



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO**  
**TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS**

**LUANA LETÍCIA ALVES DUTRA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE**  
***O*-ACILAMIDOXIMAS E 1,2,4-OXADIAZÓIS EM LINHAGENS DE CÉLULAS**  
**TUMORAIS**

**FORTALEZA**

**2019**

LUANA LETÍCIA ALVES DUTRA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE  
O-ACILAMIDOXIMAS E 1,2,4-OXADIAZÓIS EM LINHAGENS DE CÉLULAS  
TUMORAIS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Ensaios pré-clínicos e clínicos.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

Coorientador: Dr. Carlos Roberto Koscky Paier.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

D975a Dutra, Luana Letícia Alves.

AVALIAÇÃO IN VITRO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE O-ACILAMIDOXIMAS E 1,2,4-OXADIAZÓIS EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS / Luana Letícia Alves Dutra. – 2019. 68 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos - Associação UFC/UFPA/UFRRN/UFRRPE, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

Coorientação: Prof. Dr. Carlos Roberto Koscky Paier.

1. Linfoma de Burkitt. 2. Antineoplásicos. 3. Oxadiazóis. I. Título.

CDD 615.1

---

LUANA LETÍCIA ALVES DUTRA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE  
O-ACILAMIDOXIMAS E 1,2,4-OXADIAZÓIS EM LINHAGENS DE CÉLULAS  
TUMORAIS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.  
Área de concentração: Ensaios pré-clínicos e clínicos.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Carlos Roberto Koscky Paier (Coorientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Ronaldo Nascimento de Oliveira  
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Arlandia Cristina Lima Nobre de Moraes  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Prof. Dr. Gislei Frota Aragão  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me sustentado durante esses anos; pelo seu infinito amor e providência, que me permitiram concluir essa etapa da minha vida.

Aos meus pais, pelo apoio e por serem sempre presentes, sendo verdadeiros consolos para mim.

Ao meu esposo, pela paciência e por acreditar em mim, além de me incentivar a ser sempre melhor.

Aos colegas do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE), por terem me acolhido e me ensinado com tamanho empenho e disposição.

Aos colegas do Laboratório de Hematologia, por dividirem momentos de leveza em meio aos momentos difíceis.

Aos colegas e alunos da Universidade Estadual do Ceará, por acreditarem em mim e me socorrerem quando necessário.

À minha melhor amiga, por estar lá sempre.

À UFC e à CAPES, por tornarem este trabalho viável e pelo apoio financeiro.

*“Dificuldades preparam pessoas comuns para  
destinos extraordinários.”*  
- C.S. Lewis

## RESUMO

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças de origem genética caracterizadas por disfunções nos processos de proliferação e morte celular. O linfoma de Burkitt é um câncer de células B de alto grau, com sobrevida global média de 2,7 meses e muito comum em crianças. A síntese de novos compostos com potencial antitumoral pode ser uma rota para a melhoria do tratamento dos linfomas, pois espera-se que estes tenham a capacidade de modular vias oncogênicas. Os 1,2,4-oxadiazóis são moléculas com sistema de anéis heteroaromáticos muito relevantes para a indústria farmacêutica, com reconhecida atividade antitumoral. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antiproliferativo *in vitro* e o possível mecanismo de ação de 1,2,4-oxadiazóis e seus intermediários de síntese, *O*-acilamidoximas, contra linhagens celulares tumorais. Foram testadas dez substâncias puras, sendo 6 da classe das acilamidoximas e 4 da classe dos 1,2,4-oxadiazóis, por meio de testes que avaliaram a citotoxicidade, a viabilidade celular, o efeito sobre a progressão do ciclo celular e o padrão de morte celular. As acilamidoximas apresentaram atividade citotóxica contra linhagens tumorais com pelo menos 75% de inibição de crescimento celular. As moléculas mostraram valores de  $CI_{50}$  variando 6,87 a 14,24  $\mu\text{M}$  em 72 horas, sendo que DFA 52 e DFA 59 apresentaram maior seletividade para a linhagem derivada de Linfoma de Burkitt (RAJI). No ensaio de 48 horas, os valores de  $CI_{50}$  de DFA 52 e DFA 59 foram de 12,86 e 9,22  $\mu\text{M}$ , respectivamente. A análise morfológica mostrou formação de prolongamentos na membrana citoplasmática das células tratadas. As análises de citometria de fluxo mostraram que as moléculas inibiram a proliferação celular e causaram danos na membrana. Na análise do ciclo celular foi possível verificar um aumento significativo de células na fase G0/G1 quando tratadas com as moléculas nas concentrações de 12,85 e 25,70  $\mu\text{M}$  de DFA 52 e 18,43  $\mu\text{M}$  de DFA 59. A avaliação do padrão de morte celular mostrou que as moléculas induzem despolarização na mitocôndria, indicando possível envolvimento na via intrínseca da apoptose. O ensaio de externalização da fosfatidilserina pela Anexina V confirmou que os compostos estão envolvidos na indução da morte celular por apoptose. Os resultados demonstram que as moléculas DFA 52 e DFA 59 apresentam atividade frente às linhagens de tumores hematopoiéticos, com maior seletividade para o linfoma de Burkitt, sendo promissoras na utilização como ferramenta na formulação de compostos com atividade anticâncer.

**Palavras-chave:** Linfoma de Burkitt. Antineoplásicos. Oxadiazóis.

## ABSTRACT

Cancer is a group with more than 100 diseases of genetic origin characterized by dysfunctions in the proliferation processes and cell death. Burkitt's lymphoma is a high-grade B-cell cancer with a median overall survival of 2.7 months and very common in children. The synthesis of new compounds with antitumor potential can be a route for improving lymphoma treatment, therefore is expected they will have the ability to modulate oncogenic pathways. 1,2,4-Oxadiazoles are molecules with heteroaromatic ring system very relevant to the pharmaceutical industry, with recognized antitumor activity. The aim of this study was to evaluate the in vitro antiproliferative effect and the probably action mechanism of 1,2,4-oxadiazoles and their synthesis intermediates, O-acylamidoximes, against tumor cell lines. Ten pure substances were tested, 6 of the acylamidoxime class and 4 of the 1,2,4-oxadiazole class, using tests that evaluated cytotoxicity, cell viability, effect on cell cycle progression and pattern of cell death. Acylamidoximes showed cytotoxic activity against tumor lines with at least 75% inhibition of cell growth. The molecules showed IC<sub>50</sub> values ranging from 6,87 to 14,24 μM in 72 hours, and DFA 52 and DFA 59 showed higher selectivity for the Burkitt Lymphoma derived cell line (RAJI). In the 48 hour assay, the IC<sub>50</sub> values of DFA 52 and DFA 59 were 12,86 and 9,22 μM, respectively. The morphological analysis demonstrated prolongations formation in the cytoplasmic membrane of the treated cells. Flow cytometric analysis demonstrated that the molecules inhibited cell proliferation and caused membrane damage. In the cell cycle analysis was verified a significant increase of cells in phase G0/G1 when treated with the molecules in the concentrations of 12,85 and 25,70 μM DFA 52 and 18,43 μM DFA 59. The evaluation of the cell death pattern demonstrated that the molecules induce depolarization in mitochondria, indicating possible involvement in the intrinsic pathway of apoptosis. The phosphatidylserine externalization assay by Annexin V confirmed that the compounds are involved in the induction of apoptotic cell death. The results showed that the molecules DFA 52 and DFA 59 have activity against hematopoietic tumor cell lines, with greater selectivity for Burkitt lymphoma, and are promising to use as a tool in the formulation of compounds with anticancer activity.

**Keywords:** Burkitt's lymphoma. Anticancer agents. Oxadiazoles.

## LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 - Linhagens celulares testadas durante o estudo.....	29
Tabela 2 - Valores de porcentagem de inibição a partir de dois experimentos independentes, realizados em duplicata, em linhagens tumorais e uma não tumoral, após 72 h de incubação....	34
Tabela 3 - Valores de $CI_{50}$ ( $\mu M$ ) obtidos pelo método de MTT com um intervalo de confiança de 95%, calculado por regressão não-linear a partir de dois experimentos independentes, realizados em duplicata, em 3 linhagens tumorais hematológicas e uma linhagem não tumoral murina, após 72 h de incubação.....	35
Tabela 4 - Valores mínimos de índice de seletividade.....	36
Tabela 5 - Valores de $CI_{50}$ ( $\mu M$ ) obtidos pelo método de MTT com um intervalo de confiança de 95%, calculado por regressão não-linear a partir de dois experimentos independentes, realizados em duplicata, em RAJI após 48 e 24 horas de incubação.....	36
Gráfico 1 - Efeito de DFA 52 e DFA 59 sobre a proliferação celular das células RAJI, avaliado pela densidade de células, determinada por citometria de fluxo.....	41
Gráfico 2 - Efeito de DFA 52 e DFA 59 na distribuição das fases do ciclo celular de células RAJI, determinado por citometria de fluxo.....	43

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.....	10
Figura 2 - Principais características das células neoplásicas.....	11
Figura 3 - Representação do ciclo celular.....	14
Figura 4 - O papel da morte celular programada no câncer.....	15
Figura 5 - Atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos, dependendo da fase do ciclo celular.....	21
Figura 6 - Isômeros constitucionais dos Oxadiazóis.....	23
Figura 7 - Estratégias de síntese para obtenção de 1,2,4-oxadiazóis.....	24
Figura 8 - Estruturas dos compostos analisados.....	27
Figura 9 - Imagens da morfologia das células RAJI após 48 horas de tratamento, coradas com kit panótico rápido. Células visualizadas por microscopia óptica. A e B - controle negativo e doxorrubicina, respectivamente; C e D - células tratadas com DFA 52 nas concentrações de 6,4 e 12,8 $\mu$ M, respectivamente; E, F e G - células tratadas com DFA 59 nas concentrações de 4,6; 9,2 e 18,4 $\mu$ M, respectivamente.....	38
Figura 10 - Efeito de DFA 52 e DFA 59 sobre a integridade de membrana, determinada por citometria de fluxo. Os histogramas representam células viáveis e células não viáveis, identificadas pela emissão de fluorescência vermelha após incorporação do iodeto de propídio (A). Os dados estão apresentados como os valores da média $\pm$ E.P.M., obtidos por pelo menos três experimentos realizados em triplicata (B).....	40
Figura 11 - Efeito de DFA 52 e DFA 59 sobre o conteúdo de DNA nuclear de células RAJI determinado por citometria de fluxo.....	42

Figura 12 - Efeito de DFA 52 e DFA 59 sobre o potencial transmembrânico mitocondrial das células RAJI, avaliado pela despolarização de membrana, determinado por citometria de fluxo. Os histogramas representam células despolarizadas e células polarizadas, identificadas pela emissão de fluorescência amarela após incorporação da Rodamina 123 (A). Os dados estão apresentados como os valores da média  $\pm$  E.P.M., obtidos por pelo menos três experimentos realizados em triplicata (B).....44

Figura 13 - Efeito de DFA 52 e DFA 59 sobre o padrão de morte celular das células RAJI avaliado através de coloração de Laranja de acridina/Brometo de etídio. Os dados estão apresentados como os valores da média  $\pm$  E.P.M., obtidos por pelo menos três experimentos realizados em triplicata.....46

Figura 14 - Padrão de morte celular induzido por DFA 52 e DFA 59 pela coloração de Laranja de acridina/Brometo de etídio. Células visualizadas por microscopia óptica. A e B - controle negativo e doxorrubicina, respectivamente; C e D - células tratadas com DFA 52 nas concentrações de 6,4 e 12,8  $\mu$ M, respectivamente; E, F e G - células tratadas com DFA 59 nas concentrações de 4,6; 9,2 e 18,4  $\mu$ M, respectivamente.....47

Figura 15 - Efeito de DFA 52 e DFA 59 sobre a externalização da fosfatidilserina das células RAJI, avaliado por citometria de fluxo. Gráficos *dot plot* representativos da análise de Anexina V.....48

Figura 16 - Efeito de DFA 52 e DFA 59 sobre a externalização da fosfatidilserina das células RAJI, avaliado por citometria de fluxo. Os dados estão apresentados como os valores da média  $\pm$  E.P.M., obtidos por pelo menos três experimentos realizados em triplicata.....49

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Câncer.....	10
1.2 Ciclo Celular.....	12
1.3 Morte celular e câncer .....	15
1.4 Linfomas não Hodgkin .....	17
1.4.1 Linfoma de Burkitt .....	19
1.5 Perspectivas de tratamento para o câncer .....	20
1.6 Acilamidoximas e 1,2,4-Oxadiazóis.....	22
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo Geral .....	26
2.2 Objetivos Específicos .....	26
3 METODOLOGIA.....	27
3.1 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	27
3.2 Análise morfológica – Coloração diferencial com panótico rápido .....	29
3.3 Estudo do mecanismo de ação.....	30
3.3.1 Citometria de fluxo.....	30
3.3.2 Avaliação da apoptose pela coloração de Brometo de Etídio/Laranja de Acridina .....	33
3.4 Análise estatística .....	33
3.5 Fluxograma.....	34
4 RESULTADOS .....	35
4.1 Avaliação da atividade citotóxica dos compostos .....	35
4.2 Avaliação das alterações morfológicas.....	38
4.3 Avaliação da integridade da membrana e da densidade de células .....	40
4.4 Avaliação do efeito sobre a progressão do ciclo celular .....	42
4.5 Avaliação do padrão de morte celular .....	44
5 DISCUSSÃO.....	51
6 CONCLUSÃO.....	58
7 PERSPECTIVAS FUTURAS .....	59
REFERÊNCIAS .....	60

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer

O câncer é uma doença genética causada por mutações no DNA que podem ser herdadas, adquiridas espontaneamente ou induzidas por agressões do ambiente, de modo que essas mutações alteram genes vitais e provocam disfunções nos processos de proliferação e morte celular, gerando um conjunto de mais de 100 doenças que podem afetar qualquer parte do corpo (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; HASSANPOUR, DEGHANI, 2017).

Segundo a organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e foi responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018. A nível global, uma em cada seis mortes são relacionadas à doença. A incidência e a mortalidade por câncer estão crescendo rapidamente em todo o mundo, fato que pode ser relacionado ao envelhecimento, crescimento populacional e mudanças na prevalência e distribuição dos principais fatores de risco para câncer. Estima-se que em 2030 haverá 27 milhões de casos novos de câncer, 17 milhões de mortes pela doença e 75 milhões de pessoas vivendo com câncer (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2016; OMS, 2018).

No Brasil, a estimativa para o biênio de 2018 e 2019, aponta a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer para cada ano, com 130 mil óbitos anuais. O câncer já é a segunda causa de morte por doenças, atrás apenas das doenças cardiovasculares, mostrando a relevância desse grupo de doenças no país. Os cânceres mais frequentes em homens são próstata, pulmão, intestino, estômago e cavidade oral; já em mulheres são os cânceres de mama, intestino, colo do útero, pulmão e tireoide (Figura 1) (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2018).

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma

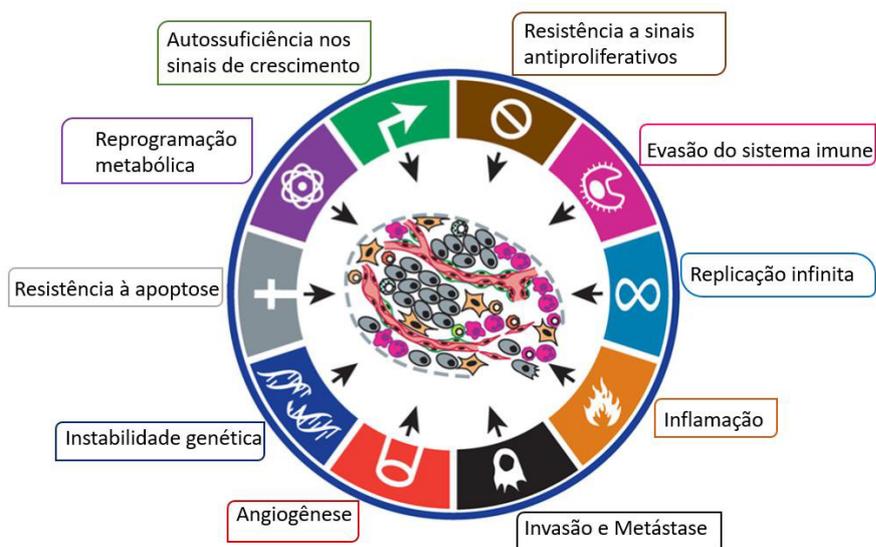
Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	<b>Homens</b>		Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Côlon e Reto	18.980	9,4%
Côlon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	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%

Fonte: Instituto Nacional de Câncer (2018).

Os cânceres também são conhecidos como neoplasias malignas, pois as alterações genéticas e epigenéticas alteram a expressão ou função de genes que regulam os processos celulares fundamentais, como crescimento, sobrevivência e senescência. Em geral, as mutações oncogênicas fazem com que as células neoplásicas incorporem características que permitem a sobrevivência além de sua expectativa de vida normal e interrompem os sistemas de sinalização que regulam o desenvolvimento celular, dotando essas células com vários atributos que sustentam a proliferação anormal e mantêm o comportamento maligno. Essas células possuem vantagens evolutivas em relação às normais e podem sobreviver e proliferar sob circunstâncias normalmente desfavoráveis, possibilitando a formação de um clone (LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; GIANCOTTI, 2014; FEITELSON *et al.*, 2015).

O princípio do distúrbio proliferativo na carcinogênese baseia-se na presença de mutações que interferem nas sinalizações de crescimento, tornando as células autossuficientes nos sinais de crescimento e resistentes aos inibidores de crescimento. As características das células neoplásicas, que lhes conferem vantagens de sobrevivência são: capacidade de autorrenovação ilimitada, autossuficiência na proliferação, resistência a fatores antiproliferativos, evasão à morte celular, evasão de mecanismos de defesa imune, alterações metabólicas, capacidade de indução de angiogênese, potencial invasivo e modificação do microambiente tecidual (Figura 2) (LOURO *et al.*, 2002; FOSTER, 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 2 - Principais características das células neoplásicas



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

As células cancerígenas têm defeitos nos mecanismos de controle que governam a frequência com que se dividem e nos sistemas de retroalimentação que regulam esses mecanismos, gerando falhas na homeostase.

O desenvolvimento neoplásico requer mudanças em algumas classes de genes que desempenham papéis regulatórios fundamentais: proto-oncogenes que promovem crescimento, genes supressores do tumor, genes que regulam a morte celular programada e genes envolvidos no reparo do DNA. A ativação aberrante dos proto-oncogenes em conjunto com a inibição não-regulada dos genes supressores tumorais e a resistência à apoptose representam os fundamentos desse processo. A expressão anormal de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular e da morte celular resulta na perda de controle populacional dessas células, já que o crescimento celular excede a taxa de células mortas (LOURO *et al.*, 2002; FARIA; RABENHORST, 2006; FOSTER, 2008; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas resultante do acúmulo de alterações genéticas que dão origem ao fenótipo modificado. As células transformadas perdem os controles celulares normais como consequência de alterações moleculares em diferentes níveis de regulação e passam a se multiplicar de maneira anormal e descontrolada, podendo formar massas (tumores) capazes de invadir tecidos vizinhos. Com a constante multiplicação celular, há a necessidade de que novos vasos sanguíneos sejam formados para que haja a nutrição destas células, em um processo denominado angiogênese. As células do tumor são capazes de se desprender e ao atingir vasos sanguíneos ou linfáticos podem migrar e formar um implante descontínuo do tumor primário, formando as metástases (DE ALMEIDA *et al.*, 2005; PINHO, 2005).

## 1.2 Ciclo Celular

A proliferação celular é um processo fortemente regulado que envolve um grande número de moléculas e vias de sinalização para manter a homeostase dos tecidos. Para que haja a mitose, a célula passa por uma sequência de eventos onde há a duplicação do DNA num processo conhecido como ciclo celular (FOSTER, 2008).

O ciclo celular é coordenado por diversas moléculas que permitem a sua progressão em fases marcadas por eventos complexos, como a condensação, a replicação e a segregação dos cromossomos pelas fibras do fuso mitótico. As quatro fases são: G1 (fase pré-sintética em que as células crescem e se preparam para a divisão ou entram em quiescência – G0), S (replicação do DNA), G2 (preparação para mitose) e Mitose (divisão do material genético e citocinese) (Figura 3). Normalmente, quando uma célula está danificada ou alterada geneticamente, o ciclo celular não evolui corretamente pelas fases, a divisão não se completa e a célula sofre um processo de morte. As células cancerígenas, entretanto, perderam essa capacidade de regulação e mesmo estando transformadas por mutações oncogênicas, o ciclo

celular ocorre e o erro é passado para as células filhas, aumentando assim a instabilidade genética (HARTWELL; KASTAN, 1994; FOSTER, 2008; INGHAM; SCHWARTZ, 2017).

