISE DE DADOS

Os gráficos do ciclo celular foram analisados no programa ModFit LT (Verity Software House)

3.3.3.4 AVALIAÇÃO DA EXTERNALIZAÇÃO DA FOSFATIDILSERINA-ANEXINA V

PRINCÍPIO DO TESTE

A translocação da fosfatidilserina (PS, do inglês phosphatidylserine), um fosfolípido normalmente localizado na face interna da membrana plasmática para a face externa da célula, é um evento associado aos primeiros estágios do processo de apoptose. Este ensaio permite diferenciar células viáveis, apoptóticas e necróticas pela coloração diferencial por fluorescência. Anexina-V é uma proteína com alta afinidade por PS e que, conjugada à ficoeritrina (PE, do inglês Phycoerythrin), emite fluorescência amarela quando ligada, possibilitando a identificação de células em apoptose. O corante 7-AAD penetra as

membranas celulares desintegradas e se liga ao núcleo, emitindo fluorescência vermelha. A estratégia da coloração dupla fornecida pelo reagente Guava® Nexin permite a identificação de quatro populações distintas: células sem marcação são consideradas normais (ou viáveis); células com coloração amarela são tidas como em apoptose inicial; células vermelhas são consideradas necróticas; e células reconhecidas pelos dois corantes são identificadas como em apoptose tardia, pois, nos estágios finais, as membranas das células apoptóticas perdem a integridade.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Após o tratamento por 24 horas, uma alíquota de 100 µL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100 µL da solução de Guava Nexin® (Guava Technologies). Após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente no escuro, as amostras foram lidas no citômetro de fluxo. A fluorescência da anexina V conjugada com a ficoeritrina foi mensurada por fluorescência amarela a 583nm e o 7AAD na fluorescência vermelha a 680nm. As percentagens de células viáveis e de células em apoptose inicial e tardia foram calculadas.

ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram analisados a partir da média e do desvio padrão da média de 3 experimentos realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram submetidos ao teste de normalidade e depois comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Newman Keuls, com nível de significância de 5%. ($p < 0,05$).

3.3.3.5 ESTUDO DOS EFEITOS DO COMPOSTO SINTÉTICO SOBRE O POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO MITOCONDRIAL ($\Delta\psi_m$) DA CÉLULA KASUMI-1

PRINCÍPIO DO TESTE

A rodamina 123, um corante fluorescente nucleofílico, o qual é sequestrado para dentro da mitocôndria quando esta apresenta $\Delta\psi_m$ inalterado. Assim, as células viáveis emitirão alta fluorescência verde devido à maior quantidade de rodamina 123 ligada às cargas positivas internas, enquanto que as mitocôndrias despolarizadas terão menor afinidade pelo corante, gerando eventos que emitirão menor fluorescência. Deste modo, este

ensaio foi utilizado para a investigação da ativação da via apoptótica intrínseca por parte da substância em estudo através da observação da alteração do $\Delta\psi_m$ (MARCHETTI et al., 1996).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A determinação do $\Delta\psi_m$ foi avaliada por citometria de fluxo utilizando a rodamina 123 como agente fluorogênico. As células (KASUMI-1) foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com a amostra 168 (5, 10 e 20 μM) pelo período de 24 horas. Após os tratamentos, uma alíquota de 50 μL da suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e incubada por 15 minutos com 200 μL de solução de rodamina 123 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS), na ausência de luz e a 37 °C. Após o período de incubação as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspensionado em PBS e reincubado por 30 minutos e, então, analisadas por citometria de fluxo (MILITÃO et al., 2006). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas.

ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Turkey ($p < 0,05$) utilizando o programa Prism versão 6.0.

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS DERIVADOS SINTÉTICOS HÍBRIDOS QUINOLÍNICOS E TIAZODILÍNICOS

A ação antiproliferativa dos análogos intermediários do (7-cloroquinolin-4-il) tiossemicarbazida foram avaliados *in vitro*, através do teste de concentração única na qual as seis moléculas foram testadas na concentração de 30 μM , frente as três linhagens de screening inicial SF-295, HL-60 e PC-3, utilizando o teste colorimétrico do MTT. Os valores de redução de viabilidade celular em (RVC %) estão descritos na tabela 5 com seus respectivos valores de erro padrão da média.

Tabela 5. Avaliação citotóxica dos análogos sintéticos derivados do (7-cloroquinolin-4-il) tiossemicarbazida em concentração única frente a três linhagens tumorais, avaliados pelo método do MTT após 72 horas de incubação.

Amostras	Linhagens Celulares					
	SF-295		HL-60		PC-3	
	RVC %	EPM	RVC %	EPM	RVC %	EPM
168	50.3	0.7	93.2	0.5	98.8	0.2
170	2.5	2.5	34.5	1.2	12.3	3.2
185	25.8	0.9	19.4	5.9	10.1	4.6
169	18.2	0.5	40.8	3.0	17.2	2.9
184	40.0	1.7	70.4	1.3	32.2	2.4
183	79.3	0.9	91.3	0.6	79.8	1.9

Os dados estão apresentados como percentuais de redução da viabilidade celular (RVC % \pm EPM) na concentração de 10 μ g/mL, obtidos pelo Programa GraphPad Prism versão 6.0, a partir de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicada após 72 h de incubação.

A tabela 5 demonstra que de todos os seis análogos sintéticos derivados do (7-cloroquinolin-4-il) tiossemicarbazida, somente os compostos 168, 183 e 184, apresentaram atividade muita atividade citotóxica, já que estes análogos foram capazes de reduzir a viabilidade celular (RVC) > 70% em pelo menos uma linhagem celular. Onde na linhagem celular SF-295, os análogos 168,184 e 183 apresentaram os seguintes valores de redução de viabilidade celular (RVC) 50.3%(\pm 0.7), 79.3(\pm 0.9) e 40%(\pm 1.7), respectivamente. Já na linhagem HL-60 os três análogos apresentaram atividade antitumoral efetiva com os valores de RVC de 93.2%(\pm 0.5), 70.4%(\pm 1.3), e 91.3%(\pm 0.6), para os análogos 168,184 e 183, respectivamente. Por fim, na linhagem PC-3, o análogo 168 apresentou um RVC de 98.8%(\pm 0.2), o análogo 184 mostrou um RVC de 32.2%(\pm 2.4) e o composto 183 apresentou um RVC de 79.8% (\pm 1.9).

Sendo assim, os derivados sintéticos 168, 183 e 184 foram selecionados para determinar os seus valores de CI₅₀ frente a quatro linhagens tumorais (SF-295, HL-60, PC-3 e HCT-116) e em uma linhagem não tumoral murina (L929), utilizando o teste colorimétrico do MTT. Para este experimento a doxorubicina foi utilizada como controle positivo. Os valores de CI₅₀ estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Avaliação da atividade citotóxica dos compostos sintéticos 168, 183 e 184 frente as linhagens de células tumorais e não tumoral avaliados pelo ensaio do MTT após 72 horas de incubação.

Compostos	HCT-116	PC-3	HL-60	SF-295	L929
168	14.99 μ M (14,01 – 16,03)	20.7 μ M (18.3 – 23.2)	2.41 μ M (2.02 – 2.87)	25 μ M (21.21 – 30.21)	> 25 μ M
183	17.74 μ M (15.80 – 19.91)	> 30 μ M	14.72 μ M (12.72 – 17.04)	> 30 μ M	>30 μ M
184	>35 μ M	>35 μ M	25.5 μ M (20.5 – 31.3)	>35 μ M	>35 μ M
DOX	0,12 μ M (0.09-0.17)	0,76 μ M (0.59-0.93)	0,02 μ M (0.01-0.02)	0,24 μ M (0.2-0.27)	0,66 μ M (0.49-0.83)

^a Os dados estão apresentados como valores de CI_{50} ou CE_{50} em μ M e o intervalo de confiança. Obtidos por regressão não-linear pelo Programa GraphPad Prism versão 6.0, a partir de 3 experimentos independentes realizados em duplicata após 72 h (células de câncer).

^b Doxorubicina (Dox) foi utilizada como controle positivo.

Na tabela 6 é possível visualizar que na linhagem HCT-116 (Câncer de cólon), compostos sintéticos 168, 183 e 184 apresentaram valor de CI_{50} de 14.99 μ M (14,01 – 16,03), 17.74 μ M (15.80 – 19.91) e > 35 μ M. Na linhagem celular PC-3 somente o análogo 168 apresentou valor de CI_{50} menor que 30 μ M, sendo seu valor de CI_{50} de 20.7 μ M (18.3 – 23.2). Entretanto na linhagem celular HL-60 os 168, 183 e 184 apresentaram os seus melhores valores de CI_{50} sendo de 2.41 μ M (2.02 – 2.87), 14.72 μ M (12.72 – 17.04) e 25.5 μ M (20.5 – 31.3), respectivamente. Na linhagem SF-295 o análogo 168 apresentou CI_{50} de 25 μ M (21.21 – 30.21), já os análogos 183 e 184 apresentaram valores de CI_{50} maior que 30 μ M. Entretanto, na linhagem não tumoral murina (L929), os análogos 168, 183 e 184 não apresentaram potencial citotóxico, com isso mostrando serem seletivos para linhagens tumorais. Sendo assim, os análogos 168, 183 e 184 apresentaram um valor de índice de seletividade aproximado de 10, 2 e 1.3 respectivamente, quando comparado aos valores de CI_{50} encontrados na linhagem não tumoral L929 com os valores da linhagem HL-60.

Devido aos resultados acima apresentado, o análogo 168 foi o que mostrou maior atividade citotóxica para a linhagem leucêmica (HL-60) quando comparado aos outros análogos. Por isso, o análogo 168 foi selecionado para ser testado frente a um painel expandido de quatro linhagens leucêmicas (HL-60, KG1, KASUMI-1 e K562), utilizando o teste colorimétrico do MTT. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo do experimento. Os valores de CI_{50} estão apresentados na tabela 7. A **figura 15** demonstra a curva de ação da substância 168 frente as linhagens leucêmicas no tempo de incubação de 24 horas.

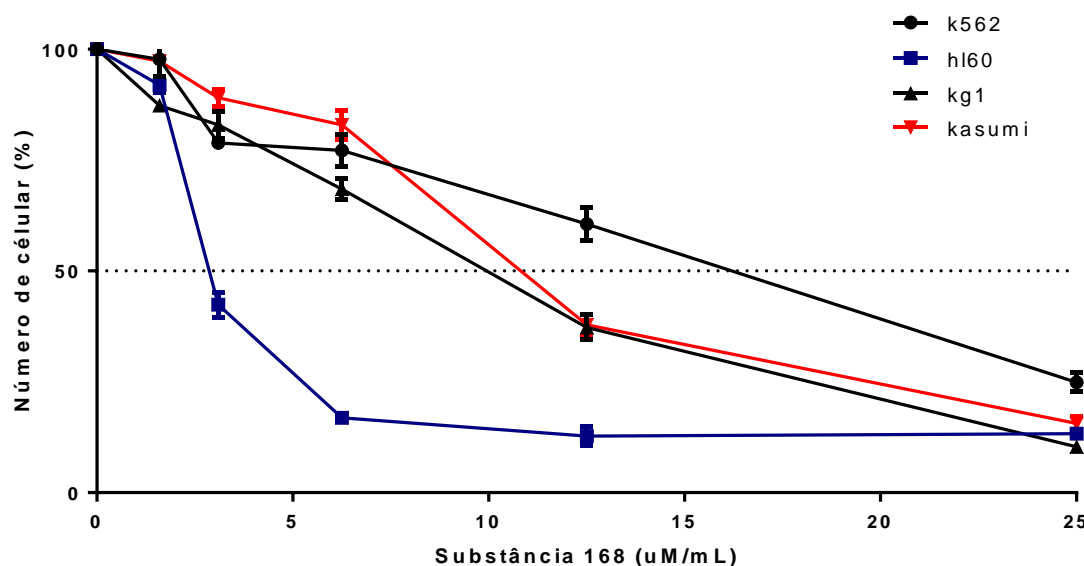
Tabela 7. Avaliação da citotoxicidade do composto 168 frente a linhagens leucêmicas avaliadas pelo método do MTT após de 24 horas de incubação.

Compostos	K562	HL-60	KG1	KASUMI-1
168	13.65 μ M (11.46 - 16.24)	3.011 μ M (2.709 - 3.346)	9 μ M (8.094 -9.984)	10.79 μ M (9.860 - 11.81)
DOX	0,12 μ M (0.09-0.17)	0,76 μ M (0.59-0.93)	0,02 μ M (0.01-0.02)	0,24 μ M (0.2-0.27)

a Os dados estão apresentados como valores de CI₅₀ ou CE₅₀ em μ M e o intervalo de confiança 95%. Obtidos por regressão não-linear pelo Programa GraphPad Prism versão 6.0, a partir de 3 experimentos independentes realizados em duplicata após 24 h (células de câncer).

b Doxorubicina (Dox) foi utilizada como controle positivo.

Figura 15. Curva de ação antiproliferativa da substância 168 em 4 linhagens leucêmicas após incubação por 24 horas.



Na tabela 6, é possível avaliar que o análogo 168 apresentou seu menor valor de CI₅₀ de 3.011(2.709 - 3.346), na linhagem HL-60 (leucemia promieloblastica) e o seu maior valor de CI₅₀ de 13.65 μ M (11.46 - 16.24) foi encontrado na linhagem K562 (leucemia mielóide crônica). Para as linhagens de leucemia mielóide aguda, KG1 e KASUMI-1 os valores de CI₅₀ foram 9 μ M (8.094 -9.984) e 10.79 μ M (9.860 - 11.81), respectivamente. A linhagem HL-60 mostrou-se mais sensível à ação do análogo 168, porém foi decidido trabalhar com a linhagem KASUMI-1, já que trata-se de um tipo de leucemia mais agressiva e porque essa linhagem apresenta uma translocação cromossômica presente em diversos casos de leucemia mielóide aguda. Por esses fatores apresentados, para os próximos experimentos foi decidido trabalhar com a linhagem KASUMI-1. Na figura 15 é possível observar que o análogo 168 causa um deslocamento acentuado da curva na linhagem HL-60

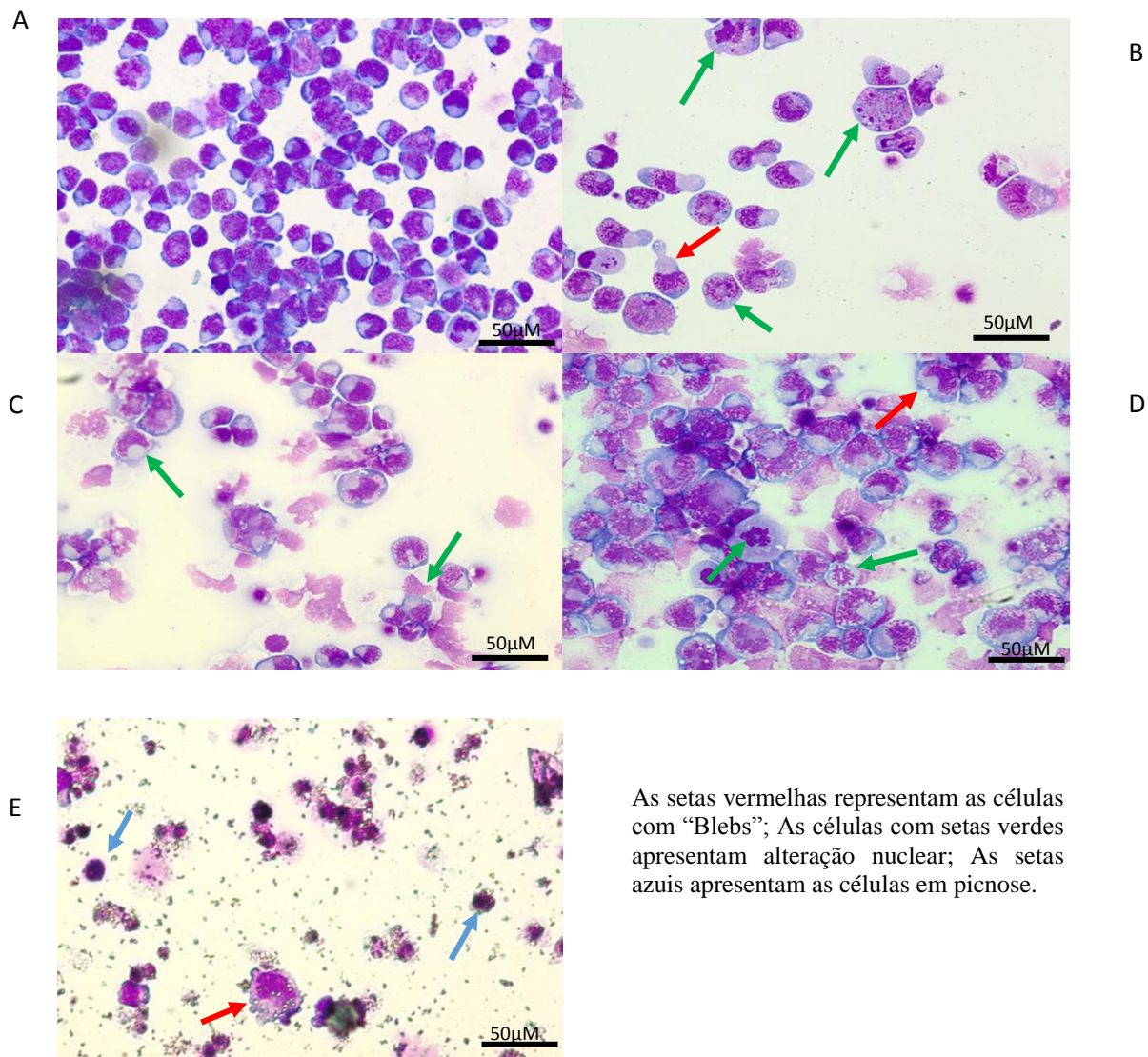
para a esquerda, no entanto nas outras linhagens testadas, o composto 168 causa um leve deslocamento para a esquerda, sendo o menor na linhagem K562, reforçando o que foi observado na tabela 6. Além disso, é possível observar que ação do análogo 168 possui um perfil de ação concentração dependente nas linhagens HL-60, KG1, KASUMI-1 e K562, pois com o aumento da concentração, ocorre uma diminuição do número de células viáveis.

4.2 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DA LINHAGEM KASUMI-1 APÓS O TRATAMENTO COM O COMPOSTO 168

As células da linhagem KASUMI-1 são caracterizadas por serem pequenas, arredondadas, por crescerem de forma individual e em pequenos grupos. A célula tem um núcleo e um citoplasma bem definido. A análise das células tratadas e não tratadas com a amostra 168 foi realizada com o kit panótico rápido utilizando um microscópio invertido óptico acoplado a uma câmera fotográfica (**Figura 16**). A droga doxorrubicina foi utilizada como controle positivo do experimento.

Na figura 16, a imagem A representa o controle negativo, onde as células não receberam nenhum tratamento. Nessa figura é possível observar que as células apresentam um núcleo bem condensado e um citoplasma definido. A imagem B representa as células da KASUMI-1 que foram tratadas com doxorrubicina, sendo possível observar uma diminuição do número de células, com um aumento de condensação do núcleo e uma retração do citoplasma. Além disso, em algumas células observa-se a presença de prolongamentos citoplasmáticos “blebs”, indicando um estágio tardio de morte celular por apoptose. A imagem C representa as células tratadas com o análogo 168 na concentração de 5 μM . É possível observar na imagem C células com uma condensação no núcleo. Já na imagem D as células foram tratadas com o análogo 168 na concentração de 10 μM e as células apresentaram uma maior condensação nuclear, acompanhadas de uma perda na morfologia da célula, além disso é possível visualizar células com “blebs” em sua membrana. Por fim, a imagem E mostra as células que foram tratadas com o análogo 168 na concentração de 20 μM . Nesta última imagem é possível observar que grande parte das células estão em picnose com uma total retração do citoplasma, sendo possível visualizar somente o núcleo, como também algumas células apresentam a presença de prolongamentos citoplasmáticos “Blebs”, indicando um estágio tardio de morte celular por apoptose.