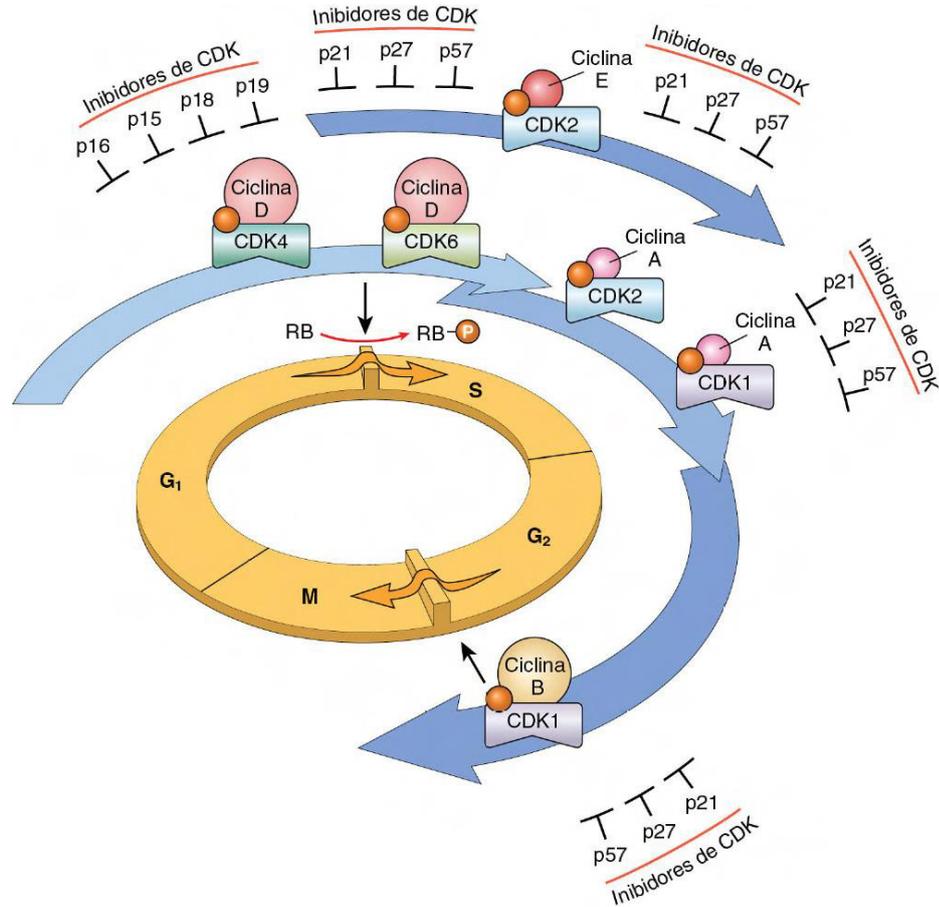
Devido ao seu papel central em manter a homeostasia tecidual e regular os processos de crescimento fisiológico, como a regeneração e o reparo, o ciclo celular tem múltiplos pontos de controle. A passagem de células de uma fase do ciclo celular para a fase seguinte exige uma cascata de fosforilações de proteínas e um conjunto de *checkpoints* que monitoram a conclusão de eventos críticos da fase anterior e retardam ou bloqueiam a progressão para o próximo estágio, caso seja necessário. O primeiro ponto de controle é entre as fases G1/S e monitora a integridade do DNA antes da sua replicação, sendo marcado pela fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb), que funciona como um interruptor do ciclo celular. O segundo ponto de controle é de G2 para M e verifica o DNA após sua replicação e monitora se a célula pode entrar com segurança na mitose (COLLINS; JACKS; PAVLETICH, 1997).

As moléculas responsáveis pela regulação e progressão do ciclo celular são as ciclinas, proteínas assim chamadas devido à natureza de sua produção e degradação, e as enzimas quinases dependentes de ciclina (CDKs), que requerem ligação a uma ciclina para se tornarem cataliticamente competentes. Os complexos ciclina-CDKs são responsáveis pela fosforilação de diversas proteínas que serão ativadas e inativadas durante as fases do ciclo (HARTWELL; KASTAN, 1994).

Nos *checkpoints* acontece o controle dos eventos do ciclo celular, mediado pelos complexos ciclina-CDKs. A atividade das CDKs é verificada pelas proteínas inibidoras do ciclo celular, ou proteínas inibidoras de CDK (cki), exemplificadas por p21, p27 e p57. As proteínas que medeiam o controle na fase G1/S se mostram na sua forma inativa na maioria dos cânceres, enquanto que alterações nos checkpoints de G2-M são menos comuns (FOSTER, 2008).

Quando células danificadas estão em processo de replicação do DNA, o processo de divisão celular é parado ou atrasado até que o dano tenha sido reparado. Esse fato é uma vantagem, pois limita a proliferação de células com material genético modificado. No câncer, frequentemente há alguma desregulação no ciclo celular, o que permite que o fenótipo maligno seja transmitido da célula alterada para suas células filhas. Para que isso aconteça é necessário que as células cancerígenas não respondam aos estímulos inibitórios que determinam a sua saída do ciclo e rompam os pontos de controle que ocorrem entre as fases (KASTAN; BARTEK, 2004).

Figura 3 - Representação do ciclo celular



Fonte: Kumar, Abbas, Aster (2009).

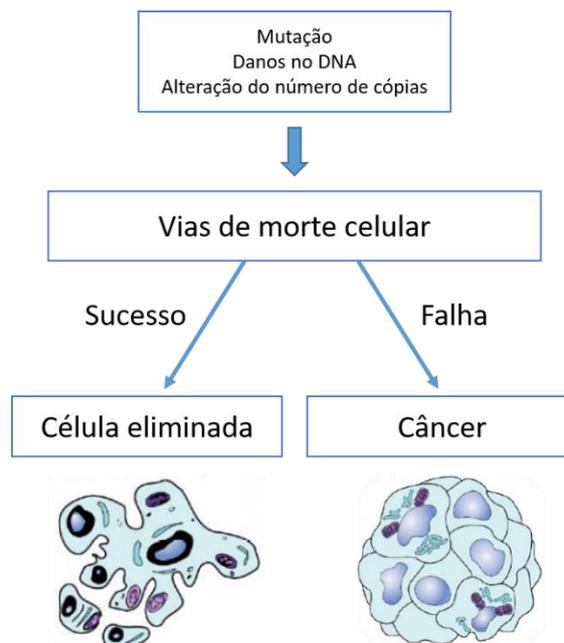
Papel das ciclinas, CDKs e inibidores de CDK na regulação do ciclo celular. A ciclina D-CDK4, ciclina D-CDK6 e ciclina E-CDK2 regulam a transição G<sub>1</sub> para S por fosforilação da proteína Rb (pRb). A ciclina A-CDK2 e a ciclina A-CDK1 estão ativas na fase S. A ciclina B-CDK1 é essencial para a transição de G<sub>2</sub> para M. Duas famílias de inibidores de CDK podem bloquear a atividade de CDKs e a progressão através do ciclo celular. Os chamados inibidores INK4, compostos de p16, p15, p18 e p19, agem sobre ciclina D-CDK4 e ciclina D-CDK6. A outra família de três inibidores, p21, p27 e p57, pode inibir todas as CDKs.

As falhas podem ocorrer tanto nos proto-oncogenes, que são estimuladores de divisão celular, como nos genes supressores tumorais, que são os protetores do ciclo celular, assim como em qualquer gene que codifique proteínas relacionadas à regulação e controle do ciclo celular, como as genes que codificam as ciclinas, CDKs e seus inibidores, resultando em um ciclo celular defeituoso e permitindo a sobrevivência ou o crescimento contínuo de células com anormalidades genômicas, aumentando assim a chance de transformação maligna (KASTAN; BARTEK, 2004; FOSTER, 2008).

### 1.3 Morte celular e câncer

A morte celular desempenha um papel importante na manutenção e regulação da homeostase em organismos multicelulares. Um dos principais marcos no câncer é o desequilíbrio entre a taxa de proliferação celular e a morte celular. A destruição das células danificadas ajuda a minimizar a progressão maligna, porém os defeitos nas vias de morte celular são marcas importantes do câncer. A resistência à apoptose é uma marca importante do processo neoplásico, mas as células tumorais podem ser induzidas a morrer por outros mecanismos diferentes da apoptose, como a necrose, a senescência, a autofagia e a catástrofe mitótica. Diversas vias de morte celular são reportadas tanto na fisiologia normal, como durante a tumorigênese, e são esses caminhos que podem ser manipulados no desenvolvimento de novas terapias contra o câncer (Figura 4) (DILLON; GREEN, 2016; MISHRA *et al.*, 2018).

Figura 4 - O papel da morte celular programada no câncer



Fonte: Adaptado de Kumar, Abbas, Aster (2009).

A morte celular programada significa um processo dentro do desenvolvimento e não acidental que segue diversos passos bem regulados e que levam a uma autodestruição. A apoptose é o tipo de morte celular programada mais comum e pode estar relacionada com desenvolvimento, diferenciação, renovação celular e remoção de danos genéticos prejudiciais às células. A desregulação da apoptose está intimamente relacionada com diversas condições patológicas, inclusive o câncer (KEPP *et al.*, 2011; MISHRA *et al.*, 2018).

As células apoptóticas são caracterizadas por alterações morfológicas como contração celular, condensação da cromatina, formação de prolongamentos ou brotamentos da membrana plasmática, perda de adesão às células vizinhas ou à matriz extracelular, além de alterações bioquímicas, como a clivagem do DNA. Por fim, ocorre a fragmentação celular em estruturas conhecidas como "corpos apoptóticos", que serão fagocitados por macrófagos e degradados sem causar inflamação (MISHRA *et al.*, 2018).

A apoptose ocorre através de duas vias: via extrínseca e via intrínseca. A via extrínseca é mediada por um receptor de morte na superfície celular, como o Fas (FAS) e o fator de necrose tumoral (TNF). A via intrínseca é iniciada por estímulos intracelulares, tais como hipóxia, dano genético irreparável, privação de nutrientes, estresse oxidativo grave e perda de homeostase celular. A cascata de sinalização de ambas as vias é conduzida por proteases de cisteína conhecidas como caspases, que inicialmente são expressas na sua forma inativa. As caspases iniciadoras das vias extrínseca e intrínseca são as caspases 8 e 9, respectivamente (OKADA; MAK, 2004).

Na via extrínseca, após a ligação do receptor de superfície celular com o seu ligante, ocorre a ativação da pró-caspase 8 que desencadeia na ativação de caspases efetoras, culminando com a fragmentação nuclear. As pró-caspases são ativadas por proteínas. A via intrínseca está diretamente relacionada com a mitocôndria, pois esta organela contém uma série de proteínas que são capazes de induzir apoptose, como o citocromo c e outras proteínas que neutralizam inibidores endógenos da apoptose. A permeabilidade mitocondrial é o fator determinante entre a sobrevivência e a morte celular. Quando a célula é estimulada a iniciar o processo de apoptose, as membranas tornam-se permeáveis ao citocromo c, que é liberado no citosol e em conjunto com alguns cofatores, ativa a caspase 9, que desencadeia uma cascata de sinalização resultando na apoptose (KUMAR *et al.*, 2009; BELLANCE; LESTIENNE; ROSSIGNOL, 2009; OUYANG *et al.*, 2012).

A apoptose funciona como um processo importante para o bloqueio do crescimento neoplásico e inibe as metástases por reduzir a quantidade de células alteradas viáveis. Algumas terapia atuais do câncer envolvem moléculas que agem nas vias apoptóticas. Cada anormalidade ou defeito nas vias apoptóticas aponta para um possível alvo a ser estudado para o tratamento de câncer, restaurando as vias de sinalização apoptóticas (MISHRA *et al.*, 2018).

A autofagia é um processo catabólico bem regulado e conservado que funciona como um mecanismo de sobrevivência em períodos de privação ou injúria. Durante a autofagia, onde ocorre a degradação de organelas celulares, como os ribossomos e as mitocôndrias, nos lisossomos para fornecer nutrientes e energia. Células que sofrem autofagia excessiva são

induzidas a morrer de uma maneira não apoptótica e a morfologia das células autofágicas é distinta (OKADA; MAK, 2004).

O processo de autofagia desempenha um papel duplo na regulação da morte celular: uma função pró-sobrevivência sob certas circunstâncias e um processo pró-morte numa variedade de doenças, incluindo o câncer. Assim, a autofagia parece impedir o crescimento das células tumorais. Mas, na fase tardia do crescimento tumoral, a autofagia pode ser útil para os tumores, pois os metabólitos gerados podem suprir as necessidades para o crescimento e a sobrevivência das células tumorais (LIN; BAEHRECKE, 2015; MISHRA *et al.*, 2018).

A necrose é uma forma não regulada de morte celular, consequência de um processo de destruição celular traumático, que é caracterizado pela tumefação celular, perda de integridade na membrana e liberação de componentes intracelulares, culminando na dissolução das células e inflamação local. O trauma resultante causa falha de vias fisiológicas normais que são essenciais para manutenção da homeostase celular, como a regulação da transporte iônico, produção de energia e balanço de pH (OKADA; MAK, 2004; KEPP *et al.*, 2011).

Estudos recentes mostraram um nova forma de morte celular programada chamada necroptose ou necrose regulada. Essa via é ativada em condições particulares, quando uma parte da maquinaria apoptótica é imperfeita, quando as células sofrem lesões graves ou quando são tratados com quimioterapia e não podem seguir o processo apoptótico. Na necroptose, as células comprometidas irão morrer de maneira ordenada e orquestrada. Essa recente descoberta de que a necrose nem sempre é um processo puramente acidental despertou muito interesse no desenvolvimento de moduladores de necrose. Os indutores de necrose podem ser úteis no tratamento de tumores resistentes à apoptose (DILLON; GREEN, 2016; MISHRA *et al.*, 2018).

#### **1.4 Linfomas não Hodgkin**

As neoplasias malignas linfóides, também chamadas de linfomas, podem ser definidas como um acúmulo progressivo de um clone de células linfóides resultante de alterações genéticas que ocorreram no genoma da célula. Os linfomas são caracterizados por tumores sólidos no sistema imune, mais especificamente nos linfonodos, e podem afetar qualquer órgão do corpo, apresentando uma grande diversidade de sintomas. A diversidade de subtipos de linfoma reflete os numerosos subconjuntos linfóides que as células precursoras comuns podem originar, que diferem em linhagem e em grau de maturação funcional. As neoplasias podem surgir em células de qualquer uma dessas linhagens e estágios de diferenciação. São morfologicamente divididos em linfomas de Hodgkin (LH) e não-Hodgkin

(LNH) (KLUMB, 2001; SHANKLAND; ARMITAGE; HANCOCK, 2012; JIANG; BENNANI; FELDMAN, 2017).

O LH é responsável por cerca de 10% de todos os linfomas e os 90% restantes são LNH. O LNH causa muitas mortes em todo o mundo e sua incidência está aumentando, principalmente os linfomas agressivos, o que pode ser explicado pela maior incidência de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e pela exposição a fatores ambientais. Para o Brasil, estimam-se 5.370 casos novos de LNH em homens e 4.810 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019. Para ambos os sexos, é a 11ª neoplasia mais frequente entre todos os cânceres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,19 casos novos a cada 100 mil homens e 4,55 para cada 100 mil mulheres (CHIU; WEISENBURGER, 2003; SHANKLAND; ARMITAGE; HANCOCK, 2012; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2018).

As diversas variantes de LNH surgem um acúmulo de várias etapas de aberrações genéticas que induzem uma vantagem de crescimento seletivo do clone maligno. As translocações, amplificações e deleções são eventos recorrentes que ocorrem durante diferentes etapas da diferenciação de células B, e muitas vezes são um passo inicial na transformação maligna. Essas alterações levam à expressão desregulada de oncogenes que frequentemente controlam a proliferação celular, sobrevivência e diferenciação. Um exemplo é a amplificação do gene *BCL2*, que codifica uma proteína que previne a apoptose, favorecendo o acúmulo dessas células. Curiosamente, estas translocações sozinhas são muitas vezes insuficientes para o desenvolvimento dos linfomas, sendo necessárias alterações genéticas adicionais para a completa transformação maligna, o que acontece mais facilmente em células que se dividem descontroladamente (NOGAI; DORKEN; LENZ, 2011).

Os LNH formam um grupo heterogêneo de malignidades de aproximadamente 40 formas distintas desta doença, cada um com epidemiologia, etiologia, características morfológicas, características imunofenotípicas, genética e clínica distintas. Eles são agrupados de acordo com o tipo de célula linfóide, se linfócitos B ou T, além de serem considerados tamanho, forma e padrão de apresentação celular. Os linfomas de células B são a forma mais comum de LNH e podem surgir em qualquer fase do processo de maturação das células. Também podem ser agrupados como indolentes ou agressivos, com base na rapidez da progressão tumoral. Os linfomas indolentes crescem e se dispersam lentamente, podendo não necessitar de tratamento imediato. O tipo mais comum de linfoma indolente é o linfoma folicular. Os linfomas agressivos proliferam rapidamente e geralmente precisam ser tratados imediatamente. O tipo mais comum de linfoma agressivo é o linfoma difuso de grandes células B (GUERARD; BISHOP, 2012).

### 1.4.1 Linfoma de Burkitt

O linfoma de Burkitt (LB) é um linfoma não Hodgkin altamente agressivo originário de células B maduras ou do centro germinativo. É o linfoma de células B mais comum em crianças. Ele foi descrito inicialmente na África, sendo o tumor humano de mais rápido crescimento, com tempo de duplicação celular de 24 a 48 horas. A mortalidade é alta devido ao rápido crescimento e avanço das células transformadas ainda no momento de diagnóstico. A sobrevida global média é de apenas 2,7 meses (KLUMB, 2001; MRDENOVIC *et al.*, 2019).

O LB consiste em três subtipos: endêmico, esporádico e associado à imunodeficiência. O LB endêmico foi a primeira neoplasia em humanos associada a um vírus oncogênico e está diretamente relacionada com infecção pelo Epstein-Barr (EBV). A incidência desse tumor é alta em áreas endêmicas de malária, particularmente na África, afetando indivíduos com idade abaixo de 15 anos e se manifesta como aumento da mandíbula ou dos ossos faciais. A forma esporádica da doença é uma forma mais rara e ocorre em outros países, se desenvolve no abdômen com envolvimento da medula óssea, rins, ovários, mamas ou outros órgãos também podem estar envolvidos. Essa forma comumente afeta crianças e adultos jovens. O LB associado à imunodeficiência ocorre principalmente em indivíduos com infecção por HIV e, menos comumente, em outros distúrbios de imunodeficiência ou receptores de transplantes de órgãos (KELLY; RICKINSON, 2007; CASULO; FRIEDBERG, 2018; KALISZ *et al.*, 2019).

Ambos os subtipos da doença estão associados a rearranjos no oncogene *MYC*, causando superexpressão constitutiva de *c-myc*, que normalmente desempenha um papel central na transcrição e regulação de um conjunto de genes que controlam diversos processos celulares, incluindo o ciclo celular, proliferação, diferenciação e morte celular programada. A superexpressão de c-Myc é comum em linfomas agressivos e parece estar relacionado ao estágio clínico avançado, prognóstico desfavorável e sobrevida global mais curta. A translocação entre o braço longo do cromossomo 8 e o gene da cadeia pesada de imunoglobulina no cromossomo 14 é vista em 80% dos casos de LB, enquanto que a translocação entre o braço longo do cromossomo 8 e o gene da cadeia leve kappa no cromossomo 2 ou o gene da cadeia leve lambda no cromossomo 22 é observada em 20% dos casos. A perda da regulação dessa proteína resulta na ativação e repressão de vários genes regulados por ela, como ciclina D, ciclina E, CDK4, p27, p53, Bax, Fas e Fas ligante, entre outros (HECHT; ASTER, 2000; SÁNCHEZ-BEATO; SÁNCHEZ-AGUILERA; PIRIS, 2003).

O LB exibe é uma doença muito heterogênea e exibe cursos clínicos diversos entre os pacientes. Acredita-se que os subtipos clínicos surjam a partir dos diferentes estágios de

maturação das células B envolvidas. A patogênese do LB é caracterizada por níveis bastante elevados de c-myc, que leva à rápida proliferação de células B, responsável pelo rápido tempo de duplicação das células tumorais. Uma outra característica importante e comumente observada nas células transformadas do LB é a hiperexpressão de bcl-2, uma proteína que previne a apoptose pela via mitocondrial. A coexpressão dessas proteínas tem sido associado a uma menor sobrevida (MOLYNEUX *et al.*, 2012; SESQUES; JOHNSON, 2017; KALISZ *et al.*, 2019).