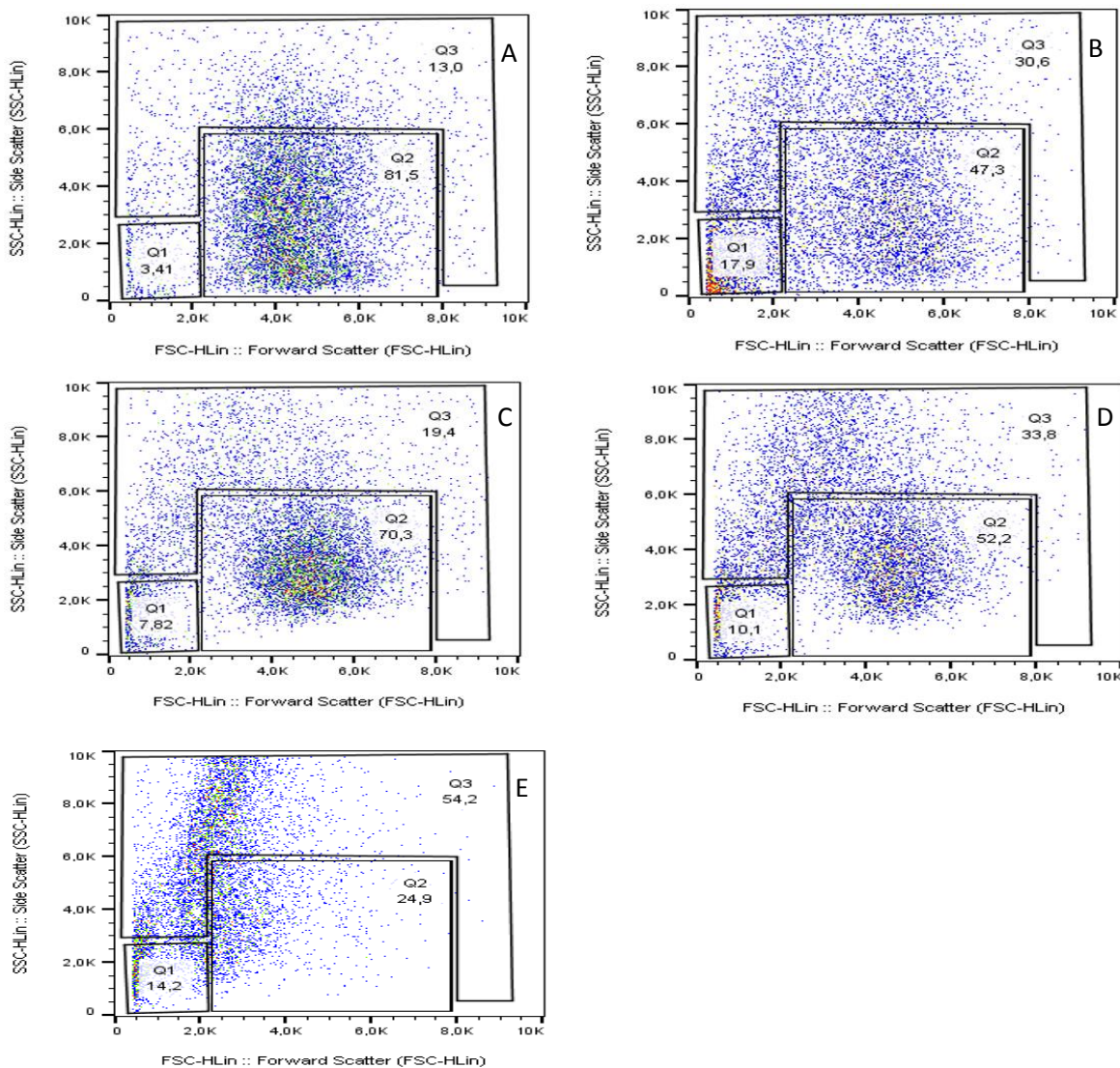
Figura 16. Imagens da morfologia das células de KASUMI-1 após período de incubação de 24 horas. Coradas com kit panótico rápido. Células visualizadas por microscopia óptica no aumento de 20x. (A e B) Controle negativo e doxorrubicina (2 μM), respectivamente. Células tratadas com a molécula 168 5 μM , 10 μM , 20 μM (C, D e E), respectivamente.



4.2.1 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DA LINHAGEM KASUMI-1 POR CITOMETRIA DE FLUXO

As células foram tratadas com a molécula 168 nas concentrações de 5 μM , 10 μM e 20 μM e analisado os parâmetros de tamanho celular (Forward scatter) e a granulidade celular (Side scatter) (**Figura 17**). Para este experimento a doxorrubicina foi utilizada como controle positivo em uma concentração de 2 μM . As análises das populações de células foram feitas através do programa FlowJ0 10.

Figura 17. Populações de células pelos parâmetros de tamanho celular (Forward scatter) e de granulosidade (Side scatter). Células avaliadas por técnica de citometria de fluxo. Controle negativo (A), controle positivo (B), células tratadas com a amostra 168 nas concentrações de 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M (C,D e E), respectivamente.



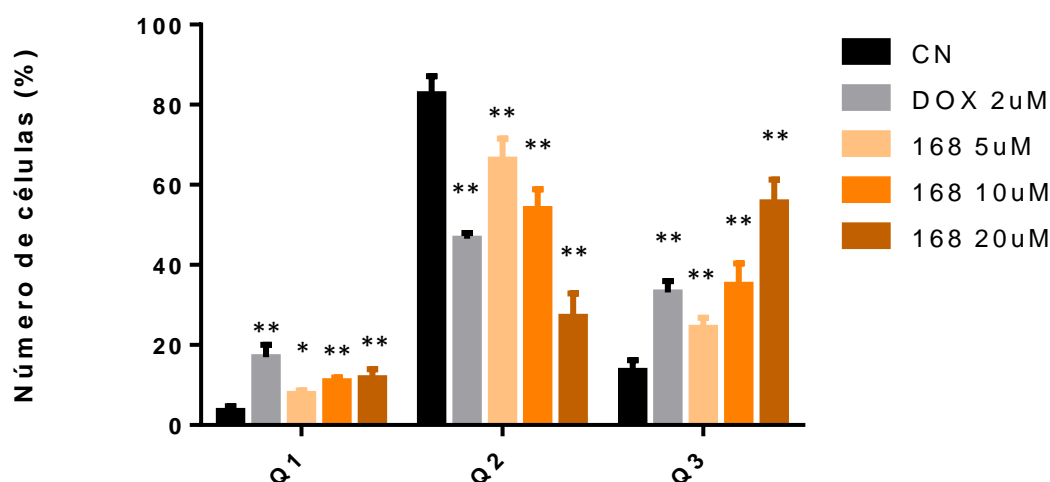
Q1 representa a população de células em picnose; Q2 representa a população padrão; Q3 população com variação de tamanho e de granulosidade.

Na **figura 17** é possível observar que as células do controle negativo (A), em sua grande parte encontram-se no grupo de população padrão (Q2), com uma pequena parcela no grupo de população com variação de tamanho e variação de granulosidade (Q3) e uma minoria das células em picnose (Q1). Nas células tratadas com doxorubicina (B), ocorreu uma mudança na população de células, com um aumento do número de células com maior granulosidade e das células em picnose, quando comparado ao controle negativo. Em C as células foram tratadas com o análogo 168 na concentração de 5 μ M e apresentaram uma diminuição do número de células da população padrão e um leve aumento das células em

Q1 e Q3. Já nas células tratadas com o análogo 168 na concentração de 10 μM , ocorre uma diminuição das células na população padrão e um aumento de células em Q1 e Q3. O mesmo perfil de mudança é observado nas células tratadas com o análogo 168 na concentração de 20 μM , entretanto de uma forma bem mais exacerbada, onde ocorre uma significativa redução da população padrão, e aumento das células em Q1 e Q3 quando comparados com o controle negativo.

A figura 18 representa estatisticamente as imagens observadas na figura 17. As células tratadas com doxorubicina apresentaram diferença estatísticas de $p < 0.0001$ nas três populações de células, Q1, Q2 e Q3, onde a população Q3 no controle negativo foi de 13.5% (± 2.6) enquanto que no controle positivo foi de 33.1% (± 2.8), sendo este quadrante o que apresentou maior aumento percentual. Nas células tratadas com o análogo 168 ocorreu uma diminuição gradativa da população Q2 com diferença estatística de $p < 0.0001$ em todas as concentrações testadas com valores de 66.2% (± 5.2), 54% (± 4.8) e 27% (± 5.8) para as concentrações de 5 μM , 10 μM e 20 μM , respectivamente, quando comparado ao controle negativo, que apresentou valor de 82.6% (± 4.5). Como também ocorreu um aumento gradativo na população de Q3 nas concentrações de 5 μM , 10 μM e 20 μM , com valores de 24.3% (± 2.4), 35% (± 5.3) e 55.5% (± 5.7), respectivamente, ao comparar com o controle negativo obteve valor de 13.5% (± 2.6), sendo essa diferença estatística com $p < 0.0001$ para todas as concentrações testadas do análogo 168. No que se remete a população das células em picnose (Q1), as concentrações de 5 μM , 10 μM e 20 μM induzem um aumento das células em picnose, apresentando valores de 7.8% (± 0.8), 11% (± 0.8) e 12% (± 2.1), respectivamente. Estes valores quando comparados com o controle negativo apresentam diferença estatística de $p < 0.0001$ para todas as concentrações, exceto para de 5 μM que obteve uma diferença estatística de $p < 0,001$.

Figura 18. Efeito da substância 168 sobre a morfologia celular das células KASUMI-1, avaliado por granulosidade e tamanho celular, determinada por citometria de fluxo.



O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas.

A doxorubicina 2 μM (DOX) foi utilizada como controle positivo.

A amostra 168 foi utilizada nas concentrações 5 μM , 10 μM e 20 μM .

Os dados correspondem à média \pm E.P.M de três experimentos independentes. * $p < 0,001$, ** $p < 0,0001$; comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Turkey.

4.3 ESTUDO DO MECANISMO DE MORTE DA LINHAGEM CELULAR KASUMI-1.

Para a avaliação do mecanismo de morte da linhagem celular KASUMI-1 induzida pelo análogo 168, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo para avaliar a integridade da membrana, densidade de células, o perfil do ciclo celular, como também o padrão de morte celular após o tratamento por 24 horas. As concentrações utilizadas nesses testes basearam-se no valor de CI_{50} obtido pelo teste do MTT após 24 horas de incubação. Assim, as células foram tratadas com o veículo (controle negativo), doxorubicina (Dox, 2 μM) ou análogo 168 (5 μM , 10 μM e 20 μM).

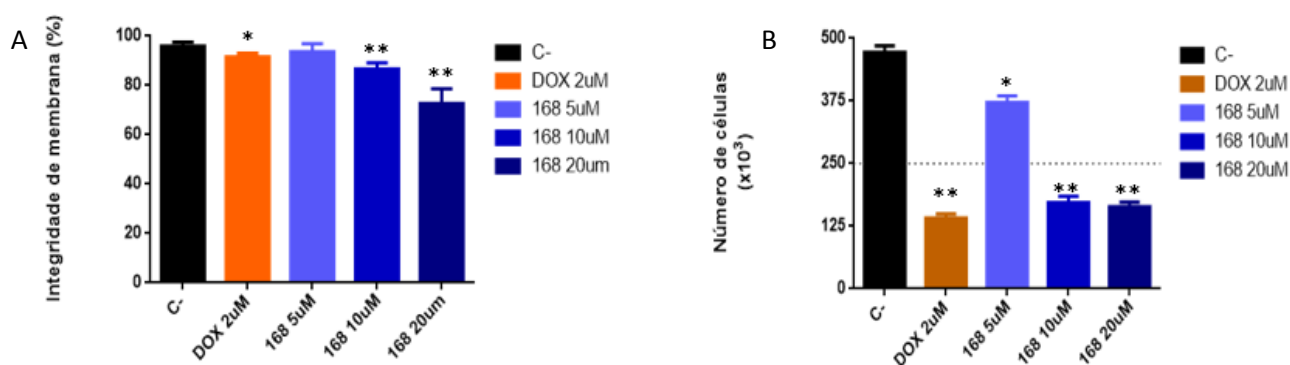
4.3.1 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA E DA DENSIDADE CELULAR

Na análise da integridade de membrana das células, como mostra a **figura 19A**, nas células do controle negativo 96% ($\pm 0,4$) das células apresentam uma membrana íntegra, o mesmo é possível observar com as células tratadas com o análogo 168 na concentração de

5 μM que apresentou valor de 94%(± 0.9), não havendo diferença estatística em relação ao controle negativo. Ao avaliar a concentração de 10 μM houve uma diferença estatística em relação ao controle negativo com $p < 0.0001$, no qual o valor de células com a membrana íntegra foi de 86%(± 0.9). Na maior concentração se obteve um menor número de células com a membrana íntegra com um valor de 72.6%(± 2), representando uma diferença estatística de $p < 0.0001$ em relação ao controle negativo. Sendo assim, é possível dizer que a capacidade da molécula 168 de induzir modificação na integridade de membrana da KASUMI-1 é concentração dependente.

No que se refere a densidade celular **figura 19B**, as células do controle negativo cresceram 472×10^3 células. Nas células tratadas com o análogo 168 na concentração de 5 μM é possível observar que as células reduziram seu número para 372×10^3 células, mostrando uma diferença estatística de $p < 0,05$ em relação ao controle negativo. Nas concentrações de 10 μM e 20 μM a capacidade de reduzir o crescimento das células foi de 172.1×10^3 e 164×10^3 células, respectivamente, com uma diferença estatística de $p < 0.0001$, em relação ao controle negativo. Com esses dados, torna-se evidente que o análogo 168 nas três concentrações testadas (5 μM , 10 μM e 20 μM) consegue inibir a proliferação celular da KASUMI-1 no tempo de 24 horas. O controle positivo alterou a integridade de membrana e inibiu a proliferação celular.

Figura 19. Efeito do análogo 168 sobre a proliferação celular das células KASUMI-1, avaliado pela integridade de membrana (A) e número de células (B), determinada por citometria de fluxo.



O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas.

A doxorubicina 2 μM (DOX) foi utilizada como controle positivo.

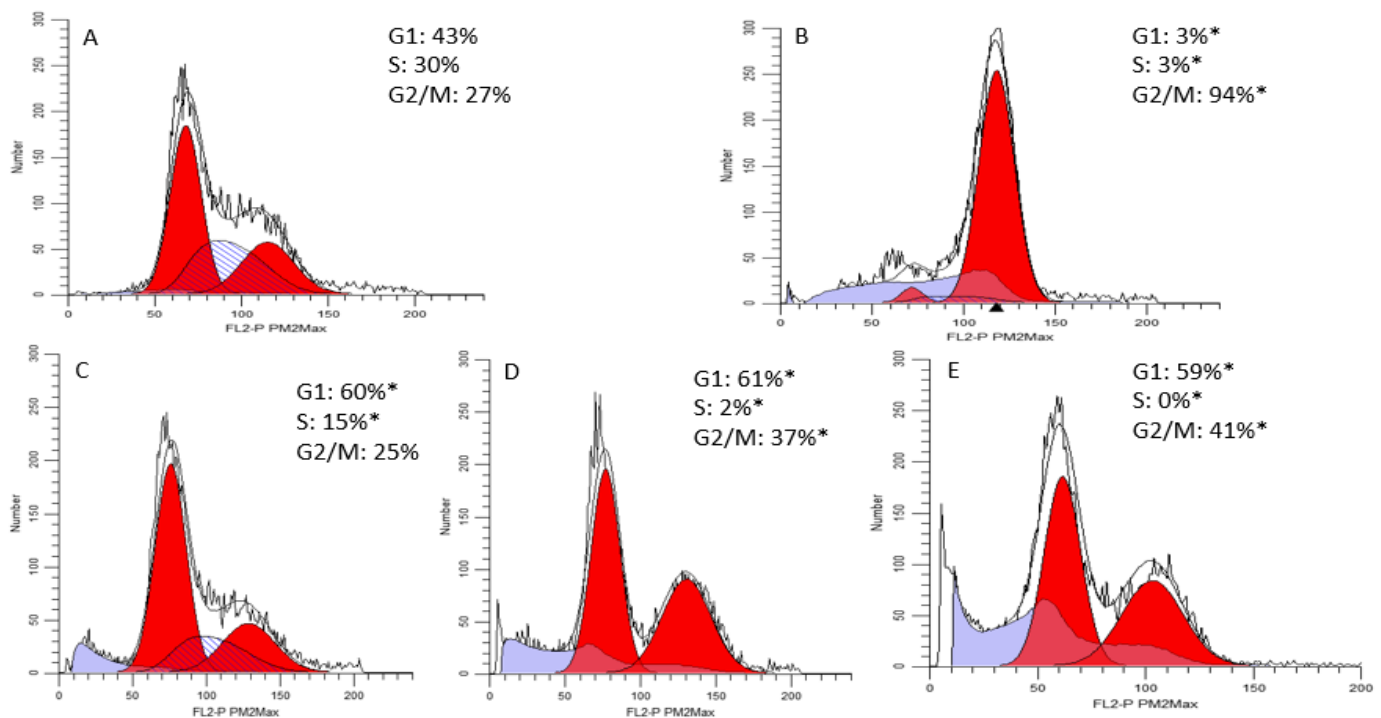
A amostra 168 foi utilizada nas concentrações 5 μM , 10 μM e 20 μM .

Os dados correspondem à média \pm E.P.M de três experimentos independentes. * $p < 0,001$, ** $p < 0.0001$; comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Turkey.

4.3.2 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS KASUMI-1

Na análise do ciclo celular da KASUMI-1 o controle negativo apresentou 43%(±1) em G0/G1, 30%(±1.4) em S e 27%(±0.5) em G2/M. O análogo 168 na concentração de 5 µM alterou o perfil do ciclo celular, apresentando 60%(±1.2) em G1 com diminuição da população em S para 15%(±2.3) e mantendo-se constante a população de G2/M 25%(±1.4). Para esta concentração ocorreu diferença estatística de $p < 0,0001$ para as populações de células em G1 e S, sem diferença estatística quando comparada a fase de G2/M em relação ao controle negativo. Já para a concentração de 10 µM do análogo 168, observa-se uma população de 61%(±1.2) em G1, 2%(±1.1) em S e de 37%(±1.2) em G2/M, com isso ocorrendo diferença estatística de $p < 0,0001$ em relação a todas as fases do ciclo celular, quando comparado ao controle negativo. Por fim, a concentração de 20 µM apresentou um perfil de ciclo celular parecido com a concentração anterior, na qual apresentou 59%(±1.5) das células em G1, 0%(±0.4) em S e 41%(±1.6) em G2/M, novamente, apresentando diferença estatística de $p < 0,0001$ em todas as fases do ciclo celular. Com estes dados é possível inferir que o análogo 168 induz uma parada de ciclo celular na fase G1 em todas as concentrações testadas, seguido de uma parada significativa de células em G2/M nas concentrações de 10 µM e 20 µM. As células KASUMI-1 tratadas com a doxorrubicina apresentaram um perfil de ciclo celular de 3%(±0.2) em G1, 3%(±0.4) e 94%(±0.5), apresentando diferença estatística de $p < 0,0001$ em todas as fases do ciclo celular, quando comparado ao controle negativo.

Figura 20. Análise do ciclo celular das células da KASUMI-1 tratadas com a molécula 168. Células avaliadas por técnica de citometria. Controle negativo (A), controle positivo (B), células tratadas com a amostra 168 nas concentrações de 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M (C,D e E), respectivamente.



O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas.

A doxorrubicina 2 μ M (DOX) foi utilizada como controle positivo.

A amostra 168 foi utilizada nas concentrações 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M.

Os gráficos apresentados foram obtidos utilizando o programa ModFit LT. *, $p < 0,0001$ comparado como controle por ANOVA seguido de teste de Turkey. Ilustração de uma replicata representativa de cada experimento.

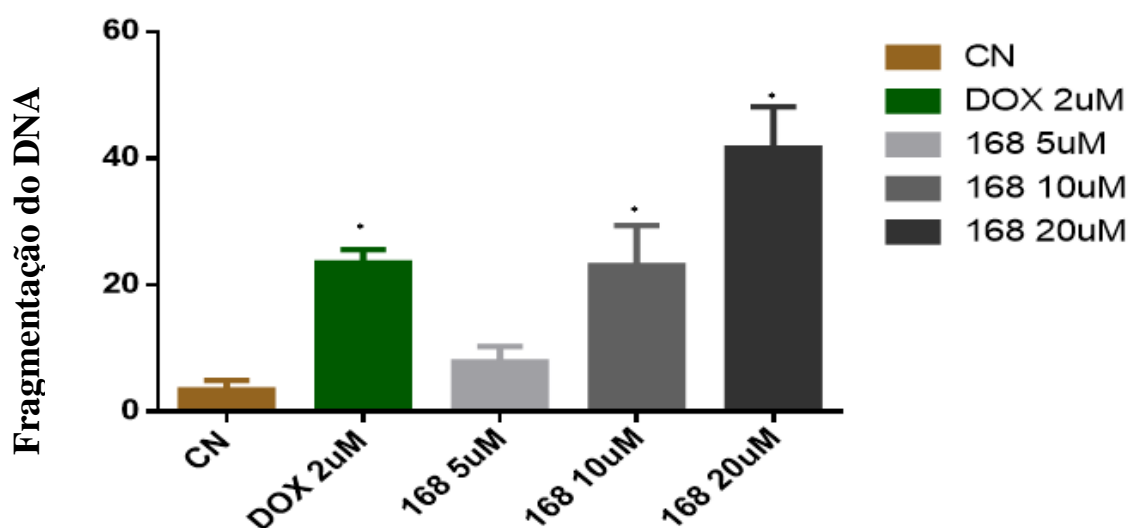
4.3.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MORTE CELULAR

A fragmentação de DNA é uma característica de morte celular por via apoptótica, para avaliar se a molécula 168 induz fragmentação de DNA nas células da KASUMI-1 foi utilizado o mesmo procedimento experimental do ciclo celular. A fragmentação do DNA é observada por um pico no subG1 que aparece antes da fase G0/G1, isso ocorre devido à pouca incorporação de iodeto de propídio(PI) pelas células em subG1.

Na **figura 21** é possível visualizar que a ocorrência de fragmentação internucleossomal nas células do controle negativo é de somente 3,7%(\pm 0,6). Nas células tratadas com o análogo 168 na concentração de 5 μ M a fragmentação foi de apenas 7.1%(\pm 0.6), não apresentando diferença estatística em relação ao controle negativo. Entretanto nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M, os valores de fragmentação

internucleossomal foram de 23%(±2.5) e 42%(±2.5), respectivamente, e ambos apresentaram diferença estatística de $p < 0,0001$. Sendo assim, este resultado demonstra que o análogo 168 induz fragmentação de DNA nas concentrações de 10 μM e 20 μM , de concentração dependente e além disso sugere uma morte por via apoptótica. A doxorubicina também induziu a fragmentação de DNA de forma significativa $p < 0,0001$, em relação ao controle negativo.