### **1.5 Perspectivas de tratamento para o câncer**

O câncer surge através de um processo mutagênico de várias etapas onde as células tumorais possuem um conjunto de propriedades que lhes conferem potencial replicativo ilimitado, auto-suficiência nos sinais de crescimento e resistência a fatores antiproliferativos e apoptóticos. As células tumorais se apresentam de forma bastante heterogênea devido ao acúmulo de mutações que ocorrem em consequência da instabilidade genética crescente e formação de subclones com variados fenótipos que atribuem a essas células vantagens de sobrevivência (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A complexidade das alterações no câncer e o crescimento tumoral geralmente avançado antes de seu diagnóstico são os maiores desafios na obtenção de respostas terapêuticas eficazes. Portanto, o sucesso do tratamento depende da identificação de pontos críticos e funcionais nas vias oncogênicas, cuja inibição resultará em falha do sistema, culminando com a inibição do estado tumorigênico por apoptose, necrose, senescência ou diferenciação. Além disso, esses agentes terapêuticos devem exibir uma grande janela terapêutica, induzindo a morte de células tumorais e privando as células normais (LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009).

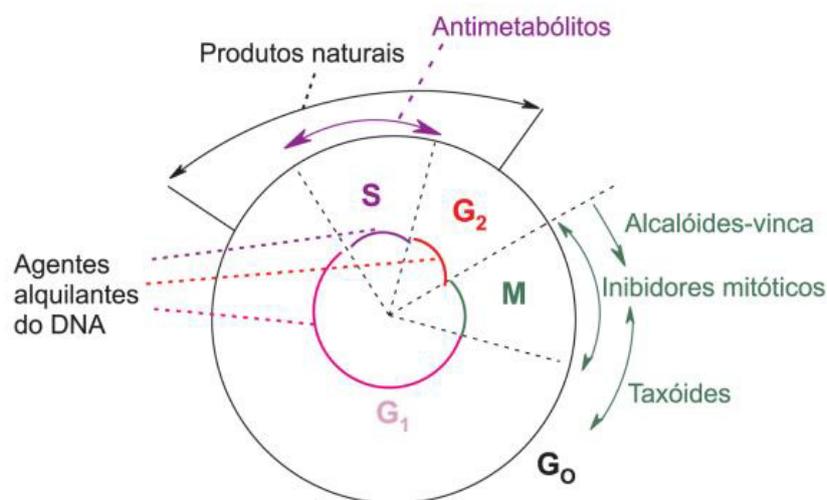
Os principais tipos de tratamento para o câncer são a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia, sendo que em alguns casos pode ser necessário a combinação de mais de uma modalidade. A remoção cirúrgica do tumor é eficaz quando ainda não há metástases e muitas vezes é associada a outras terapias. A radioterapia é a modalidade terapêutica que utiliza as radiações ionizantes no combate aos agentes neoplásicos com objetivo de atingir células malignas, impedindo sua multiplicação por mitose ou determinando a morte celular, além de reduzir o tamanho do tumor e evitar o aparecimento de metástases ou recidivas (ALMEIDA *et al.*, 2005; LOUIS *et al.*, 2012).

O uso de protocolos de quimioterapia teve início na década de 1940 com as mostardas nitrogenadas, que são poderosos agentes alquilantes e antimetabólitos. A partir do sucesso destes tratamentos iniciais, um grande número de novas moléculas antitumorais vem

sendo desenvolvidas. A quimioterapia envolve o uso de drogas de baixo peso molecular, isoladas ou em combinação, para destruir as células tumorais ou reduzir a sua proliferação. Os fármacos anticancerígenos podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação, como: agentes alquilantes do DNA, antimetabólitos, agentes antitubulina, antibióticos citotóxicos, hormônios, inibidores de proteína quinase, anticorpos monoclonais e outros agentes biológicos (NUSSBAUMER *et al.*, 2011).

Existem diversos mecanismos que estão envolvidos na evolução de uma célula normal para uma célula potencialmente maligna, mas a maior parte deles interferem na divisão celular. Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular, e são denominados fármacos ciclo-celular específicos (Figura 5). Agentes citotóxicos que atuam através de lesão no DNA tem toxicidade máxima na fase de síntese (S) do ciclo, enquanto que agentes que bloqueiam a formação do fuso mitótico são mais efetivos na fase de mitose (M). Dessa forma, as neoplasias mais susceptíveis a esse tipo de quimioterapia são as que exibem uma elevada taxa de células em proliferação, como as leucemias e os linfomas. Um segundo grupo de agentes, denominados fármacos ciclo-celular não específicos, tem a capacidade de exterminar as células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso no compartimento G<sub>0</sub> (MURAD; KATZ, 1996).

Figura 5 - Atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos, dependendo da fase do ciclo celular



Fonte: Almeida *et al.* (2005).

Relação aproximada dos ciclos metabólicos com os tipos de agentes quimioterápicos mais comuns.

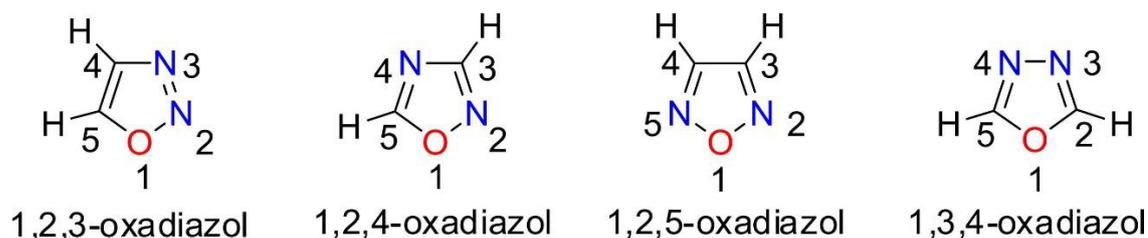
O objetivo da quimioterapia é destruir as células neoplásicas e preservar as células normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais, o que explica os diversos efeitos colaterais dessa terapia. Os fármacos anticâncer, em sua maioria, são antiproliferativos, muitos danificam o DNA e afetam células normais de divisão rápida, causando resultados indesejados como supressão da medula óssea, comprometimento na cicatrização, lesões do trato gastrointestinal, alopecia, depressão do crescimento em crianças, náuseas e carcinogenicidade, pois muitos fármacos citotóxicos são mutagênicos (DE ALMEIDA *et al.*, 2005; NUSSBAUMER *et al.*, 2011; RANG *et al.*, 2012).

A resistência a medicamentos é um grande obstáculo na terapia do câncer, principalmente os mais agressivos. A maioria dos linfomas tem sido tratada com quimioterapia, imunoterapia, radioterapia e transplante de células-tronco autólogas. Os regimes de imunoquimioterapia podem ter resultados favoráveis imediatos, mas o prognóstico é pobre em doenças refratárias ou recidivantes. Além disso, os anticorpos monoclonais tornaram-se outra opção terapêutica. O rituximabe (anticorpo monoclonal anti-CD20) é o anticorpo monoclonal mais avançado em ensaios clínicos e tornou-se parte do tratamento padrão para alguns linfomas. Portanto, se faz necessária a busca por novas estratégias de tratamento, que sejam mais eficazes, seguras e capazes de reduzir ou reverter o processo neoplásico (HENNESSY, HANRAHAN, DALY, 2004).

### **1.6 Acilamidoximas e 1,2,4-Oxadiazóis**

Os oxadiazóis são compostos químicos heteroaromáticos derivados do furano pela substituição de dois grupos metano (-CH=) por dois átomos de nitrogênio do tipo piridina (-N=). O oxadiazol é uma base muito fraca e devido às substituições dos grupos metano, a característica aromática do anel é reduzida, de tal forma que o anel de oxadiazol apresenta um caráter de dieno conjugado. Existem quatro isômeros possíveis do oxadiazol, dependendo da posição do átomo de nitrogênio no anel, que são 1,2,3-oxadiazol, 1,2,5-oxadiazol, 1,2,4-oxadiazol e 1,3,4-oxadiazol (Figura 6). No entanto, 1,3,4-oxadiazol e 1,2,4-oxadiazol são mais conhecidos e mais amplamente estudados devido às suas propriedades químicas e biológicas importantes (CLAPP, 1976; GUPTA; KUMAR; GUPTA, 2005; RAVAL *et al.*, 2014).

Figura 6 - Isômeros constitucionais dos Oxadiazóis



Fonte: Freitas *et al.* (2012).

Os 1,2,4-oxadiazóis são moléculas muito relevantes para a indústria farmacêutica. Esses compostos compõem uma classe de heterociclos com propriedades farmacológicas diversificadas. O sistema de anéis heteroaromáticos é de natureza neutra e atua como parte essencial de qualquer molécula biologicamente ativa, já que estes possuem semelhança com relação aos compostos biologicamente ativos do nosso organismo, como ácidos nucleicos, hormônios e neurotransmissores. Eles podem ser usados como parte fundamental do grupo farmacofórico, contribuindo diretamente na interação da molécula com o sítio ativo biológico; mas também podem ser usados como ligante, posicionando determinados substituintes da molécula em orientação adequada. O heterociclo quando posicionado na extremidade das moléculas atua como um modulador das propriedades biológicas (JOLE; MILLS, 2004; BOSTRÖM *et al.*, 2011).

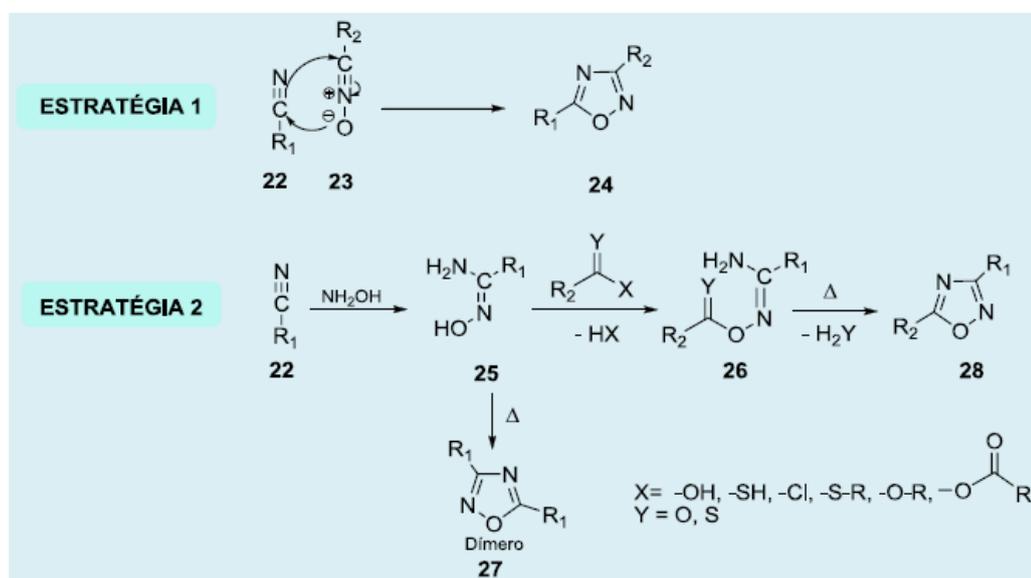
Atualmente, o potencial terapêutico desse grupo de moléculas é inquestionável, pois estão presentes em medicamentos disponíveis no mercado ou em moléculas promissoras que estão em fase de avaliação. O uso dos 1,2,4-oxadiazóis como moléculas biologicamente ativas é vasto, pois já foram descritas diversas aplicações para estes compostos, como: atividades antiasmática, antidiabética, anti-inflamatória, antimicrobiana, anti-helmíntica, antitumoral, imunossupressora e neuroprotetora (OZOE *et al.*, 2000; NEVES FILHO *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2012).

Diversos estudos tem mostrado que derivados de 1,2,4-oxadiazóis apresentaram potencial antitumoral, os quais foram ativos frente à linhagens de câncer de mama, cólon, leucemia, glioblastoma, próstata e cervical. Ensaios mostraram que estes oxadiazóis foram capazes de induzir a apoptose de forma seletiva para células neoplásicas sem afetar a vitalidade das células normais. Estudos também mostraram que os 1,2,4-oxadiazóis podem inibir a angiogênese a partir do antagonismo de receptores localizados na superfície de células tumorais, retardando o crescimento do câncer (ZHANG *et al.*, 2005; KEMNITZER *et al.*, 2008; PACE; PIERRO, 2009; KUMAR *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2013).

Estes compostos também apresentaram a capacidade de inibir de forma seletiva as sirtuínas, que são alvos para o tratamento de doenças neurológicas, metabólicas e doenças relacionadas à idade, incluindo o câncer. Compostos do tipo 1,2,4-oxadiazol-5-carboxamida foram sintetizados e testados como inibidores da síntese de glicogênio, um regulador importante na diferenciação e proliferação celular. Estudos recentes mostram que esses diazóis são capazes de interferir no ciclo celular de células cancerígenas, causando parada no ciclo e acúmulo de células na fase G0/G1, afetando a duplicação do material genético (CUNHA; DE AGUIAR, 2015; MONIOT *et al.*, 2017; DE OLIVEIRA *et al.*, 2018; CASCIOFERRO *et al.*, 2019).

Os 1,2,4-oxadiazóis podem ser obtidos por algumas vias de síntese, sendo que as duas mais comuns são a cicloadição 1,3- dipolar de nitrilas e N-óxidos de nitrila e a formação de uma O-acilamidoxima seguida de ciclização e desidratação (Figura 7). O método mais utilizado para a síntese envolve a formação de O-acilamidoximas obtidas a partir da acilação de amidoximas com ácidos carboxílicos ou derivados de ácidos carboxílicos. Estas sofrem posteriormente uma eliminação por aquecimento para formar os 1,2,4-oxadiazóis desejados. As reações para formação dos anéis heterocíclicos 1,2,4-oxadiazóis são realizadas em processos que envolvem altas temperaturas. Em 2011, Carbone e colaboradores isolaram o primeiro 1,2,4-oxadiazol de origem natural a partir do molusco marinho *Phidiana militaris*, o qual apresentou alta citotoxicidade contra linhagens celulares tumorais e não tumorais de mamíferos em ensaios *in vitro* (KAYUKOVA, 2005; CARBONE *et al.*, 2011; FREITAS *et al.*, 2012; HEMMING *et al.*, 2013).

Figura 7 - Estratégias de síntese para obtenção de 1,2,4-oxadiazóis



Fonte: Freitas *et al.* (2012).

Estruturalmente, esse sistema de ciclos aromáticos é importante na interação com os pares de bases do DNA. Eles tem uma capacidade de configuração capaz de atuar como aceitadores de ligação de hidrogênio, formando porções que facilitam a ligação de moléculas com sítios de ligação de DNA e enzimas, como a topoisomerase. A proteína p53 induz a apoptose nas células cancerígenas e é expressa como efeito secundário ao dano no DNA, além de desempenhar um papel vital na determinação dos níveis das proteínas Bax e Bcl-2 (BOSTRÖM *et al.*, 2011; ABDELHAMEID, 2018).

As amidoximas, intermediárias da síntese dos 1,2,4-oxadiazóis, são compostos que apresentam em sua estrutura grupos amina (-NH<sub>2</sub>) e isonitroso (=NOH) ligados simultaneamente a um carbono, o que fornece a esses compostos um caráter anfótero. As amidoximas e seus derivados possuem inúmeras atividades biológicas e farmacológicas, tais como: antimalária, antileishmania, antitumoral, antimicrobiana, antituberculostático, antibacteriana, anti-histamínico, contra arritmia cardíaca, ansiolítico/antidepressivo, antihipertensivo, antiinflamatórios/antioxidante e antiviral (FREITAS FILHO *et al.*, 2015).

Diante da necessidade de se obter a cura do câncer, diversos esforços e estratégias tem se desenvolvido para buscar novos compostos sintéticos ou naturais que visam prevenir, reverter ou suprimir o processo neoplásico, tendo como característica comum a citotoxicidade, que geralmente resulta na morte das células tumorais por diversas vias. A síntese de novos compostos com potencial antitumoral pode ser uma rota para a melhoria do tratamento dos linfomas, pois espera-se que estes tenham a capacidade de modular vias oncogênicas (MA; WANG, 2009).

O Linfoma de Burkitt, é uma doença hematológica emergencial, necessitando de uma intervenção terapêutica rápida e efetiva, logo tem sido propostos estudos com a finalidade de avaliar a atividade antitumoral de novas moléculas, contribuindo com uma melhor eficácia do tratamento e conseqüentemente no prognóstico dessa doença.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito citotóxico e antiproliferativo *in vitro* de *O*-Acilamidoximas e 1,2,4-oxadiazóis em linhagens de células tumorais.

### 2.2 Objetivos Específicos

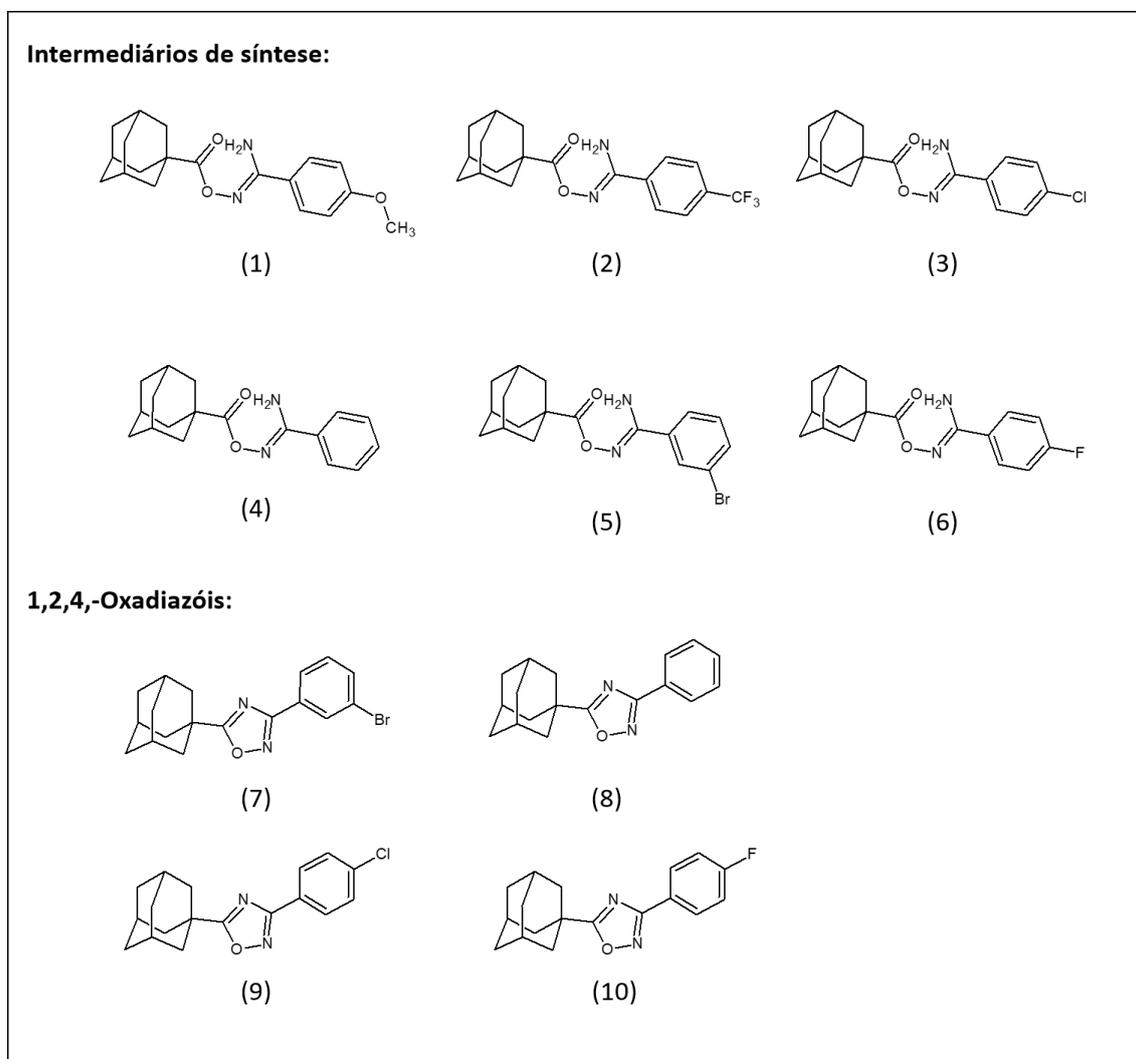
- Avaliar a atividade citotóxica de *O*-Acilamidoximas e 1,2,4-oxadiazóis em linhagens de células tumorais humanas (PC-3, HL-60, HCT-116, SF-295, K-562, KG-1, RAJI) e uma linhagem não tumoral murina (L-929).
- Selecionar a linhagem mais sensível à ação das moléculas com melhor potencial citotóxico.
- Avaliar os prováveis mecanismos de ação responsáveis pela citotoxicidade das moléculas com melhor potencial citotóxico em linhagem mais seletiva, através de:
  - Análise dos efeitos tempo e concentração dependente.
  - Análise morfológica das células.
  - Análise da viabilidade celular através da integridade de membrana.
  - Determinação do conteúdo de DNA nuclear e o efeito sobre a progressão do ciclo celular.
  - Identificação do mecanismo de indução de morte celular.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

As moléculas testadas foram substâncias puras da classe dos 1,2,4-oxadiazóis (DFA 64, DFA 66, DFA 65 e DFA 60) e seus intermediários de síntese (DFA 56, DFA 59, DFA 61, DFA 62, DFA 58 e DFA 52) (Figura 8). As moléculas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Ronaldo Nascimento de Oliveira do Laboratório de Síntese de Compostos Bioativos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (AGUIAR *et al.*, 2019). As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) puro estéril e testadas na concentração de 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Figura 8 - Estruturas dos compostos analisados



(1) DFA 52, (2) DFA 56, (3) DFA 58, (4) DFA 59, (5) DFA 61, (6) DFA 62, (7) DFA 60, (8) DFA 64, (9) DFA 65, (10) DFA 66.