Figura 21. Efeito da amostra 168 sobre a fragmentação de DNA das células KASUMI-1, determinada por citometria de fluxo.



O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas.

A doxorubicina 2 μM (DOX) foi utilizada como controle positivo.

A amostra 168 foi utilizada nas concentrações 5 μM , 10 μM e 20 μM .

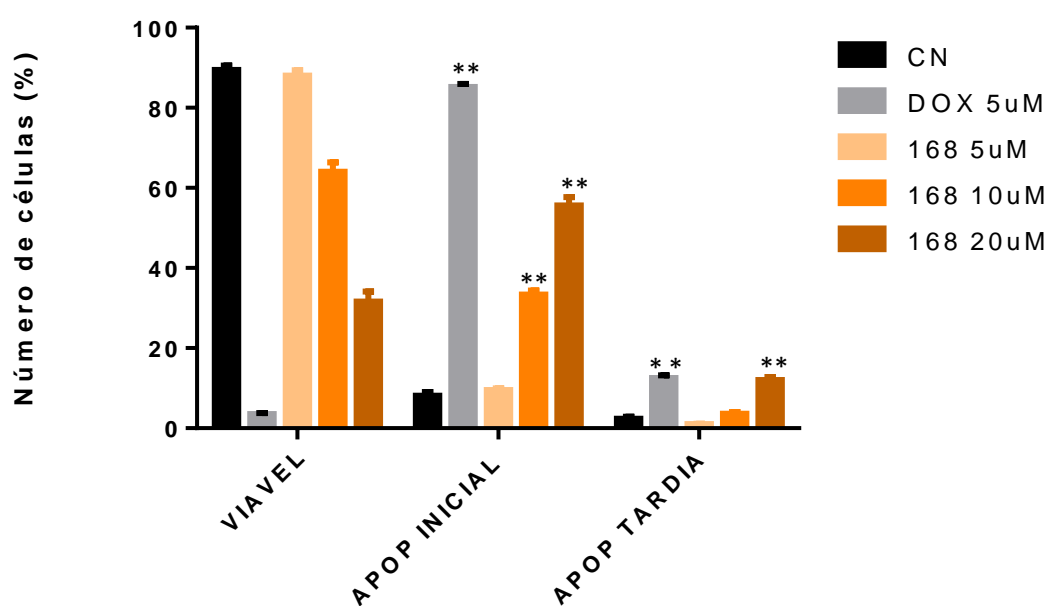
Os dados correspondem à média \pm E.P.M de três experimentos independentes. * $p < 0,0001$; comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Turkey.

Outra característica de células em morte por apoptose é a exposição da fosfatidilserina. Para avaliar se a via de apoptose tem algum envolvimento com o mecanismo de morte induzido pela molécula 168, as células de KASUMI-1 foram tratadas com a molécula 168 nas concentrações de 5, 10 e 20 μM por 24 horas e analisadas por citometria de fluxo.

Os resultados foram analisados e como observado na **figura 22**, as células do controle negativo apresentam 89,5%(±1.1) de células viáveis com somente 8,1%(±0.9) em apoptose inicial e 2,4%(±0.4) em apoptose tardia. O análogo 168 na concentração de 5 μM não foi capaz de induzir nenhum estágio de apoptose de forma significativa, apresentando valores de 9.5%(±0.5) e 1%(±0.1) em apoptose inicial e apoptose tardia, respectivamente. Já na concentração de 10 μM , o análogo 168 induziu apoptose inicial nas células de KASUMI-

1 de forma significativa de $p < 0,0001$ com valor de $33.4\%(\pm 0.9)$, porém não induziu apoptose tardia de forma significativa quando comparado ao controle negativo. Entretanto a concentração de $20 \mu\text{M}$ foi capaz de induzir apoptose inicial e apoptose tardia com valores de $55.6\%(\pm 2)$ e $12\%(\pm 0.7)$, respectivamente. E em ambos os estágios de apoptose apresentou diferença significativa de $p < 0,0001$, quando comparado ao controle negativo. Com a doxorubicina na concentração de $5 \mu\text{M}$ foi observado células em estágio inicial de apoptose, como também células em apoptose tardia, $85.2\%(\pm 0.7)$ e $12.5\%(\pm 0.7)$, respectivamente.

Figura 22. Efeito da molécula 168 em células KASUMI-1 sobre a externalização da fosfatidilserina, avaliada por citometria de fluxo após 24 horas de tratamento.



O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas.

A doxorubicina $5 \mu\text{M}$ (DOX) foi utilizada como controle positivo.

A amostra 168 foi utilizada nas concentrações 5, 10 e $20 \mu\text{M}$.

Os dados correspondem à média \pm E.P.M de três experimentos independentes. $**p < 0.0001$; comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Turkey.

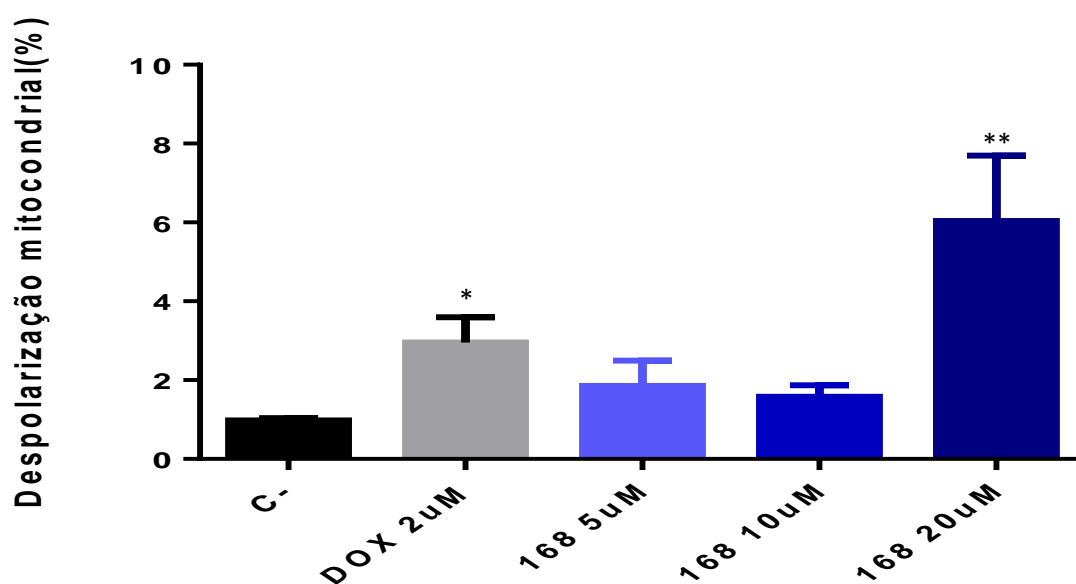
4.3.6 EFEITOS DA MOLÉCULA 168 SOBRE O POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO ($\Delta\psi_m$) DAS CÉLULAS KASUMI-1

Após o tratamento das células com o composto 168, estas foram incubadas com rodamina 123 a fim de se detectar o percentual de células com baixo $\Delta\psi_m$, a fim de avaliar se há um envolvimento da via intrínseca de apoptose.

Através da análise da **figura 23** é possível observar que as células KASUMI-1 expostas por 24 horas a molécula 168 apresentou despolarização de membrana somente na

maior concentração de 20 μM ($6 \pm 1,6\%$) quando comparado ao controle negativo ($0,98 \pm 0,05\%$), com diferença significativa $p < 0,0001$. Entretanto as concentrações de 5 e 10 μM , apresentaram somente uma pequena despolarização da membrana no valor de $1,8 \pm 0,6\%$, $1,6 \pm 0,3\%$, mas não foram significativos quando comparado ao controle negativo. Sendo assim, esse dado demonstra que a via intrínseca tem um envolvimento secundário na indução de morte por apoptose na linhagem KASUMI-1.

Figura 23. Efeito da molécula 168 sobre o $\Delta\psi\text{m}$ de células KASUMI-1 após 24 horas de incubação, avaliada por citometria de fluxo.



O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas.

A doxorubicina 2 μM (DOX) foi utilizada como controle positivo.

A amostra 168 foi utilizada nas concentrações 5, 10 e 20 μM .

Os dados correspondem à média \pm E.P.M de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,0001$; comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Turkey.

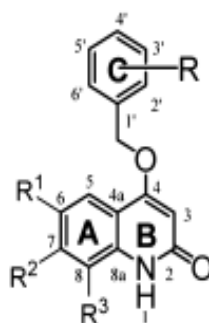
5. DISCUSSÃO

Atualmente a técnica de hibridação vem sendo bastante utilizada para o desenvolvimento de novas moléculas sintéticas com atividade antitumoral. Dentre as classes químicas com potencial de atividade antitumoral, se tem os quinolínicos e os tiazodilínicos.

Neste trabalho, buscou-se avaliar o potencial citotóxico de análogos sintéticos contendo ambos os centros tiazodilínicos e quinolínicos, seis análogos do quinolin-4-hidrazinotiazolidina foram testados frente linhagens tumorais. Dentre os seis análogos testados, os sintéticos 168, 183 e 184 foram capazes de reduzir a viabilidade celular em mais de 70% em uma linhagem tumoral ou mais. Além disso, os três análogos apresentaram valores de CI_{50} variando de 2,4-31 μ M nas linhagens tumorais HCT-116, HL-60, SF295, PC3 e não apresentaram atividade citotóxica frente a linhagem não tumoral L929, valores representados na tabela 5, com isso apresentando uma maior atividade citotóxica para as linhagens tumorais.

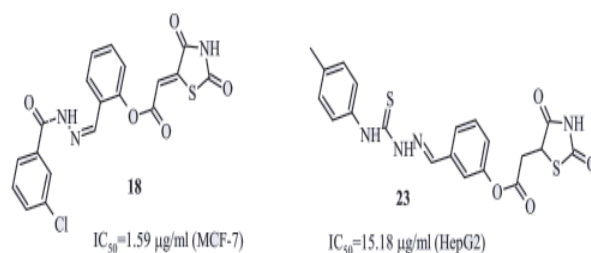
Diferentes estudos mostram moléculas de centro quinolínico com potencial citotóxico, como em trabalho realizado por Chakrabarty e colaboradores (2013) em que duas séries de dez compostos com grupo quinolínico foram sintetizados e todos apresentaram atividade antitumoral frente as linhagens MCF-7(câncer de mama), A-549(pulmão) e HeLa (cervical) com valores de CI_{50} variando entre 0,001-31(μ M), a partir disso alguns compostos apresentaram ser mais potentes que o controle positivo camptotecina.

Outro estudo realizado por Chen e colaboradores (2015) sintetizaram uma série de 45 compostos com um núcleo quinolínico e fizeram mudanças em seus radicais (**figura 24**). Todas as moléculas foram testadas frente a um painel de quatro linhagens tumorais (HL-60, Hep 3B, H460 e COLO205) e frente uma linhagem não tumoral (Detroit 551). Todas as moléculas testadas apresentaram atividade em pelo menos duas linhagens tumorais e nenhuma apresentou ação frente a linhagem Detroit 551. Dentre todas as moléculas as quatro mais potentes foram selecionadas para avaliação da CI_{50} em um painel mais amplo de linhagens tumorais. A molécula 11e foi selecionada para experimentos mais específicos com a linhagem COLO205 e foi capaz de induzir apoptose, parada de ciclo celular, mudanças morfológicas e fragmentação de DNA.

Figura 24. Esqueleto quiniolínico

Fonte: CHEN, et al., 2015 (adaptado)

Além disso, trabalhos com moléculas contendo o centro tiazodilínico também apresentam atividade antitumoral. Em trabalho realizado por Laxmi e colaboradores (2016) fizeram uma série de sete derivados com núcleo tiazodilínico frente ao painel de 60 linhagens, na qual a molécula 5d apresentou atividade antitumoral em todas as linhagens testadas com valores de CI_{50} variando de 1.1-2.9 μ M. Além disso, os compostos em uma concentração de 50 μ g/mL causaram fragmentação de DNA. Em outro estudo, seis novas moléculas com núcleo tiazodilínico foram sintetizadas e testadas nas linhagens tumorais A549(pulmão), HepG2(fígado) e MCF-7 (mama) e em uma linhagem não tumoral BJ (fibroblasto de pele humana). Neste estudo todas as moléculas apresentaram atividade em pelo menos uma linhagem tumoral e as substâncias 18 e 23 (**Figura 25**) apresentaram o melhor valor de CI_{50} na linhagem MCF-7 e HepG2 respectivamente, com um índice de seletividade ≥ 2 para linhagens tumorais (TROTSKO et al , 2017).

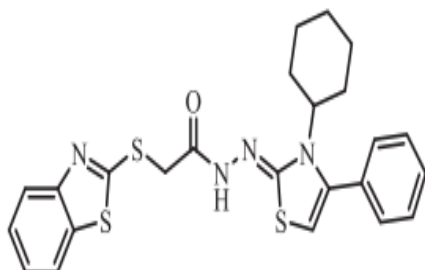
Figura 25. Dois derivados tiazodilínicos sintéticos

Fonte: LAXMI et al., 2016 (adaptado)

Desta mesma forma, em trabalho realizado por Osmaniye e colaboradores (2017) quinze derivados tiazodilínicos foram sintetizados e testados nas linhagens tumorais A549 e C6e e na linhagem não tumoral NIH3T3. De todas as moléculas testadas a 4a (**Figura 26**) obteve melhor CI_{50} no valor de 0.03 μ M frente a linhagem celular C6, como também apresentou ser a mais seletiva, já que seu valor de CI_{50} na linhagem NIH3T3 foi duas vezes

maior do que na linhagem tumoral. A molécula 4a induziu a inibição de síntese de DNA e apoptose na linhagem C6, com valores de CI_{50} próximos a cisplatina, droga referência (OSMANIYE et al., 2017).

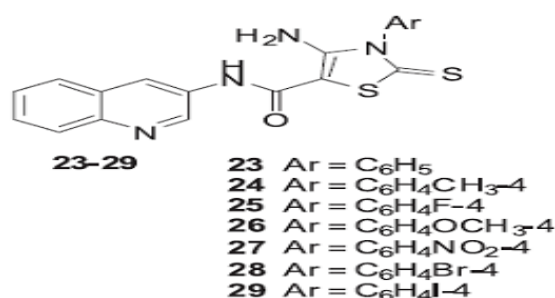
Figura 26. Derivado sintético tiazodilínico



Fonte: OSMANIYE et al., 2017 (adaptado)

Como também há estudos que demonstram que a hibridação dos centros quinolínicos e tiazodilínicos levam a formação de moléculas com atividade antitumoral. Estudo realizado por Ghorab e colaboradores (2016), sintetizaram sete (23-29) análogos contendo centros quinolínicos e tiazodilínicos (**Figura 27**) e foram testados frente a linhagem tumoral MCF7 (Câncer de mama). Dentre esses compostos, os de número 24,25,27 e 28 apresentaram citotoxicidade frente a linhagem tumoral de câncer de mama. Sendo os com melhores valores os dos compostos 25 e 27 de CI_{50} 29.7 e 26.7 μ M, respectivamente e ambos apresentaram valor de CI_{50} menor que a doxorubicina, droga referência.

Figura 27. Composto híbrido de centro quinolínico e tiazodilínico



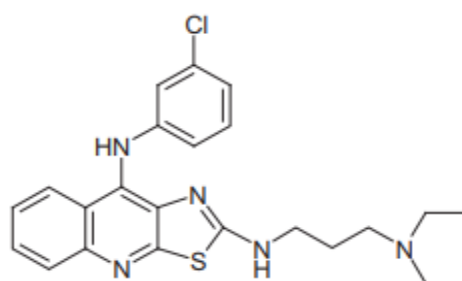
Fonte: GHORAB et al., 2016 (adaptado)

Loza-Mejía e colaboradores (2008), realizaram um estudo onde 13 análogos sintéticos de tiazoloquinolínicos foram testados frente a um painel de 5 linhagens tumorais. Os compostos 10b, 12,13 e 15 foram os mais ativos, com valores de CI_{50} variando de 7,85 μ M – 43.75 μ M. O análogo 15 foi o que apresentou o menor valor de CI_{50} quando comparado aos outros análogos, frente a linhagem leucêmica K-562, com valor de 7,85 μ M.

Na sequência do trabalho com o análogo 15 (D3CLP) (**Figura 28**), Loza-Meji'a e colaboradores (2011), mostraram que este composto apresentou maior atividade frente a linhagem leucêmica K-562. Na sequência do trabalho o análogo D3CLP foi testada frente a células normais para avaliar se tal composto é seletivo para linhagens tumorais. Os resultados encontrados mostraram que o composto D3CLP apresentava índice de seletividade ≥ 4 quando comparado com a linhagem leucêmica K-562.

Estes trabalhos apresentam resultados que corroboram com o encontrado no presente trabalho no que permeia o potencial citotóxico dessas classes químicas e uma maior atividade comparando linhagens tumorais e linhagens não tumorais.

Figura 28. Estrutura química do análogo D3CLP.



Fonte: Loza-Meji'a et al., 2011 (adaptado)

Além disso, o análogo 168 mostrou maior atividade para a linhagem leucêmica HL-60, pois apresentou valor de CI_{50} de 2,4 μ M, enquanto os análogos 183 (e 184 apresentaram valores de CI_{50} de 14.72 μ M e 25.5 μ M, respectivamente. Com isso, o composto 168 foi avaliado frente a outras linhagens tumorais leucêmicas no tempo de 24 horas.

Como demonstrado na tabela 6, o análogo 168 apresentou atividade citotóxica nas linhagens leucêmicas HL-60, K-562, KASUMI-1 e KG-1, com valores de CI_{50} menores do que todas as linhagens de tumores sólidos testados presentes na tabela 5, onde o menor valor de CI_{50} obtido para linhagens de tumores sólidos foi de 15 μ M para a linhagem HCT-116 no tempo de exposição de 72 horas, já a linhagem K-562 apresentou o maior valor de CI_{50} de 13.65 μ M (11.46 μ M – 16.24 μ M), porém exposta por somente 24 horas ao análogo 168. Desse modo, foi demonstrando que o composto 168 possui uma maior atividade frente a linhagens leucêmicas.

A maior seletividade do composto 168 para linhagens leucêmicas é corroborado por outras drogas com centro quinolínico, as quais já estão em fase de testes clínicos e sendo utilizadas nos tratamentos de diferentes leucemias. Em uma revisão de Musiol (2017) é apresentado diferentes compostos com ação citotóxica frente a diferentes tipos de leucemias, como o composto BN 80927, um forte intercalante de DNA que atua ligando-se a topoisomerase-II, o qual já foi aprovado para o tratamento de leucemias. GSK 1059615 e omipalisib são outros dois compostos em estudos de fase clínicas I e II que atuam inibindo duplamente as vias PI3K/mTOR frente a leucemias e tumores sólidos (MUSIOL, 2017).

Sendo assim, para o prosseguimento do presente estudo com o composto 168, a linhagem KASUMI-1 que representa um exemplo de LMA foi selecionada. Pois a leucemia mielóide aguda é caracterizada por suas alterações genéticas e epigenéticas, as quais são bem heterogêneas. Nas quais, muitas mutações já descritas para LMA é base de prognóstico e de tratamentos diferenciados. No que se norteia sobre a epidemiologia, a leucemia mielóide é a mais comum em adultos, mostrando assim, a importância de novos medicamentos para esta leucemia (LEVINE; ABDEL-WAHAB, 2010). Visando elucidar qual mecanismo de morte é induzido pela molécula 168, a linhagem KASUMI-1 que representa um exemplo de leucemia mielóide aguda foi selecionada.

As células da linhagem KASUMI-1 foram analisadas morfológicamente por panótico rápido, após exposição ao análogo 168 por 24 horas nas concentrações de 5uM, 10uM e 20uM. Sendo assim, foi possível observar que o composto 168 induziu alterações morfológicas, desde alteração nuclear, retração do citoplasma, células em picnose, como também o surgimento de “Blebs” na membrana citoplasmática. Algumas dessas características foram encontradas nas células tratadas com a doxorubicina, como “Blebs” na membrana citoplasmática, e alteração nuclear. Estes achados são apoiados pela análise de alteração morfológica via citometria de fluxo (figura 17), onde observou-se que com o aumento da concentração do composto 168, a população aumentava seu conteúdo de granulosidade, diminua de tamanho e aumentava o número da população de células em picnose. Estes achados mostram que o análogo 168 causa alterações morfológicas características de células em processo de apoptose. As células em apoptose tem por características principais uma condensação nuclear em massa bem definidas e uma consequente fragmentação do núcleo, com uma diminuição do tamanho celular e surgimentos de corpos apoptóticos (SARASTE; PULKKI, 2000).

Em estudo realizado por Sahu e colaboradores (2013) com um análogo de centro quinolínico, observou-se alterações morfológicas em células de neuroblastoma, nas concentrações de 2.5, 5, 10, 20 e 30 μM . As alterações induzidas pelo análogo 8-Methoxypyrimido[49,59:4,5]thieno(2,3-b) Quinoline4(3H)-One foram de fragmentação e condensação nuclear, diminuição do volume celular e formação de “Blebs” na membrana citoplasmática. Em outro trabalho, o evodiamina um alcaloide quinolínico também induziu alterações morfológicas características de células em apoptose, incluindo redução de tamanho celular e alteração do formato da célula, como também diminuição do tamanho do núcleo e condensação da cromatina (YANG et al., 2009). Análogos contendo o centro tiazodilínicos também são capazes de causar alterações morfológicas em células de câncer. Em estudo realizado por Rodrigues e colaboradores (2018) 4 análogos tiazodilínicos foram testados frente a um painel de linhagens tumorais. Onde o composto 5 apresentou menor valor de CI_{50} na linhagem NCI-H292. Sendo assim, foi avaliado a capacidade de indução de alteração morfológica pelo análogo 5. As células tratadas com o análogo tiazodilínico apresentaram características morfológicas de células apoptóticas, como redução de volume celular e fragmentação nuclear.