As linhagens tumorais utilizadas, PC-3 (Adenocarcinoma de próstata), HL-60 (Leucemia aguda promielocítica), HCT-116 (Carcinoma colorretal), SF-295 (Glioblastoma), K-562 (Leucemia mielóide crônica), KG-1 (Leucemia mielóide aguda) e RAJI (Linfoma de Burkitt) e a linhagem não tumoral L-929 (Fibroblasto murino) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US-NCI, United States-National Cancer Institute) tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640 (IMDM para KG-1) suplementado com 10% de soro fetal bovino (20% para RAJI) e 1% de antibióticos, manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical e mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

A avaliação da viabilidade e da proliferação celular é uma metodologia importante na determinação das respostas celulares a fatores externos, predizendo o potencial citotóxico das substâncias em estudo. Esses métodos se fundamentam na avaliação da função celular, como atividade enzimática, permeabilidade da membrana celular, adesão celular, produção de ATP, produção de coenzima e atividade de captação de nucleotídeos. O método do tetrazólio (MTT) é um dos métodos mais usados para este fim. Este é um método colorimétrico capaz de determinar a viabilidade celular a partir da predição de células metabolicamente ativas, permitindo assim uma quantificação das mudanças na taxa de morte ou proliferação celular (MOSMANN *et al.*, 1983).

O reagente MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) de coloração amarela é reduzido por células metabolicamente ativas, pela ação de enzimas desidrogenase, e o produto dessa reação é o formazan de coloração roxa que pode ser solubilizado pelo DMSO e quantificado por espectrofotometria. As células saudáveis irão apresentar altas taxas de redução de MTT para formazan enquanto as células inativas ou mortas são incapazes de realizar esta atividade. A intensidade da cor roxa indica maior viabilidade celular, enquanto que a redução da intensidade dessa cor significa o número reduzido de células e, conseqüentemente, citotoxicidade da substância avaliada (BAHUGUNA *et al.*, 2017).

As células foram plaqueadas em placa de 96 poços na concentração de  $0,1 \times 10^6$  cél/mL para as linhagens PC-3 e SF-295;  $0,3 \times 10^6$  cél/mL para RAJI, K-562, KG-1, HL-60 e L-929 e  $0,7 \times 10^5$  cél/mL para HCT-116 (Tabela 1). Após 72 horas de incubação, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT e as placas foram incubadas por 3 horas. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

Tabela 1 - Linhagens celulares testadas durante o estudo

<b>Linhagem Celular</b>	<b>Tipo histológico</b>	<b>Origem</b>	<b>Concentração de plaqueamento (cél/mL)</b>
<b>PC-3</b>	Adenocarcinoma de próstata	Humana	$0,1 \times 10^6$
<b>HL-60</b>	Leucemia aguda promielocítica	Humana	$0,3 \times 10^6$
<b>HCT-116</b>	Carcinoma colorretal	Humana	$0,7 \times 10^5$
<b>SF-295</b>	Glioblastoma	Humana	$0,1 \times 10^6$
<b>K-562</b>	Leucemia mielóide crônica	Humana	$0,3 \times 10^6$
<b>KG-1</b>	Leucemia mielóide aguda	Humana	$0,3 \times 10^6$
<b>RAJI</b>	Linfoma de Burkitt	Humana	$0,3 \times 10^6$
<b>L-929</b>	Fibroblasto não transformado	Murino	$0,3 \times 10^6$

A análise dos dados foi realizada utilizando os programas GraphPad Prism versão 6.0 e Excel. Os valores das absorbâncias provenientes dos testes de concentração única foram transformados em porcentagem e posteriormente comparadas com o controle negativo. Os experimentos foram analisados segundo a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular de pelo menos três experimentos. A determinação da concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>), a partir dos testes de diluição seriada, foi obtida por testes de regressão não linear com intervalos de confiança de 95%.

Os experimentos seguintes foram realizados para elucidar o mecanismo envolvido na ação citotóxica das acilamidoximas em células RAJI. As concentrações foram escolhidas com base nos valores de CI<sub>50</sub> obtidos nas curvas dose-resposta obtidas pelo ensaio MTT após 48 horas de tratamento: DFA 52 (6,4; 12,8 e 25,6  $\mu$ M) e DFA 59 (4,6; 9,2 e 18,4  $\mu$ M). As células foram tratadas com doxorrubicina (1  $\mu$ M) como controle positivo.

### **3.2 Análise morfológica – Coloração diferencial com panótico rápido**

A coloração com kit panótico rápido 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.

As células foram plaqueadas na concentração de  $0,1 \times 10^6$  cél/mL em placas de 24 poços, tratadas e incubadas. Após o período de incubação, as células foram transferidas para tubos e centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 1 mL de PBS. As lâminas foram preparadas com o uso de uma citocentrífuga. Em seguida, as lâminas foram fixadas e coradas. Depois de secas foram montadas com lamínulas fixadas e visualizadas em microscópio óptico.

### **3.3 Estudo do mecanismo de ação**

#### **3.3.1 Citometria de fluxo**

A citometria de fluxo é um método utilizado para caracterizar e definir diferentes tipos celulares em uma população heterogênea de células e analisar o tamanho e o volume das mesmas. Essa técnica é capaz de analisar a expressão de moléculas intracelulares e de superfície celular e assim qualificar diversos eventos celulares. Ela é usada para medir a intensidade de fluorescência produzida por anticorpos marcados com fluorescência ou substâncias que se ligam a moléculas associadas a células específicas, como a ligação de iodeto de propídio ao DNA. As células suspensas em um meio líquido são analisadas em citômetro ao passar por uma fonte de luz que é dispersada em várias direções dependendo do tamanho, que se dá por dispersão linear (FSC, Forward Scatter), e da complexidade, por dispersão lateral (SSC, Side Scatter), de cada célula. A informação resultante pode ser analisada com um programa específico acoplado ao citômetro (SHAPIRO, 1995).

As células foram plaqueadas na concentração de  $0,1 \times 10^6$  cél/mL em uma placa de 24 poços, tratadas e incubadas. A fluorescência das células foi determinada em citômetro de fluxo Guava EasyCyte Mine usando o software Guava Express Plus após 48 horas de incubação. Cada experimento foi realizado em triplicata. A análise dos dados da citometria de fluxo foi feita com base na média  $\pm$  erro padrão da média; e para a verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste Student Newman-Keuls, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### *3.3.1.1 Determinação da integridade da membrana e densidade celular*

O teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídio (PI) penetrar nas células cuja membrana esteja rompida e após ligação ao DNA emitir alta fluorescência quando excitado pelo laser. As células com membrana íntegra emitem baixa fluorescência (SHAPIRO, 1995).

Após o tempo de incubação indicado, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de PI em tampão fosfato a 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Após 5 minutos, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Foram obtidas informações sobre morfologia celular (espalhamento frontal e lateral da luz, o que corresponde ao tamanho e granulosidade relativa entre as células, respectivamente) e integridade de membrana utilizando-se o filtro para o espectro do vermelho (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1992).

### *3.3.1.2 Análise de conteúdo e fragmentação de DNA*

Esse teste baseia-se na capacidade do PI se ligar ao DNA. Inicialmente, a membrana plasmática das células foi permeabilizada por um detergente, permitindo que o PI se ligue 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 PI 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.

Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1 % de Triton X-100 e 2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  iodeto de propídio em PBS). Após o período de incubação por 40 minutos no escuro, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo. Os gráficos do ciclo celular foram analisados no programa ModFit LT (Verity Software House).

### *3.3.1.3 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial*

Esse teste baseia na capacidade da mitocôndria sequestrar um corante fluorescente nucleofílico, a rodamina 123. Quando esta organela apresenta potencial transmembrânico inalterado, as células que sequestram a rodamina emitem alta fluorescência quando atingidas pelo laser. Alterações no potencial transmembrânico levam ao efluxo da rodamina de dentro da mitocôndria, gerando eventos que emitirão menor fluorescência quando comparado as células que possuem mitocôndrias normais.

Uma alíquota de 100µL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 200µL de uma solução de solução de rodamina 1 µg.mL<sup>-1</sup>. Após 15 minutos de incubação no escuro, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm/5min. O sobrenadante foi então descartado e 100 µL de PBS foram adicionados em cada amostra e reincubadas por mais 30 minutos no escuro, para posterior análise no citômetro de fluxo (CURY-BOAVENTURA; POMPÉIA; CURI, 2004).

#### *3.3.1.4 Avaliação da Externalização da Fosfatidilserina – Anexina V*

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 (VERMES; HAANEN; REUTELINGSPERGER, 2009).

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.

Após o tempo de incubação indicado, 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 adquiridas no citômetro de fluxo. A fluorescência da Anexina V conjugada com a PE 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.

### **3.3.2 Avaliação da apoptose pela coloração de Brometo de Etídio/Laranja de Acridina**

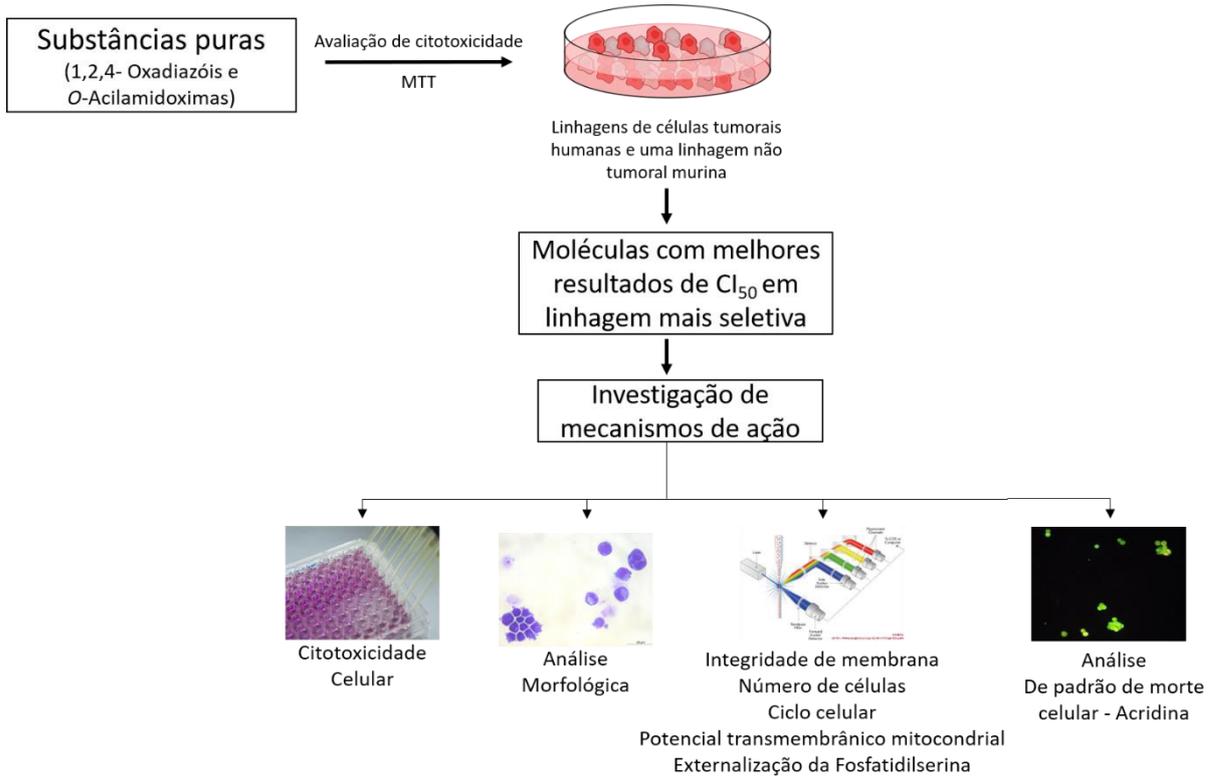
A laranja de acridina é um corante que apresenta a capacidade de se intercalar na molécula de DNA emitindo uma fluorescência de cor verde. Semelhantemente a ela, o brometo de etídio também possui esta propriedade, porém, a fluorescência emitida neste caso corresponde à cor alaranjada, marcação esta que irá caracterizar células inviáveis. Em contrapartida, as células viáveis com membrana intacta apresentarão um padrão de cor verde uniforme em seu núcleo. Na apoptose, as células serão caracterizadas por apresentarem algumas áreas da sua cromatina coradas em laranja. Este padrão de marcação distingue, portanto, o núcleo apoptótico do necrótico já que as células necróticas apresentam núcleo com coloração laranja uniforme (CURY-BOAVENTURA *et al.*, 2006).

Após 48 horas de incubação, 6 µL da solução corante foram adicionados a uma alíquota de 300 µL de suspensão de células tratadas e não tratadas. As células foram transferidas para uma lâmina sendo coberta então com uma lamínula e em seguida, levadas para o microscópio de fluorescência para observação dos efeitos celulares. Para quantificar o percentual de cada um dos eventos celulares (células viáveis, apoptóticas e necróticas), foram contadas 300 células de cada amostra.

### **3.4 Análise estatística**

Todas as análises foram realizadas no GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, Califórnia, EUA). Os dados foram apresentados como média ± E.P.M. Os valores de CI50 e seus intervalos de confiança de 95% foram obtidos por regressão não linear. As diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de múltiplas faixas de Student - Newman - Keuls ( $p < 0,05$ ).

### 3.5 Fluxograma



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da atividade citotóxica dos compostos

O efeito antiproliferativo dos compostos sintetizados foi avaliado *in vitro* contra sete linhagens celulares tumorais (RAJI, HL-60, KG-1, K-562, PC-3, HCT-116 e SF-295) e uma linhagem não tumoral (L-929). Os compostos foram testados em concentrações fixas de 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  pelo ensaio colorimétrico do MTT. A partir deste ensaio inicial, foi observado que alguns compostos apresentaram atividade citotóxica preferencialmente contra as linhagens de RAJI e HL-60, contra as quais obtiveram 75% ou mais de inibição de crescimento celular (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores de porcentagem de inibição a partir de dois experimentos independentes, realizados em duplicata, em linhagens tumorais e uma não tumoral, após 72 horas de incubação. Todas as amostras foram testadas a 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

	RAJI	HL-60	KG-1	K-562	PC-3	HCT-116	SF-295	L-929
<b>DFA 52</b>	96,72%	94,57%	5,68%	48,17%	10,40%	52,16%	7,37%	16,47%
<b>DFA 56</b>	97,96%	95,03%	20,48%	72,35%	11,36%	42,62%	4,88%	24,20%
<b>DFA 58</b>	83,15%	48,01%	16,92%	29,11%	17,11%	35,24%	0,70%	38,91%
<b>DFA 59</b>	97,01%	91,38%	25,44%	29,48%	14,75%	52,39%	1,09%	23,43%
<b>DFA 60</b>	25,37%	0,84%	23,51%	22,38%	7,82%	23,25%	0,00%	10,30%
<b>DFA 61</b>	96,86%	97,46%	23,56%	0,00%	10,64%	57,99%	1,92%	19,04%
<b>DFA 62</b>	96,43%	93,91%	25,50%	24,69%	8,58%	59,66%	4,66%	8,65%
<b>DFA 64</b>	12,89%	13,37%	10,94%	5,73%	21,99%	8,36%	0,96%	26,13%
<b>DFA 65</b>	ND*	24,66%	ND*	5,73%	32,68%	7,18%	1,49%	17,94%
<b>DFA 66</b>	ND*	30,19%	ND*	15,33%	21,68%	20,08%	1,46%	23,92%

ND\*: Não Determinado

As linhagens RAJI, HL-60 e K562 foram selecionadas para a determinação de  $CI_{50}$  por meio do ensaio de MTT. Foram testadas concentrações na faixa de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os valores de  $CI_{50}$  variaram de 6,87  $\mu\text{M}$  para DFA 52 a 19,50  $\mu\text{M}$  para DFA 56 em células RAJI e K-562, respectivamente. Alguns valores de  $CI_{50}$  não foram estimados, pois resultaram maiores que a máxima concentração testada (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores de  $CI_{50}$  ( $\mu M$ ) obtidos pelo método de MTT com um intervalo de confiança de 95%, calculado por regressão não-linear a partir de dois experimentos independentes, realizados em duplicata, em 3 linhagens tumorais hematológicas e uma linhagem não tumoral murina, após 72 horas de incubação.

	<b>K-562</b>	<b>RAJI</b>	<b>HL-60</b>	<b>L-929</b>
<b>DFA 52</b>	>30	<b>6,87</b> 5,76- 8,18	<b>8,61</b> 7,78- 9,52	>30
<b>DFA 56</b>	<b>19,50</b> 16,42-23,15	<b>9,26</b> 6,62 – 12,95	<b>10,91</b> 9,00- 13,21	>30
<b>DFA 58</b>	>30	<b>11,92</b> 9,25 – 15,27	<b>10,58</b> 8,97 – 12,47	>30
<b>DFA 59</b>	>30	<b>8,15</b> 6,25 – 10,62	<b>10,77</b> 9,31 – 12,25	>30
<b>DFA 60</b>	>30	>30	>30	>30
<b>DFA 61</b>	>30	<b>14,24</b> 12,09 – 16,78	<b>14,30</b> 12,14 – 16,84	>30
<b>DFA 62</b>	>30	<b>9,47</b> 6,64 – 13,50	<b>11,16</b> 9,18 – 13,57	>30
<b>DFA 64</b>	>30	>30	>30	>30
<b>DFA 65</b>	>30	>30	>30	>30
<b>DFA 66</b>	>30	>30	>30	>30
<b>Dox</b>	<b>0,46</b> 0,45 - 0,47	<b>0,08</b> 0,07 – 0,09	<b>0,02</b> 0,01 - 0,02	<b>1,72</b> 1,58 - 1,87

Foi calculado o índice de seletividade (IS) para as substâncias com valor de  $CI_{50}$  inferior a 30  $\mu M$ . Este índice é definido como a divisão da  $CI_{50}$  de cada composto-teste na linhagem de células não tumorais (L929) pela  $CI_{50}$  do mesmo composto na linhagem de células neoplásicas ( $IS = CI_{50} \text{ L929} / CI_{50} \text{ célula neoplásica}$ ). O IS determina a seletividade de um composto por uma linhagem neoplásica em relação a uma não neoplásica (controle) em testes *in vitro*. Um alto valor de IS sugere que a substância será mais seletiva para células tumorais em eventuais testes *in vivo*, causando menos efeitos colaterais. Todos os valores de IS apresentados abaixo são expressos em valores mínimos (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores mínimos de índice de seletividade

	<b>K-562</b>	<b>RAJI</b>	<b>HL-60</b>
<b>DFA 52</b>	ND*	> 4,37	> 3,48
<b>DFA 56</b>	> 1,54	> 3,24	> 2,75
<b>DFA 58</b>	ND*	> 2,52	> 2,84
<b>DFA 59</b>	ND*	> 3,68	> 2,78
<b>DFA 60</b>	ND*	ND*	ND*
<b>DFA 61</b>	ND*	> 2,10	> 2,10
<b>DFA 62</b>	ND*	> 3,17	> 2,69
<b>DFA 64</b>	ND*	ND*	ND*
<b>DFA 65</b>	ND*	ND*	ND*
<b>DFA 66</b>	ND*	ND*	ND*

ND\*: Não Determinado

Após os ensaios de citotoxicidade pelo MTT em 72 horas, foram selecionadas as moléculas que apresentaram melhor atividade para ensaios de MTT em 48 e 24 horas na linhagem mais sensível, com os menores valores de  $CI_{50}$ . As moléculas selecionadas foram DFA 52, DFA 56 e DFA 59 (Tabela 5). As moléculas DFA 52 e DFA 59 obtiveram os menores resultados de  $CI_{50}$  no tempo de 48 horas e foram selecionadas para dar prosseguimento ao estudo dos possíveis mecanismos de ação envolvidos na sua atividade antiproliferativa.