Esses estudos corroboram com os achados do presente trabalho, pois o análogo 168 induziu modificações com características de células em apoptose na linhagem KASUMI-1 de forma concentração dependente.

Dando seguimento ao estudo de mecanismo de morte induzido pelo análogo 168 frente a linhagem KASUMI-1, os resultados de integridade de membrana, via citometria de fluxo, mostraram uma alteração significativa na integridade de membrana somente nas duas maiores concentrações, como demonstrado na figura 19a. Entretanto, no que concerne à densidade celular, o análogo 168 foi capaz de reduzir significativamente desde a menor concentração testada o número de células, como apresentado na figura 19b. Sendo assim, o análogo 168 nas concentrações testadas e no tempo de 24 horas, apresentou ter uma maior ação citostática, do que citotóxica frente a linhagem KASUMI-1. O controle positivo, a doxorubicina na concentração de 2 μM , apresentou uma alteração significativa da integridade de membrana, como também uma redução significativa no número de células.

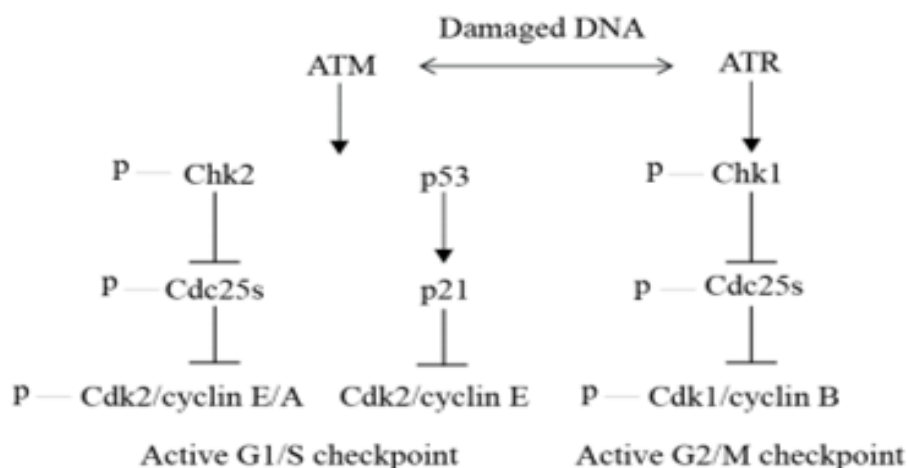
De uma forma geral, as drogas utilizadas no tratamento do câncer, causam danos no DNA que leva a uma morte celular por apoptose. Entretanto, além do efeito citotóxico muitos agentes quimioterápicos convencionais apresentam também efeito citostático (RIXE; FOJO., 2007). Drogas citostáticas por definição não causam a morte celular, mas evitam que

as células se proliferem. Por exemplo, o agente alquilante melphalan apresenta ambos os efeitos, que a depender da concentração pode induzir parada ou um atraso no ciclo celular e subsequentemente levar a célula a morte, apresentando sua ação citotóxica e citostática (RIXE; FOJO., 2007). Além disso, a parada no ciclo celular ou o efeito citostático pode atuar como um fator primário para conseqüente morte celular, como apoptose ou necrose, e isto independe da duração das células em estágio de aprisionamento mitótico (WEISSENSTEIN et al., 2014).

A fim de avaliar se o análogo 168 tem seu efeito antiproliferativo através da parada de ciclo celular, as células da linhagem KASUMI-1 foram tratadas com o análogo 168 e analisadas via citometria de fluxo (Figura 20).

O análogo 168 foi capaz de induzir de forma significativa em todas as concentrações um acúmulo de células na fase G1, seguido de uma drástica redução de células na fase S. Além disso, nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M observou-se um aumento significativo de células em G2/M. Desta forma, pode-se inferir que o análogo 168 induz uma parada do ciclo celular tanto em G1, quanto em G2/M. Com isso, é evidente que o análogo 168 age impedindo que as células avancem no ciclo em ambas as fases de crescimento celular e isso pode ocorrer por diferentes mecanismos. Um possível mecanismo é que o agente cause danos ao DNA, de diferentes formas como inibidor de topoisomerasas e agentes alquilantes, camptotecina e temozolomida, respectivamente. Com isso, estes danos ao DNA levam a uma ativação das proteínas quinases ATM e ATR que fosforilam uma variedade de proteínas relacionadas com ativação de pontos de checagem, reparo e replicação de DNA (**Figura 29**) (SWIFT et al., 2014). Outro possível mecanismo é via inibição direta das CDK4 e 6, as quais são responsáveis pela fosforilação e conseqüentemente desativação do gene supressor de tumor retinoblastoma, o qual quando desativado permite que fatores de transcrição atuem levando a expressão de genes responsáveis pela produção das ciclinas E e CDK2 essenciais para a progressão do ciclo celular da fase G1 para fase S (GELBERT et al., 2017). Um medicamento que atua por este mecanismo é o palbociclibe I utilizado no tratamento de câncer de mama tendo como alvo principal as proteínas CDK4/6 (GELBERT et al., 2017)

Figura 29. Uma revisão da resposta de dano ao DNA.



Fonte: SWIFT et al., 2014. (Adaptado)

Corroborando com os achados de ciclo celular do análogo 168, estudos realizados por Aris e Pommier (2012) e Antony e colaboradores (2007), os compostos indenoisoquinolínicos LMP-400 em fase I de estudos clínicos como também os NSC 725776 e NSC 724998 agem inibindo a topoisomerase I levando a indução da parada de ciclo celular tanto na fase S quanto na fase G2/M. Além disso, nesses estudos foram ativadas as proteínas Chk1 e Chk 2 que atuam no controle de ativação de proteínas fundamentais para a transição das fases G1/S e G2/M do ciclo celular (ARIES; POMMIER., 2012). Sendo assim, para compreender se o análogo 168 atua causando danos ao DNA, como os análogos quinolínicos citados ou como o agente palbociclibe I, outros experimentos se fazem necessários para uma melhor compreensão do mecanismo de ação do análogo 168.

Através da análise do ciclo celular foi possível avaliar a população de células em sub-G1 ou com fragmentação de DNA, como apresentado na figura 22. A fragmentação de DNA, em um padrão de degradação internucleossomal em intervalos de 180-200 pares de base, é característica marcante de células em apoptose (SAMARGHANDIAN; SHABESTARI, 2013; COLLINS et al., 1997). O análogo 168 induziu nas células da linhagem KASUMI-1 o aparecimento de uma população em sub-G1, que representa células com DNA fragmentado. Sendo este resultado um indício que o composto análogo 168 ativa uma via de morte celular por apoptose.

Devido as alterações morfológicas características de apoptose e indução de fragmentação de DNA pelo análogo 168, foi realizado o experimento de anexina V, por citometria de fluxo, para averiguar se ocorre exposição da fosfatidilserina em células da linhagem KASUMI-1, tratadas com diferentes concentrações do análogo 168. Por meio dos

resultados obtidos, foi possível observar a presença de células em estágio de apoptose inicial nas duas maiores concentrações, como também de células em apoptose tardia, mas somente na maior concentração. Este resultado mostra que o análogo 168 causa morte celular por apoptose, pois quando a célula se encontra em apoptose a proteína scramblase é ativada, a qual é capaz de induzir a exposição da fosfatidilserina (LEE et al., 2013). A morte celular por apoptose também é induzida por outros derivados contendo o centro químico tiazodilínico ou quinolínico. Em estudo realizado por Finiuk e colaboradores (2017) o composto Les-3833 derivado do 4-tiazolidiones, testado em células de melanoma, foi capaz de induzir a exposição das fosfatidilserina, modificações morfológicas e ativação de caspase-3, características de células em morte por apoptose.

Apoptose é uma morte celular programada que possui duas vias principais de atuação, a via intrínseca que ocorre por meio da permeabilização da membrana mitocondrial a partir de sinais de dentro da célula. Por outro lado, a via extrínseca é dependente de ativação de receptores de morte e receptores dependente de fatores de crescimento. Além disso, pode ocorrer uma comunicação de sinalização entre as duas vias por meio de ativação da caspase iniciadora 9 (ASHKENASI; HERBST, 2008).

A fim de avaliar se o processo de morte celular por apoptose induzido pelo análogo 168 ocorre por via intrínseca, as células da linhagem KASUMI-1 foram incubadas com rodamina 123 a fim de se detectar perda de potencial transmembrânico. O análogo 168 somente causou despolarização de membrana na concentração de 20 μM . Enquanto que na concentração de 10 μM , não ocorreu despolarização da membrana de forma significativa. Entretanto, nesta concentração de 10 μM ocorreu indução de apoptose inicial. Sendo assim, o análogo 168 possivelmente causa a morte celular por apoptose pela via extrínseca.

É importante salientar que o análogo 168 apresentou resultados similares ao do controle positivo, doxorrubicina, que foi testada em menores concentrações quando comparada com a molécula de estudo do presente trabalho. O controle positivo apresentou uma melhor atividade antitumoral, entretanto é sabido que a doxorrubicina apresenta uma toxicidade para diferentes órgãos como o coração, fígado e rins (TACAR et al., 2012).

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados apresentados e discutidos, investigação em relação a dano de DNA, topoisomerase, proteínas envolvidas com fases do ciclo celular e marcadores da via extrínseca da apoptose, seriam as nossas próximas diretrizes a serem exploradas futuramente, com o intuito de elucidar o mecanismo de ação do análogo 168.

7. CONCLUSÃO

Dentre os seis análogos avaliados, três apresentaram atividade citotóxica frente as linhagens tumorais. No entanto o análogo 168 apresentou uma melhor atividade citotóxica frente as linhagens leucêmicas. Sendo capaz de induzir a morte celular por apoptose na linhagem KASUMI-1 nas concentrações de 10 μM e 20 μM . Além disso foi capaz de causar parada de ciclo celular em G0/G1 e G2/M. Os achados no presente estudo mostraram que a hibridação das classes químicas, quinolínicos e tiazodilínicos, foi efetiva para ação antitumoral e que o análogo 168 surge como candidato à molécula anticâncer. Entretanto, outros experimentos necessitam serem realizados para elucidar o mecanismo de ação do análogo 168.

REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHAB, O; LEVINE, L . : Recent advances in the treatment of acute myeloid leukemia. **F1000 Faculty Reviews**, v.2, n.55, 2010.

AFZAL, Obaid et al. A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 871–910, 2015.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS) 2016. Disponível em: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy>. Acesso em: 12/09/2018.

ANTONY, Smitha et al. Novel indenoisoquinolines NSC 725776 and NSC 724998 produce persistent topoisomerase I cleavage complexes and overcome multidrug resistance. **Cancer Research**, v. 67, n. 21, p. 10397–10405, 2007.