Tabela 5 - Valores de  $CI_{50}$  ( $\mu M$ ) obtidos pelo método de MTT com um intervalo de confiança de 95%, calculado por regressão não-linear a partir de dois experimentos independentes, realizados em duplicata, em RAJI após 48 e 24 horas de incubação.

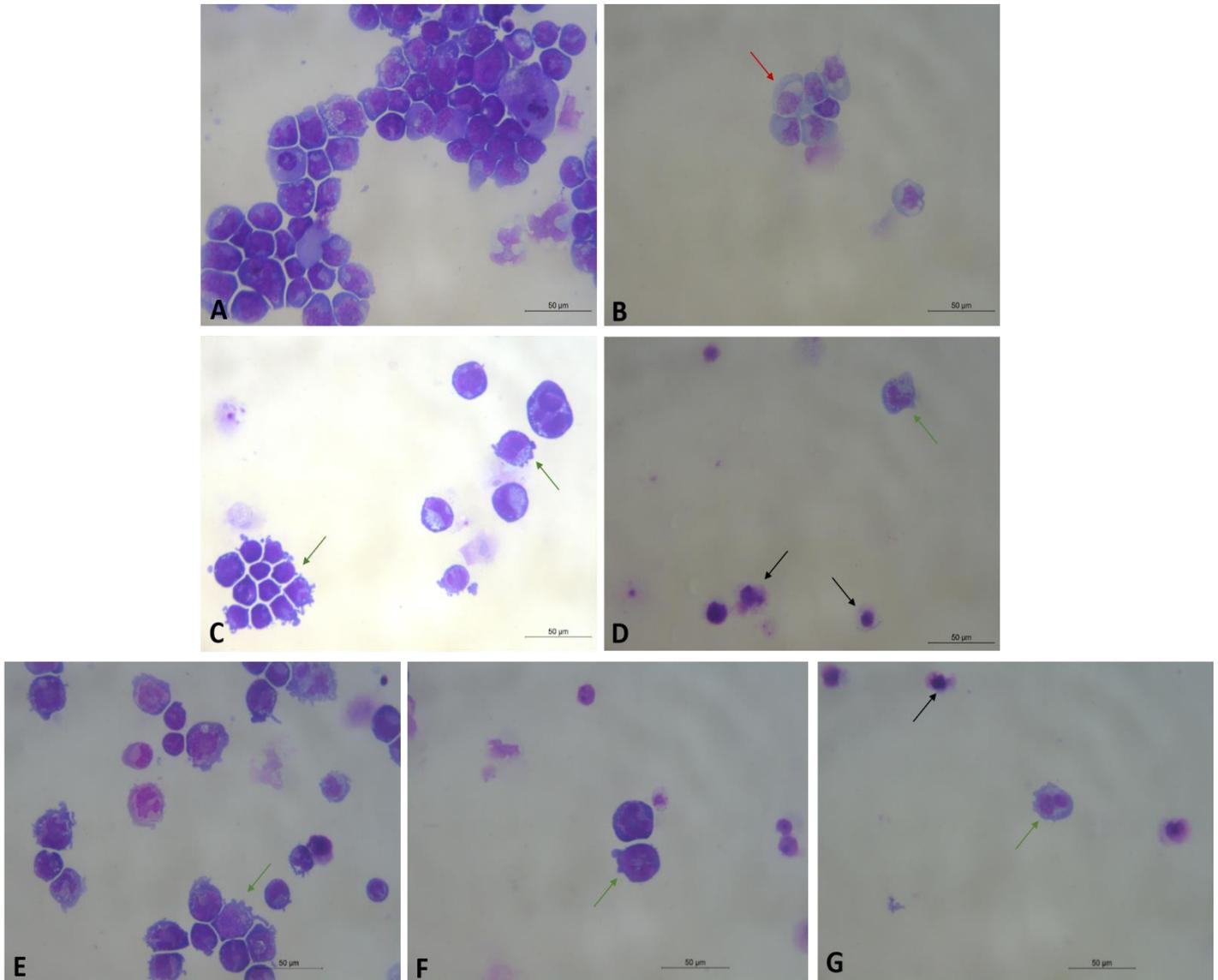
	<b>RAJI 48 horas</b>	<b>RAJI 24 horas</b>
<b>DFA 52</b>	<b>12,86</b> 10,63 - 15,54	<b>11,90</b> 9,21 - 14,28
<b>DFA 56</b>	<b>15,11</b> 12,55 - 18,20	<b>ND*</b>
<b>DFA 59</b>	<b>9,22</b> 7,33 - 11,57	<b>ND*</b>

ND\*: Não Determinado

## 4.2 Avaliação das alterações morfológicas

As células RAJI normalmente são caracterizadas por possuírem um grande diâmetro, núcleos irregulares e um citoplasma extenso, além da formação de agregados celulares. Após 48 horas de tratamento houve redução do número de células proporcional ao aumento da concentração das moléculas testadas. O tratamento com DFA 52 na concentração de 6,4  $\mu\text{M}$  induziu a formação de prolongamentos da membrana plasmática (“blebs”), o que pode indicar o início de um processo de apoptose. Na concentração de 12,8  $\mu\text{M}$  foi possível observar condensação nuclear e rompimento da membrana plasmática, que pode ser indicativo de processo de necrose ou apoptose em estágio tardio; a concentração de 25,6  $\mu\text{M}$  ocasionou intenso dano nas células, impossibilitando a análise da morfologia celular. O tratamento com DFA 59 nas concentrações de 4,6 e 9,2  $\mu\text{M}$  induziu a formação de “blebs”, indicando processo de apoptose. Na concentração de 18,4  $\mu\text{M}$  foi observada a perda de integridade da membrana plasmática. O aumento de vacúolos e a redução de células foram observados nas células tratadas com doxorubicina a 1  $\mu\text{M}$  (Figura 9).

Figura 9 - Imagens da morfologia das células RAJI após 48 horas de tratamento, coradas com kit panótico rápido. Células visualizadas por microscopia óptica. A e B - controle negativo e doxorrubicina, respectivamente; C e D - células tratadas com DFA 52 nas concentrações de 6,4 e 12,8  $\mu\text{M}$ , respectivamente; E, F e G - células tratadas com DFA 59 nas concentrações de 4,6; 9,2 e 18,4  $\mu\text{M}$ , respectivamente.



Células com “blebs” estão representadas pelas setas verdes; células com aumento do tamanho de vacúolos estão representadas pelas setas vermelhas, células em necrose estão representadas pelas setas pretas.

### 4.3 Avaliação da integridade da membrana e da densidade de células

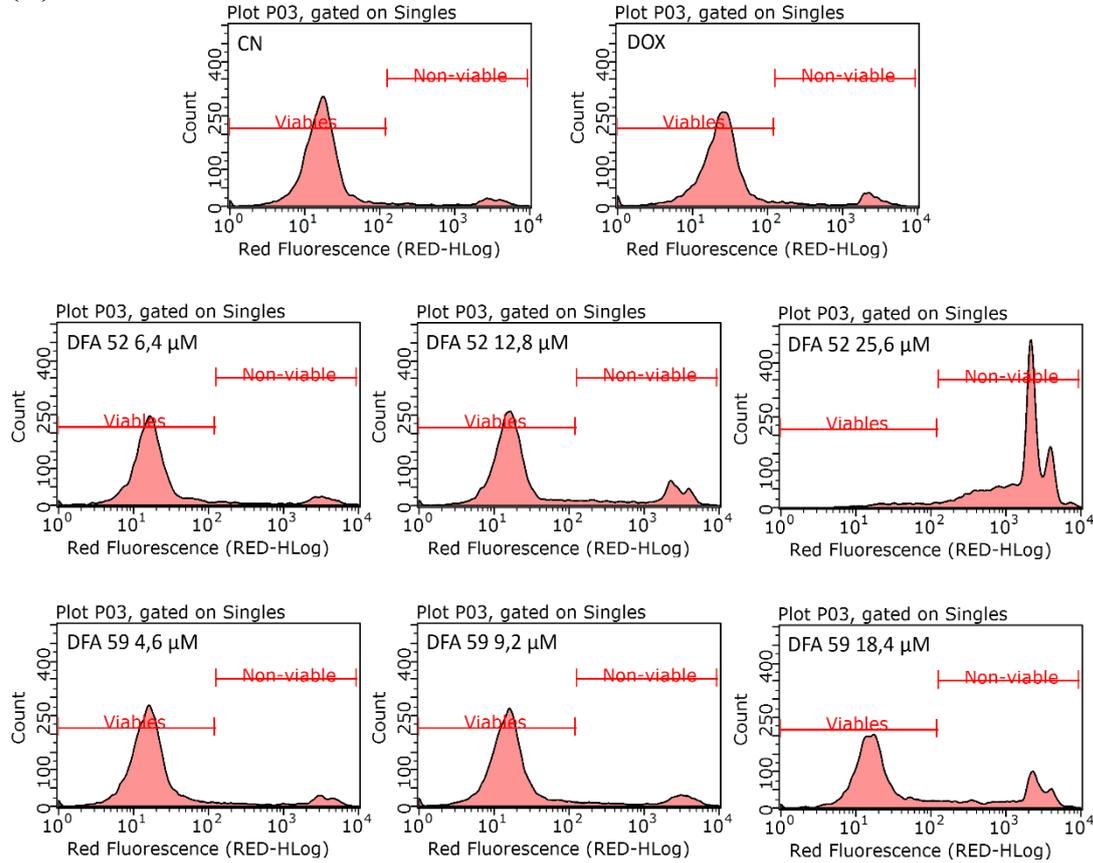
Para o estudo do mecanismo de ação das moléculas sobre as células RAJI, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo para avaliar a integridade da membrana e a densidade de células após o tratamento por 48 horas. Para a análise da integridade de membrana das células tratadas, foi utilizado o iodeto de propídio, um corante hidrofílico permeável apenas em células com membrana rompida, sendo capaz de distinguir células viáveis, com membrana íntegra, das células não viáveis, com membrana rompida.

Na análise da viabilidade celular, foram encontradas alterações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) na integridade da membrana das células tratadas com DFA 52 (12,8 e 25,6  $\mu\text{M}$ ) e DFA 59 (4,6 e 9,2  $\mu\text{M}$ ). O tratamento provocou uma redução no número de células viáveis, indicando que as amostras causaram danos na membrana das células (Figura 10).

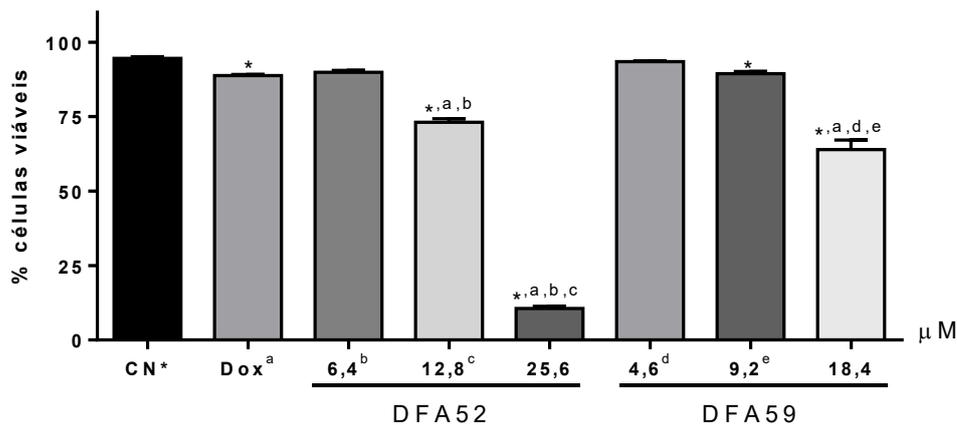
Ao avaliar a densidade de células, foi observada uma diminuição estatisticamente significativa do número de células nas diferentes concentrações testadas, exceto na menor concentração de DFA 59 (4,6  $\mu\text{M}$ ), quando comparado com o controle, sugerindo que as moléculas proporcionam uma inibição da proliferação de células RAJI. A doxorubicina alterou a integridade de membrana das células de forma significativa ( $p < 0,05$ ), além de reduzir a densidade de células (Gráfico 1).

Figura 10 - Efeito de DFA 52 e DFA 59 sobre a integridade de membrana, determinada por citometria de fluxo. Os histogramas representam células viáveis e células não viáveis, identificadas pela emissão de fluorescência vermelha após incorporação do iodeto de propídio (A). Os dados estão apresentados como os valores da média  $\pm$  E.P.M., obtidos por pelo menos três experimentos realizados em triplicata (B).

(A)



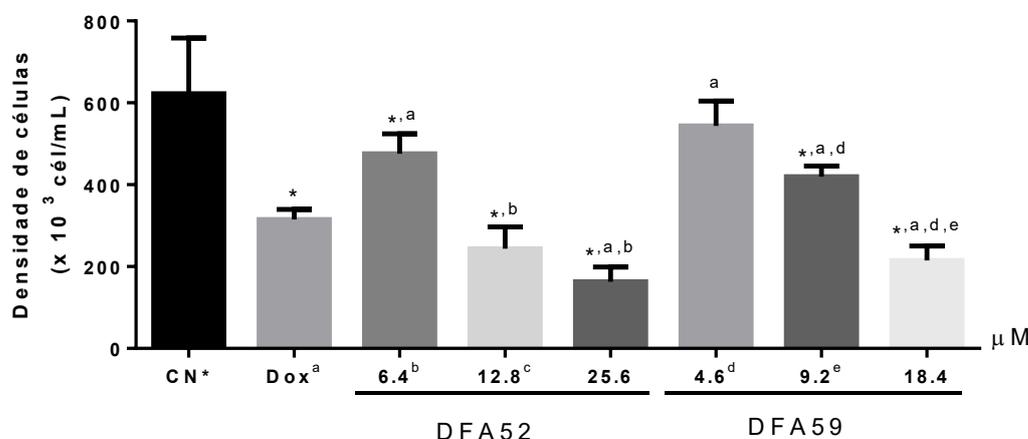
(B)



	Dox $\mu$ M		DFA52 ( $\mu$ M)			DFA59 ( $\mu$ M)		
	CN	1.0	6,4	12,8	25,6	4,6	9,2	18,4
<b>Viáveis (%)</b>	94,58	88,81	89,88	73,11	10,59	93,44	89,39	63,94
<b>EPM</b>	0,53	0,38	0,68	1,15	0,76	0,32	0,77	3,24

Legenda: CN (Controle Negativo); EPM (Erro Padrão da Média); \* ( $p < 0,05$  com relação ao CN); a ( $p < 0,05$  com relação a Dox); b ( $p < 0,05$  com relação a 6,4  $\mu$ M); c ( $p < 0,05$  com relação a 12,8  $\mu$ M); d ( $p < 0,05$  com relação a 4,6  $\mu$ M); e ( $p < 0,05$  com relação a 9,2  $\mu$ M).

Gráfico 1 - Efeito de DFA 52 e DFA 59 sobre a proliferação celular das células RAJI, avaliado pela densidade de células, determinada por citometria de fluxo.

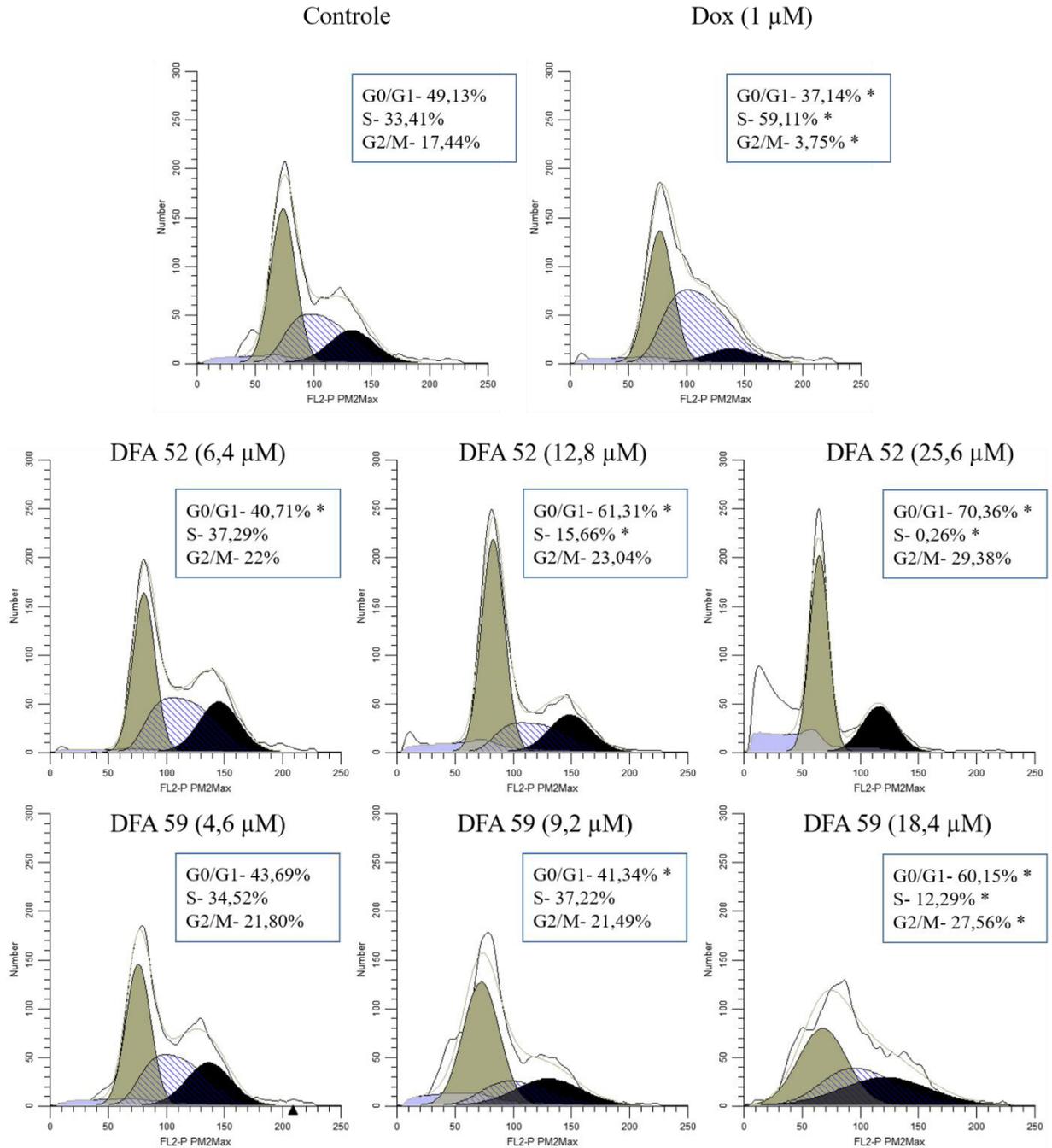


Legenda: CN (Controle Negativo); EPM (Erro Padrão da Média); \* ( $p < 0,05$  com relação ao CN); a ( $p < 0,05$  com relação a Dox); b ( $p < 0,05$  com relação a 6,4  $\mu\text{M}$ ); c ( $p < 0,05$  com relação a 12,8  $\mu\text{M}$ ); d ( $p < 0,05$  com relação a 4,6  $\mu\text{M}$ ); e ( $p < 0,05$  com relação ao 9,2  $\mu\text{M}$ ).