ARAFI, Reem et al. : Synthesis and in vitro antiproliferative effect of novel quinoline-based potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.63, p.26-832, 2013.

ARIS, Sheena M.; POMMIER, Yves. Potentiation of the novel topoisomerase I inhibitor indenoisoquinoline LMP-400 by the cell checkpoint and Chk1-Chk2 inhibitor AZD7762. **Cancer Research**, v. 72, n. 4, p. 979–989, 2012.

ASHKENAZI, Avi; HERBST, Roy S. To kill a tumor cell: The potential of proapoptotic receptor agonists. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 6, p. 1979–1990, 2008.

BARROS, Francisco et al. : Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.20, n.11, p.3533-3539, 2012.

BILLEN, P et al. : Bid: a Bax-like BH3 protein. **Oncogene**, v.27, p.93-104, 2008.

BRAS, S et al. : Pontin is a critical regulator for AML1-ETO induced leukemia. **Leukemia**, v.28, p.1271-1279.

BLANQUICETT, C et al. : Thiazolidinediones as anti-cancer agents. **Cancer therapy**, v.6, p.25-34, 2008.

CHAKRABARTY, S et al. : Synthesis and evaluation as potential anticancer agents of novel tetracyclic indenoquinoline derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.21, p.1143-1149, 2013.

CHEN, Yi Fong et al. Synthesis and SAR studies of novel 6,7,8-substituted 4-substituted benzyloxyquinolin-2(1H)-one derivatives for anticancer activity. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 5, p. 1195–1221, 2015.

COLLINS, Jae A. et al. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 45, n. 7, p. 923–934, 1997.

CROSS, N et al. : Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. **Nature leukemia**, v.29, p. 999-1003, 2015.

DAGOGO, I; SHAW, T. : Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. **Nature Review Clinical Oncology**, v.15, p81-94, 2018.

DARZYNKIEWICZ, Z. et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v. 13, n. 8, p. 795-808, 1992.

DESCHLER,B; LUBBERT,M. : Acute Myeloid Leukemia: Epidemiology and Etiology. **CANCER**, v.107, n.9, p.2099-2107.

DOHNER, Hartmut et al. : Acute Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v.373, p.1136-1152, 2015.

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

FINIUK, N et al. : 4-Thiazolidinone derivative Les-3833 effectively inhibits viability of human melanoma cells through activating apoptotic mechanisms. **Croatian Medical Journal**, v.58, n.2, p.129-139, 2017.

FUCHS, Yaron; STELLER, Hermann. : Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. **CELL DEATH AND AUTOPHAGY**, v.16, p.329-344, 2015.

GALLUZZI, Lorenzo; VITALE, Ilio et al. :Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death & Differentiation**, v.19, p.107-120, 2012.

GALLUZZI, Lorenzo; VITALE, Ilio et al. :Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death & Differentiation**, v.19, p.107-120, 2012.

GELBERT,L et al. : Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.25, p.3420-3435, 2015.

GHORAB,MM et al. : Novel quinolines carrying pyridine, thienopyridine, isoquinoline, thiazolidine, thiazole and thiophene moieties as potential anticancer agents. **Acta pharm**, v.66, n.2, p.155-171, 2016.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert a.. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, [s.l.], v. 144, n. 5, p.646-674, mar. 2011. Elsevier BV.

HARASHIMA, Hirofumi et al. : Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. **Trends in Cell Biology**, v.23, n.7, p.345-356, 2013.

HARRINGTON, K. : Biology of cancer. **Medicine**, v.39, n.12, p.689-692, 2011.

HATLEN, M et al. : AML1-ETO driven acute leukemia: insights into pathogenesis and potential therapeutic approaches. **Front. Med**, v.6, n.3, p.248-262.

HAVRYLYUK, Dmytro et al. Synthesis and biological activity evaluation of 5-pyrazoline substituted 4-thiazolidinones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 66, p. 228–237, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.05.044>>.

HOGLUND, M et al. : Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. **Ann Hematology**, v.94, n.2, p.241-247, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER(INCA). ESTIMATIVAS PARA 2018/2019: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-taxas-brasil.asp>. Acesso em: 10 set.2018

JAIN, Viral et al. : Thiazolidine-2,4-diones: Progress towards multifarious applications. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.21, p.1599-1620, 2013.

JAIN, Shweta et al. Comprehensive review on current developments of quinoline-based anticancer agents. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878535216301897>>.

KUMMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C.: Robbins Patologia Básica. 9. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2013. 928 p.

LAXMI, S. Vijaya et al. Synthesis of thiazolidine-2,4-dione derivatives: anticancer, antimicrobial and DNA cleavage studies. **Journal of Chemical Biology**, v. 9, n. 4, p. 97–106, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12154-016-0154-8>>.

LEE, S. H. et al. Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm. **Cell Death and Differentiation**, v. 20, n. 1, p. 64–76, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2012.93>>.

LIMA, M.A.S.; CURI, R.; LIMA, T.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Induction of apoptosis by pterocarpanes from *Platymiscium floribundum* in HL-60 human leukemia cells. **Life Sci.**, v. 78, p. 2409 - 2417, 2006.

LIU, Yin et al. : Transcriptional landscape of the human cell cycle. **PNAS**, v. 114, n. 13, p.3473-3478, 2017.

LOZA-MEJÍA, M et al. : Antineoplastic activity of the thiazolo[5,4-b]quinoline derivative D3CLP in K-562 cells is mediated through effector caspases activation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, n.6, p.2102-2108, 2011.

LOZA-MEJÍA, M et al. : Synthesis, cytotoxic evaluation, and DNA binding of novel thiazolo[5,4-b]quinoline derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, n.3, p.1142-1149, 2008.

MARCHETTI, P.; CASTEDO, M.; SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; HIRSCH, T.; MACHO, A.; HAEFFNER, N.; HIRSCH, F.; GEUSKENS, M.; KROEMER, G. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. **J. Exp. Med.**, v. 184, p. 1155 – 1160, 1996.

MILITAO, G.C.G.; DANTAS, I.N.F.; PESSOA, C.; FALCÃO, M.J.C.; SILVEIRA, E.R.;

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

MUGHAL, Tariq. : Chronic Myeloid Leukemia A handbook for Hematologist and Oncologist. **Hoboken; CRC Press**, 2013.

MUSIOL, Robert. An overview of quinoline as a privileged scaffold in cancer drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 12, n. 6, p. 583–597, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1319357>>.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI) 2015. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/researchandfunding/priorities/global-research-activities>>. Acesso em: 08/09/2018.

OSMANIYE, Derya et al. : Synthesis and anticancer activity of some novel benzothiazole-thiazolidine derivatives. **PHOSPHORUS, SULFUR, AND SILICON**, v.193, n.4, p.249-256, 2018.

OTTO, Tobias; SICINSKI, Piotr. : Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **NATURE REVIEWS | CANCER**, v.17, p.93-115, 2017.

OUYANG, L et al. : Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell proliferation**, v.45, p.487-498, 2012.

PANDEY, Yashshree et al. : Biological Activities of Thiazolidine – A Review. **Current Pharma Research**, v.1, n.2, p.192-196, 2011.

PEARCE, Alison et al. Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, p. 1–12, 2017.

RAGHAVAN, S et al. : Synthesis and anticancer activity of novel curcumin–quinolone hybrids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.25, n.17, p.3601-3605, 2015.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.. R. J. Flower: Farmacologia. 8. ed. Londres: Elsevier, 2016. 1939 p.

RIXE, Olivier; FOJO, Tito. Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis sufficient? **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 24, p. 7280–7287, 2007.

RODRIGUES, Maria et al. : Selective cytotoxic and genotoxic activities of 5-(2-bromo-5-methoxybenzylidene)-thiazolidine-2,4-dione against NCI-H292 human lung carcinoma cells. **Pharmacological Reports**, v.70, p.446-454.

ROUSSELOT, P et al. : Pioglitazone Together With Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia: A Proof of Concept Study. **CANCER**, p.1791-1799, 2017.

SAHU, Upasana et al. A Novel Anticancer Agent, 8-Methoxypyrimido[4',5':4,5]thieno(2,3-b) Quinoline-4(3H)-One Induces Neuro 2a Neuroblastoma Cell Death through p53-Dependent, Caspase-Dependent and -Independent Apoptotic Pathways. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

SAMARGHANDIAN,S ; SHABESTARI, MM . : DNA fragmentation and apoptosis induced by safranal in human prostate cancer cell line. **Indian journal urol**, v.29, n.3, p.177-183, 2013.

SANTOS JÚNIOR, Paulo. : Síntese e avaliação biológica de arilimidazólicos/pirimidínicos e quinolin-4-hidrazinotiazolidina sobre amastigotas de *Leishmania chagasi* e potencial antitumoral. 195 f. Dissertação – Escola de Enfermagem e Farmácia, Universidade Federal de Alagoas, 2017.

SARASTE, Antti; PULKKI, Kari. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 45, n. 3, p. 528–537, 2000.

SHAPIRO, H. M. Practical Flow Cytometry. New York : **Ed Wiley-Liss**, 1995.

SHIN,A et al. : Synthesis and Anti-Breast Cancer Activities of Substituted Quinolines. **Bioorg Med Chem Lett.**, v.18, n.11, p.3364-3368, 2008.

STEWART BW, WILD CP, editors (2014). World Cancer Report 2014. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.

SWIFT,L et al. : Genotoxic Anti-Cancer Agents and Their Relationship to DNA Damage, Mitosis, and Checkpoint Adaptation in Proliferating Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, p.3403-3431, 2014.

TACAR, O et al. : Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v.65, p.157-170, 2012.

TROTSKO, Nazar et al. Synthesis and in vitro antiproliferative and antibacterial activity of new thiazolidine-2,4-dione derivatives. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 17–24, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1387543>>.

VIEGAS-JUNIOR, C., DANUELLO, A., DA SILVA, et al. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1829-1852, 2007.

VOLOTSKOVA,O et al. : Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma. **SCIENTIFIC REPORTS**, v. 2, n.636, p.1-10, 2012.

WEISSENSTEIN, Ulrike et al. Interaction of standardized mistletoe (*Viscum album*) extracts with chemotherapeutic drugs regarding cytostatic and cytotoxic effects in vitro. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 1–9, 2014.

WILLIAMS,Gareth ; STOEBER,Kai. : The cell cycle and cancer. **Journal of Pathology**, v.226, p.352-364, 2012.

YANG, Zhi et al. : Antiproliferation and Apoptosis Induced by Evodiamine in Human Colorectal Carcinoma Cells (COLO-205). **Chemistry and Biodiversity**, v.6, n.6, p.924-933, 2009.

ZEIDAN,A et al. : Economic burden associated with acute myeloid leukemia treatment. **Expert Review of Hematology**, v.9, n.1, p.79-89.

ZIEGLER, U; GROSCURTH, P. : Morphological Features of Cell Death. **News Physiol Sci**, v.19, p. 124-128, 2004.