#### 4.4 Avaliação do efeito sobre a progressão do ciclo celular

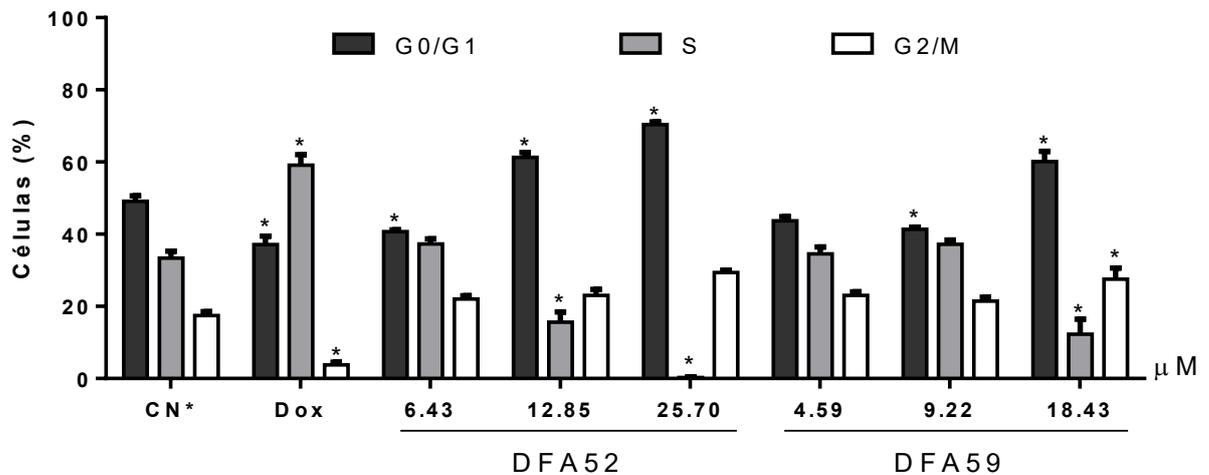
Na análise do conteúdo de DNA nuclear das células RAJI, observou-se que após o tratamento de 48 horas com os compostos houve interferência no ciclo das células. A molécula DFA 52 provocou a redução de células em G0/G1 na concentração de 6,4  $\mu\text{M}$ ; enquanto nas concentrações de 12,8 e 25,6  $\mu\text{M}$  aumentou as células na fase G0/G1 e provocou a redução de células na fase S ( $p < 0,05$ ). A molécula DFA 59 provocou a redução de células em G0/G1 na concentração de 9,22  $\mu\text{M}$  e na concentração de 18,43  $\mu\text{M}$  aumentou o número de células em G0/G1, diminuiu o número de células na fase S e aumentou o número de células em G2/M ( $p < 0,05$ ). A doxorrubicina reduziu o número de células em G0/G1, aumentou o número de células na fase S e reduziu o número de células em G2/M ( $p < 0,05$ ) (Figura 11 e Gráfico 2).

Figura 11 - Efeito de DFA 52 e DFA 59 sobre o conteúdo de DNA nuclear de células RAJI determinado por citometria de fluxo.



Os gráficos apresentados foram obtidos utilizando o programa ModFit LT. \* ( $p < 0.05$ ), comparado como controle por ANOVA seguido de teste de Newman Keuls. Ilustração de uma replicata representativa de cada experimento.

Gráfico 2 - Efeito de DFA 52 e DFA 59 na distribuição das fases do ciclo celular de células RAJI, determinado por citometria de fluxo.



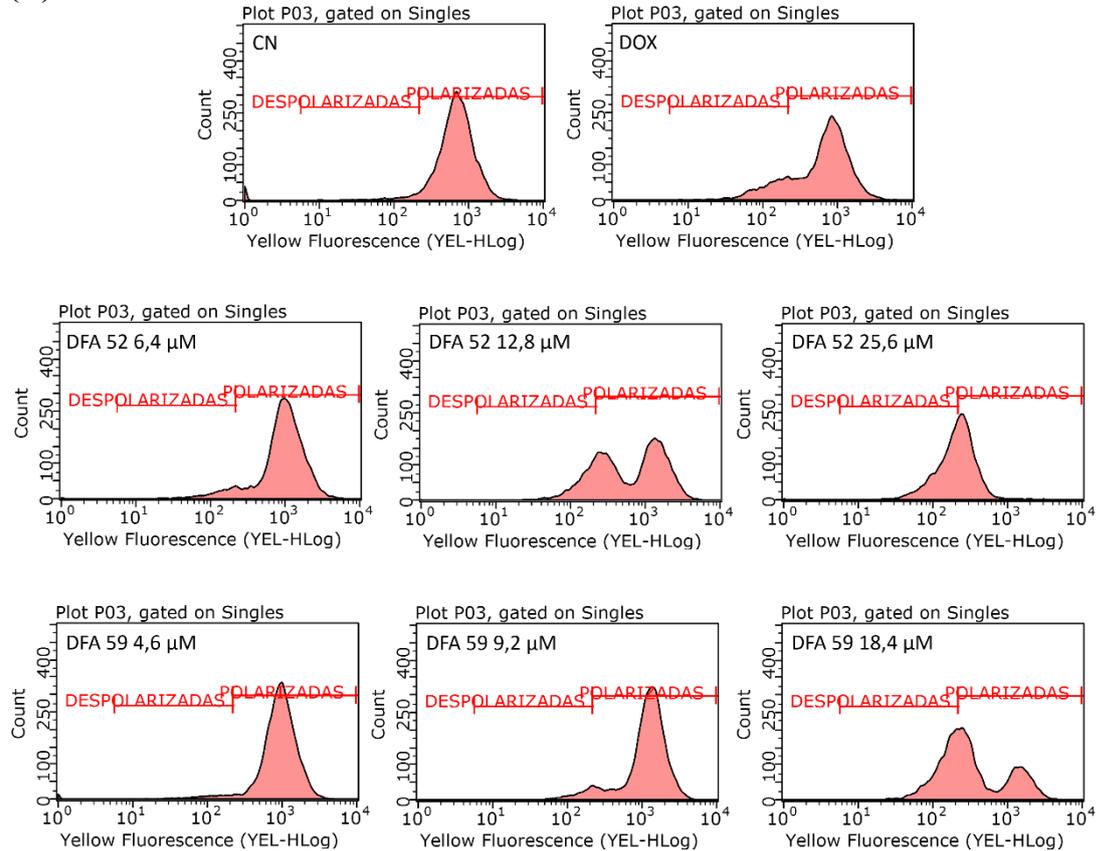
Legenda: CN (Controle Negativo); \* ( $p < 0,05$  com relação ao CN).

#### 4.5 Avaliação do padrão de morte celular

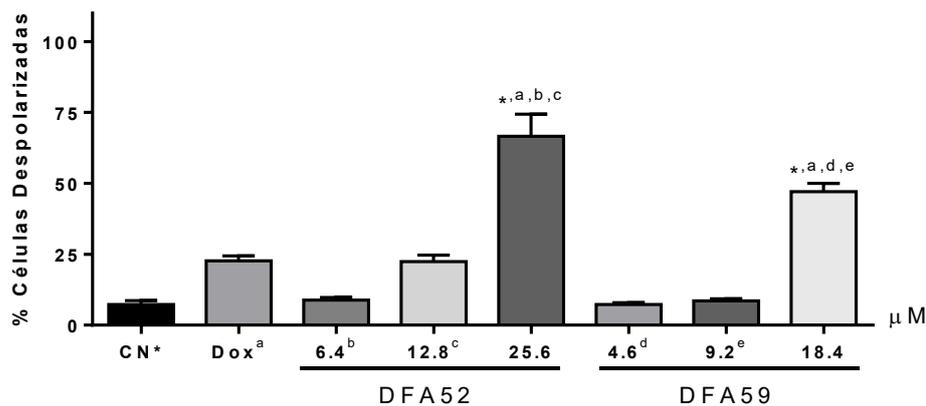
A análise da capacidade de induzir alterações no potencial transmembrânico da mitocôndria foi realizada por citometria de fluxo através da incorporação do corante Rodamina 123 após 48 horas de tratamento. Como observado na Figura 11, DFA 52 induziu despolarização mitocondrial em 66,59% das células tratadas com 25,6  $\mu\text{M}$  e DFA 59 induziu despolarização mitocondrial em 47,04% das células tratadas com 18,4  $\mu\text{M}$ , enquanto no controle negativo apenas 7,33% das células apresentavam despolarização da mitocôndria. A doxorrubicina causou despolarização mitocondrial em 22,66 % das células tratadas.

Figura 12 - Efeito de DFA 52 e DFA 59 sobre o potencial transmembrânico mitocondrial das células RAJI, avaliado pela despolarização de membrana, determinado por citometria de fluxo. Os histogramas representam células despolarizadas e células polarizadas, identificadas pela emissão de fluorescência amarela após incorporação da Rodamina 123 (A). Os dados estão apresentados como os valores da média  $\pm$  E.P.M., obtidos por pelo menos três experimentos realizados em triplicata (B).

(A)



(B)



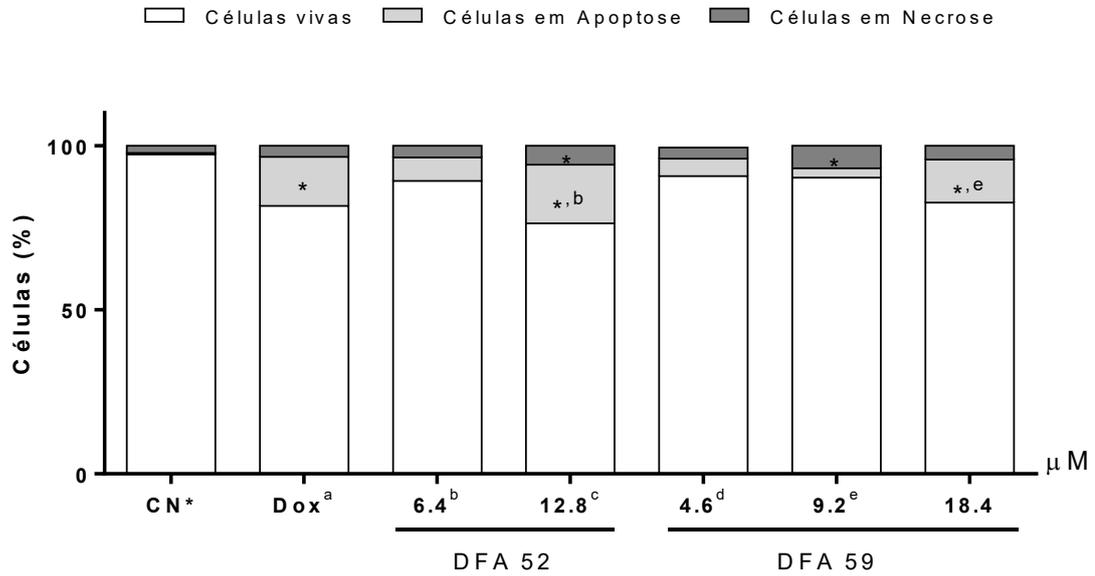
	Dox $\mu$ M		DFA52 ( $\mu$ M)				DFA59 ( $\mu$ M)		
	CN	1.0	6,4	12,8	25,6	4,6	9,2	18,4	
Despolarizadas (%)	7,329	22,66	8,81	22,42	66,59	7,303	8,564	47,04	
EPM	1,37	1,76	0,99	2,30	7,81	0,66	0,70	2,97	

Legenda: CN (Controle Negativo); EPM (Erro Padrão da Média); \* ( $p < 0,05$  com relação ao CN); a ( $p < 0,05$  com relação a Dox); b ( $p < 0,05$  com relação a 6,4  $\mu$ M); c ( $p < 0,05$  com relação a 12,8  $\mu$ M); d ( $p < 0,05$  com relação a 4,6  $\mu$ M); e ( $p < 0,05$  com relação ao 9,2  $\mu$ M).

A análise pela coloração de Laranja de acridina/Brometo de etídio permitiu identificar células vivas, apoptóticas e necróticas. Foram contadas 300 células de cada amostra. Os resultados foram analisados e, como observado na Figura 13, a porcentagem de células vivas reduziu com os tratamentos de forma dependente da dose. O tratamento com DFA 52 mostrou 17,93% de células coradas em laranja, indicando apoptose, e 5,77% de células coradas em vermelho, indicando necrose, na concentração de 12,8  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$ ); a concentração de 25,6  $\mu\text{M}$  provocou intensa destruição celular, impossibilitando a contagem das células. O tratamento com DFA 59 mostrou que 6,89% das células tratadas com 9,2  $\mu\text{M}$  sofreram necrose e 13,17% das células tratadas com 18,4  $\mu\text{M}$  indicavam apoptose ( $p < 0,005$ ). A doxorrubicina induziu apoptose em 14,96% das células contadas ( $p < 0,005$ ).

A análise pela microscopia também mostrou que as células tratadas apresentavam deformações na membrana, formação de corpos apoptóticos e redução de volume celular, mesmo que estas ainda não estivessem coradas em laranja, indicando um processo de apoptose inicial (Figura 14).

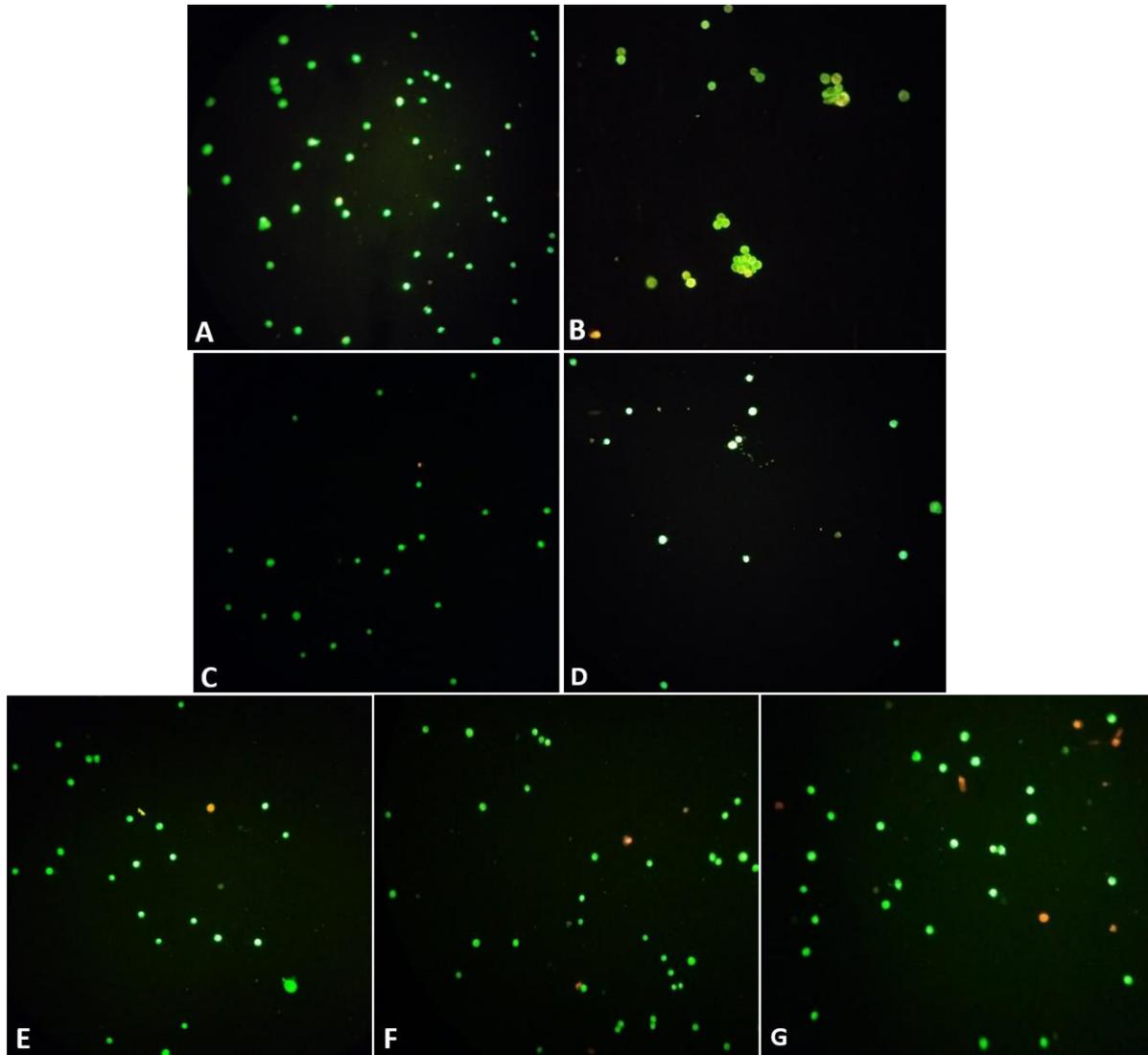
Figura 13 - Efeito de DFA 52 e DFA 59 sobre o padrão de morte celular das células RAJI avaliado através de coloração de Laranja de acridina/Brometo de etídio. Os dados estão apresentados como os valores da média  $\pm$  E.P.M., obtidos por pelo menos três experimentos realizados em triplicata.



	Dox ( $\mu$ M)		DFA52 ( $\mu$ M)		DFA59 ( $\mu$ M)		
	CN	1,0	6,4	12,8	4,6	9,2	18,4
<b>Células vivas (%)</b>	97,30	81,63	89,22	76,30	90,67	90,22	82,61
<b>EPM</b>	0,62	3,09	1,31	1,76	0,75	0,91	4,23
<b>Células em Apoptose (%)</b>	0,44	14,96	7,19	17,93	5,33	2,89	13,17
<b>EPM</b>	0,08	2,73	1,24	1,76	0,17	0,44	4,34
<b>Células em necrose (%)</b>	2,26	3,41	3,59	5,77	3,44	6,89	4,22
<b>EPM</b>	0,62	0,41	0,57	1,07	0,94	1,17	0,83

Legenda: CN (Controle Negativo); EPM (Erro Padrão da Média); \* ( $p < 0,05$  com relação ao CN); a ( $p < 0,05$  com relação a Dox); b ( $p < 0,05$  com relação a 6,4  $\mu$ M); c ( $p < 0,05$  com relação a 12,8  $\mu$ M); d ( $p < 0,05$  com relação a 4,6  $\mu$ M); e ( $p < 0,05$  com relação ao 9,2  $\mu$ M).

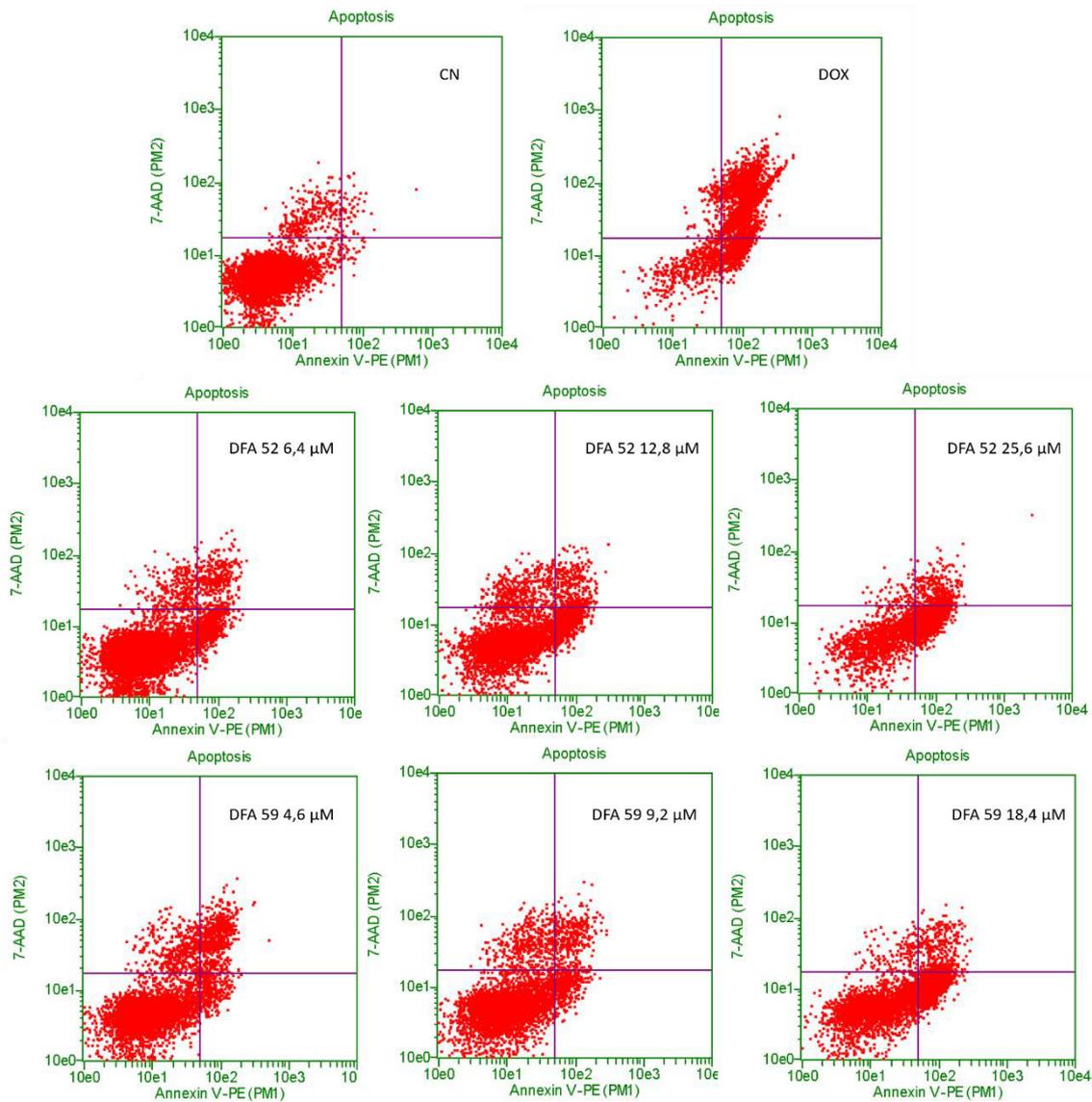
Figura 14 - Padrão de morte celular induzido por DFA 52 e DFA 59 pela coloração de Laranja de acridina/Brometo de etídio. Células visualizadas por microscopia óptica. A e B - controle negativo e doxorrubicina, respectivamente; C e D - células tratadas com DFA 52 nas concentrações de 6,4 e 12,8  $\mu\text{M}$ , respectivamente; E, F e G - células tratadas com DFA 59 nas concentrações de 4,6; 9,2 e 18,4  $\mu\text{M}$ , respectivamente.



Coloração verde: células vivas; coloração laranja: células em apoptose; coloração vermelha: células em necrose.

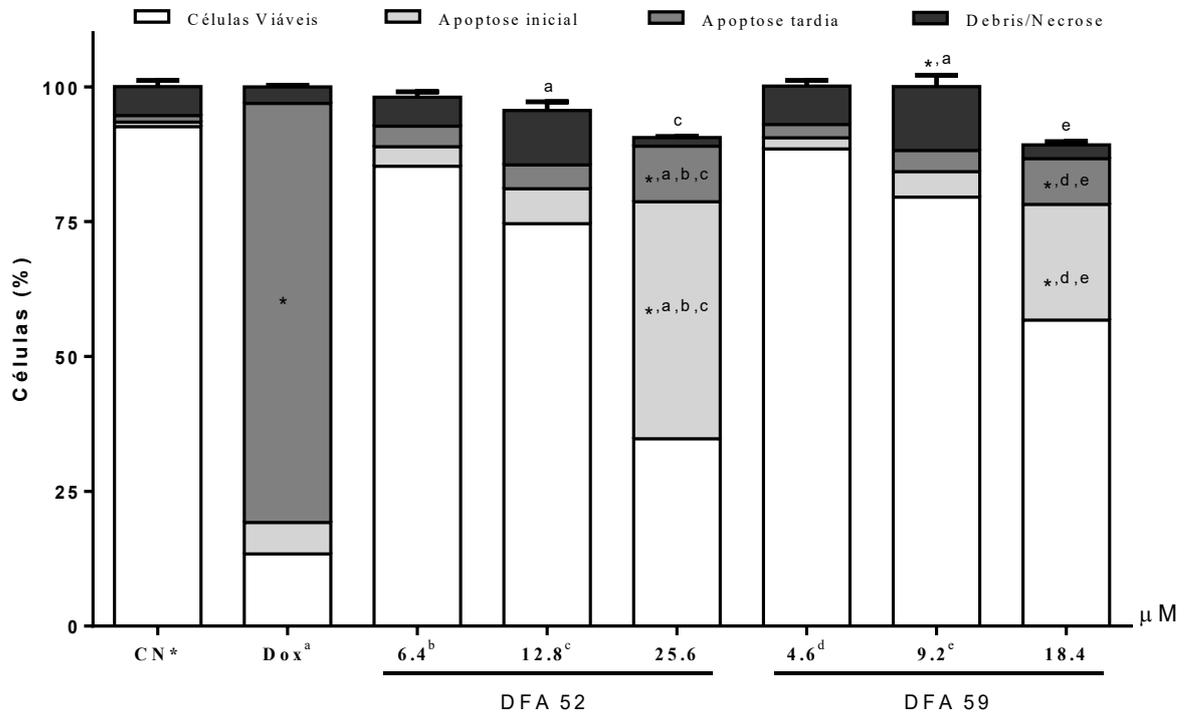
A fim de confirmar o envolvimento de morte celular por apoptose no mecanismo de ação das acilamidoximas, a externalização da fosfatidilserina foi avaliada por citometria de fluxo após 48 horas de tratamento. Os resultados foram analisados e, como observado nas Figuras 15 e 16, a molécula DFA 52 induziu apoptose inicial em 43,94% das células e apoptose tardia em 10,34% das células, na concentração de 25,6  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$ ). A molécula DFA 59 induziu necrose em 11,84% das células na concentração de 9,2  $\mu\text{M}$ , enquanto a concentração de 18,4  $\mu\text{M}$  induziu apoptose inicial em 21,45% das células e apoptose tardia em 8,53% das células ( $p < 0,005$ ). A doxorubicina induziu apoptose tardia em 77,68% das células tratadas ( $p < 0,005$ ).

Figura 15 - Efeito de DFA 52 e DFA 59 sobre a externalização da fosfatidilserina das células RAJI, avaliado por citometria de fluxo. Gráficos *dot plot* representativos da análise de Anexina V.



Nota: Quadrante inferior esquerdo: células viáveis; quadrante inferior direito: apoptose inicial; quadrante superior direito: apoptose tardia; quadrante superior esquerdo: debris/necrose.

Figura 16 - Efeito de DFA 52 e DFA 59 sobre a externalização da fosfatidilserina das células RAJI, avaliado por citometria de fluxo. Os dados estão apresentados como os valores da média  $\pm$  E.P.M., obtidos por pelo menos três experimentos realizados em triplicata.



	Dox ( $\mu$ M)		DFA52 ( $\mu$ M)			DFA59 ( $\mu$ M)		
	CN	1,0	6,4	12,8	25,6	4,6	9,2	18,4
<b>Células viáveis (%)</b>	92,58	13,37	85,24	74,61	34,72	88,46	79,54	56,71
<b>EPM</b>	0,9405	0,576	1,383	2,744	3,788	1,506	1,443	1,513
<b>Apoptose inicial (%)</b>	0,8818	5,85	3,629	6,489	43,94	2,063	4,713	21,45
<b>EPM</b>	0,2026	0,2693	0,7702	1,056	5,666	0,2921	0,8516	4,145
<b>Apoptose tardia(%)</b>	1,182	77,68	3,814	4,422	10,34	2,488	3,925	8,525
<b>EPM</b>	0,1678	0,5217	0,5974	0,7057	1,085	0,4051	0,6466	0,743
<b>Debris/Necrose (%)</b>	5,382	3,1	5,386	10,08	1,57	7,1	11,84	2,525
<b>EPM</b>	1,14	0,2828	1,012	1,608	0,2082	1,073	2,116	0,6402

Legenda: CN (Controle Negativo); EPM (Erro Padrão da Média); \* ( $p < 0,05$  com relação ao CN); a ( $p < 0,05$  com relação a Dox); b ( $p < 0,05$  com relação a 6,4  $\mu$ M); c ( $p < 0,05$  com relação a 12,8  $\mu$ M); d ( $p < 0,05$  com relação a 4,6  $\mu$ M); e ( $p < 0,05$  com relação ao 9,2  $\mu$ M).

## 5 DISCUSSÃO

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo, com altas taxas de incidência e letalidade. O linfoma de Burkitt é um câncer agressivo e de rápida evolução, sendo o tumor humano de mais rápido crescimento. Atualmente, a maioria dos tratamentos contra o câncer envolve quimioterapia, radioterapia e cirurgia, mas a quimioterapia continua sendo a abordagem mais prevalente para o tratamento do câncer. Nas últimas décadas, o número de pacientes recebendo quimioterapia aumentou consideravelmente. Ao longo dos anos, várias drogas anticâncer foram desenvolvidas com excelente citotoxicidade. Entretanto, devido às limitações associadas à quimioterapia padrão, incluindo efeitos colaterais, alta toxicidade, biodisponibilidade reduzida e resistência tumoral adquirida, há uma necessidade urgente de se descobrir novos agentes com perfis terapêuticos mais eficazes, seguros e seletivos, capazes de destruir as células tumorais ou limitar a sua proliferação (NUSSBAUMER *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2018).

Os oxadiazóis são compostos heterocíclicos de cinco membros que contêm dois átomos de nitrogênio e um átomo de oxigênio em sua estrutura, podendo se apresentar em várias formas isoméricas. Os sistemas heterocíclicos desempenham um papel importante na descoberta de novas substâncias bioativas, uma vez que estão presentes em vários compostos bioativos naturais. O anel de oxadiazol é normalmente usado como uma parte fundamental do grupo farmacofórico, que tem a capacidade de se ligar ao alvo (CANESCHI *et al.*, 2019).

Os 1,2,4-oxadiazóis são muito relevantes para a indústria farmacêutica e são encontrados em muitas moléculas com atividade biológica significativa, especialmente antitumoral. O anel 1,2,4-oxadiazol afeta as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas dos compostos em que está presente, pois é um bioisómero de amidas e ésteres para diversos alvos biológicos e tem a capacidade de melhorar a biodisponibilidade dos compostos que o carregam. As amidoximas são compostos muito importantes na síntese de diversos heterociclos, mas também possuem várias atividades biológicas, incluindo a antineoplásica (FREITAS FILHO *et al.*, 2015; GLOMB; SZYMANKIEWICZ; SWIATEK, 2018; CASCIOFERRO *et al.*, 2019).

Diante deste cenário, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antiproliferativo *in vitro* de 1,2,4-oxadiazóis e seus intermediários de síntese, O-acilamidoximas, em diversas linhagens tumorais e uma não tumoral, assim como determinar o possível mecanismo de ação citotóxico em células RAJI.

Os resultados mostraram que as seis moléculas da classe das acilamidoximas possuem atividade citotóxica contra linhagens tumorais hematológicas, com taxa de inibição maior que 75% após 72 horas de tratamento. Cinco compostos (DFA 52, 56, 59, 61 e 62) mostraram atividade para HL-60 e RAJI; um composto (DFA 58) mostrou atividade apenas para RAJI. Diante desses resultados, as  $CI_{50}$  foram calculadas para três linhagens tumorais hematológicas e uma linhagem murina não tumoral. Os valores de  $CI_{50}$  variaram entre 6,87 e 19,50  $\mu\text{M}$ , para as linhagens RAJI e K-562, respectivamente. As moléculas DFA 52 e DFA 59 mostraram os menores valores de  $CI_{50}$  em células RAJI (6,87 e 8,15  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente), mostrando uma maior seletividade para essa linhagem em relação à linhagem não tumoral L-929. Os compostos foram avaliados em RAJI em diferentes tempos de tratamento. Após 48 horas, a  $CI_{50}$  de DFA 52 e DFA 59 foi de 12,86 e 9,22  $\mu\text{M}$ , respectivamente, mostrando que esses compostos suprimiram o crescimento celular de forma dependente de tempo.

Estes resultados podem estar relacionados com a estrutura das moléculas, já que as acilamidoximas possuem mais possibilidades de ligação, levando a uma melhoria na atividade citotóxica desses compostos. Kovács e colaboradores (2013) mostraram que os derivados de acilamidoxima exerceram atividade antiproliferativa consistentemente mais elevada que a dos oxadiazóis, com valores de  $CI_{50}$  chegando a 0,22  $\mu\text{M}$  na linhagem A-2780 de câncer de ovário. A cadeia mais aberta desses compostos tem um impacto positivo na ação citotóxica. Nagahara e Nagahara (2014) observaram que derivados de amidoximas inibiram o crescimento de células leucêmicas em linhagens Jurkat e HL-60 como consequência de um atraso no ciclo e indução da morte celular (KÓVACS *et al.*, 2013; NAGAHARA; NAGAHARA, 2014).

Gonda e colaboradores (2018) sintetizaram 1,2,4- e 1,3,4-oxadiazóis e testaram a atividade antitumoral desses compostos e de seus intermediários de síntese e observaram que as acilamidoximas exibiram uma notável capacidade de inibição do crescimento, com valores de  $CI_{50}$  inferiores aos do agente de referência, a cisplatina, variando entre 1,44 - 2,05  $\mu\text{M}$  na linhagem A-2780. Abdelhameid (2018) encontrou valores de  $CI_{50}$  dos intermediários de síntese de 1,2,4-oxadiazóis inferiores a 5  $\mu\text{M}$  em linhagem de câncer de mama MCF-7 e associou a vantagens que essas moléculas apresentam, como maiores probabilidades de realizarem ligações de hidrogênio e menores limitações de rotação (GONDA *et al.*, 2018; ABDELHAMEID, 2018).

Diante dos resultados promissores das moléculas DFA 52 e DFA 59 em RAJI, estudos posteriores foram realizados com a finalidade de investigar o possível mecanismo de indução de morte celular.

A análise da morfologia celular mostrou que após o tratamento com DFA 52 e DFA 59 o número de células reduziu com o aumento da concentração testada, comprovando a sua atividade citotóxica. As alterações mais comuns foram os prolongamentos na membrana plasmática e a redução de volume celular. Isto sugere que o composto pode causar algum tipo de estresse sobre as células, induzindo, desta forma, um processo de morte celular. A execução da apoptose é caracterizada por mudanças marcantes na morfologia celular, como a ativação de proteases endógenas resultando em ruptura do citoesqueleto, contração celular, desenvolvimento de vesículas de membrana (blebs) na sua superfície e fragmentação do DNA. A fase inicial da apoptose é marcada pela formação das bolhas na membrana, o que garante a manutenção da sua integridade e mantém o conteúdo celular no compartimento interno. Em ensaios *in vitro*, geralmente as células apoptóticas precoces se tornam células apoptóticas tardias, também conhecidas como células necróticas secundárias, quando a membrana plasmática torna-se permeabilizada, adquirindo um aspecto morfológico característico de necrose (THOMPSON, 1995; COLEMAN *et al.*, 2001; POON *et al.*, 2009; GALLUZZI *et al.*, 2018).

O ensaio de citometria de fluxo que avaliou a densidade de células mostrou que após o tratamento com DFA 52 e DFA 59 por 48 horas houve redução significativa do número de células, proporcionalmente ao aumento da concentração, quando comparadas ao controle negativo, confirmando a ação antiproliferativa dos compostos nas células RAJI. O estudo da integridade de membrana também foi feito por citometria de fluxo e mostrou que os compostos reduziram o número de células viáveis de forma concentração-dependente, resultado que confirma a ação citotóxica das moléculas.

A proliferação é uma parte importante do desenvolvimento e progressão do câncer. Muitos medicamentos utilizados na quimioterapia do câncer buscam pelo menos limitar a proliferação das células tumorais e agem de maneira tempo e/ou concentração-dependente. Fármacos que atuam dessa maneira atingem as células tumorais em fases mais vulneráveis do ciclo celular, e a fração de células tumorais mortas depende, principalmente, do tempo de exposição (GARDNER, 2000; NUSSBAUMER *et al.*, 2011).

A célula cancerosa incorpora características que permitem a sobrevivência além de sua expectativa de vida normal e a proliferação anormal. A terapia de câncer, envolvendo drogas citotóxicas, mata células que têm um alto nível basal de proliferação e regeneração. A falta de controle normal do crescimento não é importante apenas na fase precoce da tumorigênese, mas também durante a metástase do tumor (FEITELSON *et al.*, 2015).

O ciclo celular é uma sequência de eventos que permite o crescimento e a replicação das células, sendo o mecanismo que governa o destino das células, interpreta os sinais de crescimento recebidos e decide se a célula deve ou não continuar a sua proliferação. A progressão adequada através do ciclo celular é controlada pelos pontos de checagem (*checkpoints*) que detectam possíveis defeitos durante a síntese de DNA e a segregação cromossômica. A ativação desses *checkpoints* induz parada do ciclo celular através de modulação da atividade de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) (BARTEK; LUKAS C.; LUKAS J., 2004).

A desregulação no controle do ciclo celular é um aspecto fundamental no desenvolvimento do câncer. As células normais apenas proliferam em resposta ao desenvolvimento da célula ou a sinais presentes na mitose que indicam um requisito para o crescimento do tecido, enquanto que a proliferação das células cancerosas procede essencialmente sem controle. Isto indica que as células cancerosas proliferam devido a presença de defeitos de sinalização internos e/ou externos. Muitos fármacos utilizados no tratamento do câncer agem inibindo a progressão do ciclo celular, e como consequência inibem a proliferação das células neoplásicas. Diferentes tratamentos que induzem apoptose podem ser ciclo-específicos ou não, mas todos podem de alguma forma influenciar este processo (ORMEROD, 2002; FOSTER, 2008; INGHAM; SCHWARTZ, 2017).

Em nosso estudo, observamos que as células tratadas com DFA 52 na concentração de 6,4  $\mu\text{M}$  apresentaram uma redução de células na fase G0/G1, quando comparadas ao controle negativo. O tratamento com as doses mais altas (12,8 e 25,6  $\mu\text{M}$ ) provocou aumento de células em G0/G1 e diminuição de células na fase S, de forma significativa, o que indica que a inibição do crescimento celular parece ser mediada por atenuação de progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S e que esse efeito depende da dose. As células tratadas com DFA 59 na menor concentração (4,6  $\mu\text{M}$ ) não mostraram alterações no perfil do ciclo celular, quando comparadas ao controle. A concentração de 9,2  $\mu\text{M}$  provocou uma redução de células na fase G0/G1 e as células tratadas com 18,4  $\mu\text{M}$  mostraram alterações nas três fases do ciclo, com destaque para a maior concentração de células na fase G0/G1 e redução de células na fase S.

Nas fases G1 e S existem diversos mecanismos reguladores que irão afetar a proliferação celular, como os fatores de crescimento, que ativam a multiplicação celular, e os mecanismos de controle, que são inibidores da multiplicação celular. O primeiro ponto de controle do ciclo celular ocorre entre essas fases e monitora a integridade do DNA antes da sua replicação, sendo marcado pela fosforilação da proteína retinoblastoma. Acredita-se que os

compostos estudados podem ativar esse ponto de controle e impedir a passagem das células para a fase S, provocando o aprisionamento das células na fase G1 (FOSTER, 2008).

Embora as mudanças na distribuição das células dentro das fases do ciclo celular não possam fornecer informações sobre o mecanismo de atividade de drogas, estes resultados sugerem que os compostos podem afetar a maquinaria celular, interferindo na duplicação de DNA. Estudos recentes mostram que 1,2,4-oxadiazóis são capazes de interferir no ciclo celular de células cancerígenas, causando parada no ciclo e acúmulo de células na fase G1, afetando a duplicação do material genético. Estas observações sugerem que essas acilamidoximas podem alterar proteínas reguladoras do ciclo celular, dependendo da dose e do tempo de administração deste composto (ANAZETTI *et al.*, 2003; CASCIOFERRO *et al.*, 2019).

O ciclo celular é coordenado por diversas moléculas que permitem a sua evolução em fases marcadas por eventos complexos, como a condensação, a replicação e a segregação dos cromossomos pelas fibras do fuso mitótico. Alguns quimioterápicos atuam como inibidores de ciclinas e CDKs, que regulam as etapas e a progressão do ciclo celular. A ciclina D e as CDK4/6 desempenham um papel fundamental no ciclo celular por fosforilação e inativação da proteína retinoblastoma, um supressor de tumor que restringe a progressão da fase G1 para S (HARTWELL; KASTAN, 1994; INGHAM; SCHWARTZ, 2017).

No câncer, há uma perda de equilíbrio entre a divisão celular e morte celular. Um mecanismo regulador importante na progressão neoplásica é a apoptose, que provoca a morte celular em detrimento da possibilidade da célula tornar-se potencialmente maligna, podendo levar ao surgimento de um tumor. Na prática clínica, a apoptose é alvo para um potencial uso terapêutico, sendo a compreensão dos mecanismos e das alterações nos componentes das vias apoptóticas, e sua correlação com a ocorrência do câncer, ferramentas importantes para o desenvolvimento de novas terapias e métodos de prevenção do câncer (FULDA *et al.*, 2015).

A resistência à apoptose é uma marca importante do processo neoplásico. Existem muitos caminhos que levam uma célula maligna a reduzir ou resistir ao processo de apoptose. Os mecanismos que levam à evasão da apoptose são: perda de equilíbrio entre proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, redução na função das caspases e sinalização do receptor de morte prejudicada (WONG, 2011).

Como forma de analisar se os compostos provocam apoptose, foram realizados estudos de despolarização da mitocôndria pelo ensaio da Rodamina 123. As moléculas DFA 52 e DFA 59 foram capazes de despolarizar as membranas da mitocôndria apenas nas maiores doses, indicando que elas podem estar envolvidas na apoptose pela via intrínseca. A via apoptótica dependente da mitocôndria é mediada por sinais intracelulares que convergem no

nível mitocondrial em resposta a diferentes condições de estresse, como os agentes quimioterápicos. Independentemente dos estímulos, esta via é o resultado do aumento da permeabilidade mitocondrial e a liberação de moléculas pró-apoptóticas, como o citocromo-c, no citoplasma. Este mecanismo é estritamente regulado por um grupo de proteínas pertencentes à família Bcl-2 (PISTRITTO *et al.*, 2016; MISHRA *et al.*, 2018).

A coloração de Brometo de Etídio/Laranja de Acridina mostrou que DFA 52 e DFA 59 são capazes de induzir apoptose nas maiores concentrações de tratamento. Esse ensaio também mostrou as alterações morfológicas induzidas pelos compostos, como formação de prolongamentos na membrana plasmática e redução de volume celular, características que também estão relacionadas ao processo de apoptose.

Um dos principais processos que ocorrem na apoptose é a perda da assimetria da membrana fosfolipídica com a translocação da fosfatidilserina da membrana interna da bicamada lipídica para superfície celular. No processo fisiológico, a externalização da fosfatidilserina permite o rápido reconhecimento das células apoptóticas pelos macrófagos e demais células circundantes, marcando-as para fagocitose, antes da perda da integridade da membrana celular. O ensaio de Anexina V é um procedimento que monitora a progressão da apoptose. Em nossos resultados do experimento da Anexina V encontramos que DFA 52 e DFA 59 são capazes de induzir apoptose nas células RAJI nas maiores concentrações testadas, confirmando o que foi encontrado no teste da rodamina (VERMES *et al.*, 1995; ZIMMERMANN; BONZON; GREEN, 2001; LEE; LIU; YEUNG; 2009).

A ciclofosfamida e a bendamustina são agentes antitumorais usados clinicamente para tratar linfomas não-Hodgkin de células B de alto grau. A ciclofosfamida é inativa quando testada *in vitro* em culturas de linfócitos humanos ou em células neoplásicas humanas. No entanto, quando convertida à sua forma ativa pelas enzimas microssomais do fígado interfere *in vivo* com o crescimento de neoplasias suscetíveis. Após a ativação pelas enzimas hepáticas aos metabólitos citotóxicos, mostarda fosforamida e acroleína, forma ligações cruzadas com o DNA das células tumorais, levando a célula à morte. A bendamustina possui em sua estrutura um anel benzimidazol do tipo purina e seu efeito antineoplásico é baseado, essencialmente, em uma ligação cruzada com as fitas do DNA por meio de alquilação (CHESON; LEONI, 2011; VEAL *et al.*, 2016).

Estruturalmente, o sistema de ciclos presente nas moléculas avaliadas é importante na interação com os pares de bases do DNA. Eles tem uma capacidade de configuração capaz de atuar como aceitadores de ligação de hidrogênio, formando porções que facilitam a ligação de moléculas com sítios de ligação de DNA e enzimas, como a topoisomerase. A proteína p53

induz a apoptose nas células cancerígenas e é expressa como efeito secundário ao dano no DNA, além de desempenhar um papel vital na determinação dos níveis das proteínas reguladoras da apoptose Bax e Bcl-2 (BOSTRÖM *et al.*, 2011; ABDELHAMEID, 2018).

Em suma, nossos resultados demonstram que os compostos da classe das acilamidoximas, DFA 52 e DFA 59, foram eficazes na indução de morte celular nas células da linhagem RAJI. Os achados são promissores e podem indicar caminhos na pesquisa de novas opções terapêuticas para o linfoma de Burkitt, condição que continua sendo um grande desafio clínico, devido à sua heterogeneidade e alta toxicidade da terapia padrão utilizada.

## 6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, as moléculas sintéticas da classe das acilamidoximas, intermediárias de síntese dos 1,2,4-oxadiazóis, apresentaram potente atividade anticâncer *in vitro* em duas linhagens de células tumorais hematológicas e foram capazes de induzir apoptose seletivamente em células neoplásicas, sem dano significativo a células não tumorais. Em células de Linfoma de Burkitt (RAJI), DFA 52 e DFA 59 inibiram a proliferação celular de maneira tempo dependente, provocaram redução considerável na viabilidade celular e inibiram a progressão do ciclo celular, aumentando o número de células em G0/G1 e diminuindo o percentual de células que estão sintetizando o DNA. Nos ensaios de investigação do mecanismo de morte celular, observamos que esses compostos induzem apoptose nas células tratadas.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho implica estudos mais aprofundados para uma melhor compreensão do mecanismo de ação de nossos compostos sintéticos, principalmente as *O*-acilamidoximas. Experimentos de microscopia confocal, proteômica, análise de marcadores específicos de vias de morte celular por western-blot e estudos de bioinformática com análises da relação estrutural-atividade destes compostos e seus alvos biológicos podem ser úteis para esse objetivo.

## REFERÊNCIAS

- ABDELHAMEID, M.K. Design, Synthesis, and Screening of 5-Aryl-3-(2-(pyrrolyl) thiophenyl) -1, 2,4-oxadiazoles As Potential Antitumor Molecules on Breast Cancer MCF-7 Cell Line. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 66, n. 12, p. 1181-1195, 2018.
- AGUIAR, D.F.; DUTRA, L.L.A.; DANTAS, W.M.; DE CARVALHO, G.G.C.; LEMES, R.P.G.; PESSOA, C.; PAIER, C.R.K.; ARAÚJO, P.L.B.; ARAÚJO, E.S.; PENA, L.J., DE OLIVEIRA, R.N. Synthesis, Antitumor and Cytotoxic Activity of New Adamantyl O-Acylamidoximes and 3-Aryl-5-Adamantane-1,2,4-Oxadiazole Derivatives. **ChemistrySelect**. v. 4, n. 31, p. 9112 –9118, 2019.
- ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**. v. 188, p. 261-274, 2003.
- BAHUGUNA, A.; KHAN, I.; BAJPAI, V. K.; KANG, S. C. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. **Bangladesh J. Pharmacol.**, v. 12, p. 115-118, 2017.
- BARTEK, J.; LUKAS, C.; LUKAS, J. Checking on DNA damage in S phase. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 5, n. 10, p. 792-804, 2004.
- BOSTRÖM, J.; HOGNER, A.; LLINÀS, A.; WELLNER, E.; PLOWRIGHT, A.T. Oxadiazoles in Medicinal Chemistry. **J. Med. Chem.**, v. 55, n. 5, p. 1817-1830, 2012.
- CANESCHI, W.; ENES, K. B.; MENDONÇA, C. C. *et al.* Synthesis and anticancer evaluation of new lipophilic 1,2,4 and 1,3,4-oxadiazoles. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 165, p. 18-30, 2019.
- CARBONE, M.; LI, Y.; IRACE, C.; MOLLO, E.; CASTELLUCCIO, F.; PASCALE, A.; CIMINO, G.; SANTAMARIA, R.; GUO, Y.; GAVAGNIN, M. Structure and Cytotoxicity of Phidianidines A and B: First Finding of 1,2,4-Oxadiazole System in a Marine Natural Product. **Org. Lett.**, v. 13, n. 10, p. 2516–2519, 2011.
- CASCIOFERRO, S.; ATTANZIO, A.; DI SARNO, V.; MUSELLA, S.; TESORIERE, L.; CIRRINCIONE, G.; DIANA, P.; PARRINO, B. New 1,2,4 Oxadiazole Nortopsentin Derivatives with Cytotoxic Activity. **Mar. Drugs.**, v. 17, n. 1, 35, 2019.
- CASULO, C.; FRIEDBERG, J. W.; AHN, K. W., et al. Autologous Transplantation in Follicular Lymphoma with Early Therapy Failure: A National LymphoCare Study and Center for International Blood and Marrow Transplant Research Analysis. **Biol. Blood Marrow Transplant.**, v. 24, n. 6, p. 1163-1171, 2018.
- CHESON, B. D.; LEONI, L. Bendamustine: mechanism of action and clinical data. **Clin. Adv. Hematol. Oncol.**, v. 8, n. 19, p. 1-11, 2011.
- CHIU, B. C.; WEISENBURGER, D. D. An update of the epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. **Clin. Lymphoma.**, v. 4, n. 3, 161-168, 2003.

CLAPP, L. B. 1, 2, 4-Oxadiazoles. **Adv. Heterocycl. Chem.**, v. 20, p. 65-116, 1976.

COLEMAN, M. L.; SAHAI, E. A.; YEO, M.; BOSCH, M.; OLSON, M. F. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. **Nat. Cell Biol.**, v. 3, p. 339-345, 2001.

COLLINS, K.; JACKS, T.; PAVLETICH, N. P. The cell cycle and cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, n. 7, p. 2776-2778, 1997.

CUNHA, F. S.; DE AGUIAR, A. P. Síntese e Bioatividade de 1,2,4-Oxadiazóis. **Rev. Virtual Quim.**, v.7, n. 6, p. 2509-2530, 2015.

CURY-BOAVENTURA, M. F.; GORJÃO, R.; DE LIMA, T. M.; NEWSHOLME, P.; CURI, R. Comparative toxicity of oleic and linoleic acid on human lymphocytes. **Life Sci.**, v. 78, n. 13, p. 1448-56, 2006.

CURY-BOAVENTURA, M.F.; POMPÉIA, C.; CURI, R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells. **Clinical nutrition.**, v. 23, n. 4, p. 721-732, 2004.

DARZYNKIEWICZ, Z.; BRUNO, S.; DEL BINO, G.; GORCZYCA, W.; HOTZ, M.A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry.** v. 13, n. 8, p. 795-808, 1992.

DE ALMEIDA, V. L.; LEITAO, A.; REINA, L. C. B.; MONTARI, C. A.; DONNICI C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova.**, v. 28, p. 118-129, 2005.

DE OLIVEIRA, V. N. M.; SANTOS, F. G.; FERREIRA, V. P. G.; ARAÚJO, H. M.; PESSOA, C.; NICOLETE, R.; DE OLIVEIRA, R. N. Focused microwave irradiation-assisted synthesis of N-cyclohexyl-1,2,4-oxadiazole derivatives with antitumor activity. **Synth. Commun.**, v. 48, n. 19, p. 2522–2532, 2018.

DILLON; C.P.; GREEN; D.R. Molecular Cell Biology of Apoptosis and Necroptosis in Cancer. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 930, p. 1-23, 2016.

FARIA, M.H.G.; RABENHORST, S.H.B. Impacto do oncogene C-MYC no câncer. **Rev. Bras. Canceriol.**, v.52, p.165-171, 2006.

FEITELSON, M. A.; ARZUMANYANA, A.; KULATHINALA, R. J., *et al.* Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. **Semin. Cancer Biol.**, v. 35, p. 25-54, 2015.

FOSTER, I. Cancer: a cell cycle defect. **Radiography.** v.14, n. 2, p. 144-149, 2008.

FREITAS FILHO, J.R.; DA SILVA, R.L.; DA SILVA E.E.; SANTOS, J.A.M.; DE FREITAS, J.J.R.; FREITAS, J.C.R. Amidoximas: Aplicações e Principais Estratégias Sintéticas. **Rev. Virtual Quim.**, v. 7, n. 6, p. 2549-2596, 2015.

FREITAS, J.J.R.; SILVA, E.E.; REGUEIRA, J.L.L. F.; DE ANDRADE, S.A.; CALVALCANTE, P.M. M.; OLIVEIRA, R.N.; FREITAS FILHO, J.R. 1,2,4 Oxadiazóis: Síntese e aplicações. **Ver. Virtual Quim.**, v. 4, n. 6, p. 670-691, 2012.

FULDA, S. Targeting apoptosis for anticancer therapy. **Semin. Cancer Biol.**, v.31, p. 84-88, 2015.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; AARONSON, S. A., *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death Differ.**, v. 25, n. 4, p. 486-541, 2018.

GARDNER, S.N. A mechanistic, predictive model of dose-response curves for cell cycle phase-specific and -nonspecific drugs. **Cancer Res.**, v. 60, n. 5, p. 1417-1425, 2000.

GERARD, E. J.; BISHOP, M. R. Overview of Non-Hodgkin's Lymphoma. **Dis. Mon.**, v. 58, p. 208-218, 2012.

GIANCOTTI, F. G. Deregulation of cell signaling in cancer. **FEBS Lett.**, v. 588, n.16, p. 2558-2570, 2014.

GLOMB, T.; SZYMANKIEWICZ, K.; SWIATEK, P. Anti-Cancer Activity of Derivatives of 1,3,4-Oxadiazole. **Molecules.** v. 23, 3361, 2018.

GONDA, T.; BÉRDI, P.; ZUPKÓ, I.; FÜLÖP, F.; SZAKONYI, Z. Stereoselective Synthesis, Synthetic and Pharmacological Application of Monoterpene-Based 1,2,4- and 1,3,4-Oxadiazoles. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, 81, 2018.

GUPTA, R. R.; KUMAR, M.; GUPTA, V. **Heterocyclic Chemistry: Five membered Heterocycles.** 1 ed. India. Springer, 2005.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell.** v.144, 2011.

HARTWELL, L. H.; KASTAN, M. B. Cell cycle control and cancer. **Science.** v. 266, p. 1821-1828, 1994.

HASSANPOUR, S. H.; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **J. Cancer Res. Pract.**, v. 4, n. 4, p. 127-129, 2017.

HECHT, J. L.; ASTER, J. C. Molecular Biology of Burkitt's Lymphoma. **J. Clin. Oncol.**, v. 18, p. 3707-3721, 2000.

HEMMING, K.; KHAN, M. N.; O'GORMAN, P. A.; PITARD, A. 1,2,4-Oxadiazoles from cycloreversions of oxadiazabicyclo [3.2.0] heptenes: 1-azetines as thiocyanate equivalents. **Tetrahedron.** v. 69, n. 4, p. 1279-1284, 2013.

HENNESSY, B. T.; HANRAHAN, E. O.; DALY, P. A. Non-Hodgkin lymphoma: an update. **The Lancet Oncology.** v. 5, p. 341-353, 2004.

HUANG, X.; SHEN, Q.; ZHANG, H.; LI, J.; TIAN, Y.; QUAN, Z. Design and Synthesis of Novel Dehydroepiandrosterone Analogues as Potent Antiproliferative Agents. **Molecules.** v. 23, 2243, 2018.

INGHAM, M.; SCHWARTZ, G. K. Cell-Cycle Therapeutics Come of Age. **J. Clin. Oncol.**, v. 35, n. 25, p. 2949-2959, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 02/06/2019.

JIANG, M.; BENNANI, N.N.; FELDMAN, A.L. Lymphoma classification update: B-cell non-Hodgkin lymphomas. **Expert Rev. Hematol.**, v. 10, n. 5, p. 405-415, 2017.

JOLE, J.A.; MILLS, K. **Heterocyclic Chemistry**. 4 ed. Blackwell, 2004.

KALISZ, K.; ALESSANDRINO, F.; BECK, R.; SMITH, D.; KIKANO, E.; RAMAIYA, N. H.; TIRUMANI, S. H. An update on Burkitt lymphoma: a review of pathogenesis and multimodality imaging assessment of disease presentation, treatment response, and recurrence. **Insights Imaging**. v. 10, n. 1 (56), 2019.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**. v. 432, n. 7015, p. 316-323, 2004.

KAYUKOVA, L. A. Synthesis of 1,2,4-oxadiazoles (a review). **Pharm. Chem. J.**, v. 39, n. 10, p. 539–547, 2005.

KELLY, G. L.; RICKINSON, A. B. Burkitt lymphoma: revisiting the pathogenesis of a virus-associated malignancy. **Hematology**. p. 277-84, 2007.

KEMNITZER, W.; KUEMMERLE, J.; JIANG, S.; ZHANG, H.; SIRISOMA, N.; KASIBHATLA, S.; CROGAN-GRUNDY, C.; TSENG, B.; DREWE, J.; XIONG, S. Discovery of 1-benzoyl-3-cyanopyrrolo[1,2-a] quinolines as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high-throughput screening assay. Part 1: Structure–activity relationships of the 1- and 3-positions. **Mol. Cancer Ther.**, v. 4, p. 761–771, 2008.

KEPP, O.; GALLUZZI, L.; LIPINSKI, M.; YUAN, J.; KROEMER, G. Cell death assays for drug Discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 10, n. 3, p. 221-37, 2011.

KLUMB, C. E. Biologia e patogênese dos linfomas não Hodgkin de origem B na infância: Uma Revisão. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 47, n. 3, p. 291-301, 2001.

KOVÁCS, D.; WÖLFLING, J.; SZABÓ, N.; SZÉCSI, M.; KOVÁCS, I.; ZUPKÓ, I.; FRANK, E. An efficient approach to novel 17-5'-(1',2',4')-oxadiazolyl androstenes via the cyclodehydration of cytotoxic O-steroidacylamidoximes, and an evaluation of their inhibitory action on 17 $\alpha$ -hydroxylase/C17,20-lyase. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 70, p. 649-60, 2013.

KUMAR, D.; PATEL, G.; CHAVERS, A.K.; CHANG, K.H.; SHAH, K. Synthesis of novel 1,2,4-oxadiazoles and analogues as potential anticancer agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 46, n. 7, p. 3085-3092, 2011.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins patologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2013.

- LEE, W.Y.; LIU, K.W.; YEUNG, J.H. Reactive oxygen species-mediated kinase activation by dihydrotanshinone in tanshinones-induced apoptosis in HepG2 cells. **Cancer Lett.**, v. 285, n. 1, p. 46-57, 2009.
- LIN, L.; BAEHRECKE, E. H. Autophagy, cell death, and cancer. **Mol. Cell Oncol.**, v. 2, n. 3, 2015.
- LOUIS, M. *et al.* Antibody-based immunotherapy of cancer: new insights, new targets. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1081-1084, 2012.
- LOURO, I. D. *et al.* **Genética molecular do câncer**. 1 ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.
- LUO, J.; SOLIMINI, N.; ELLEDGE, S.J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **Cell**. v. 6, p. 823-837, 2009.
- MA, X.; WANG, Z. Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. **Drug Discov. Today.**, v. 14, p. 1136-1142, 2009.
- MISHRA, A.P; SALEHI, B.; SHARIFI-RAD, M.; PEZZANI, R.; KOBARFARD, F.; SHARIFI-RAD, J.; NIGAM, M. Programmed Cell Death, from a Cancer Perspective: An Overview. **Mol. Diagn. Ther.**, v. 22, n. 3, p. 281-295, 2018.
- MOLYNEUX, E.M.; ROCHFORD, R.; GRIFFIN, B.; NEWTON, R.; JACKSON, G.; MENON, G.; HARRISON, C.J.; ISRAELS, T.; BAILEY, S. Burkitt's lymphoma. **Lancet**. 2012, 379(9822), 1234-1244.
- MONIOT, S.; FORGIONE, M.; LUCIDI, A. *et al.* Development of 1,2,4-Oxadiazoles as Potent and Selective Inhibitors of the Human Deacetylase Sirtuin 2: structure–Activity Relationship, X ray Crystal Structure, and Anticancer Activity. **J. Med. Chem.**, v. 60, p. 2344–2360, 2017.
- 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.
- MRDENOVIC, S.; ZHANG, Y.; WANG, R.; YIN, L.; CHU, G. C.; YIN, L.; LEWIS, M.; HEFFER, M.; ZHAU, H. E.; CHUNG, L. W. K. Targeting Burkitt Lymphoma With a Tumor Cell-Specific Heptamethine Carbocyanine-Cisplatin Conjugate. **Cancer**. 2019.
- MURAD, A.M.; KATZ, A. **Oncologia Bases Clínicas do Tratamento**. Rio de Janeiro, Guanabara, 1996.
- NAGAHARA, Y.; NAGAHARA, K. N-(2-Amino-5-chlorobenzoyl) benzamidoxime Derivatives Inhibit Human Leukemia Cell Growth. **Anticancer Res.**, v. 34, p. 6521-6526, 2014.
- NEVES FILHO, R. A. W.; BEZERRA, N. M. M.; GUEDES, J. M.; SRIVASTAVA, R. M. An easy synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles from carboxylic acids and arylamidoximes mediated by ethyl chloroformate. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, n. 7, p. 1365-1369, 2009.

NOGAI, H.; DORKEN, B.; LENZ, G. Pathogenesis of Non-Hodgkin's Lymphoma. **J. clin. Oncol.**, v. 29, n. 14, p. 1803-1811, 2011.

NUSSBAUMER, S.; BONNABRYA, P.; VEUTHEYB, J.; FLEURY-SOUVERAINA, S. Analysis of anticancer drugs: A review. **Talanta**. v. 85, p. 2265-2289, 2011.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 4, p. 592-603, 2004.

ORMEROD, M. G. Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. **J. Immunol. Methods**. v. 265, n. 1-2, p. 73-80, 2002.

OZOE, Y.; YAGI, K.; NAKAMURA, M.; AKAMATSU, M.; MIYAKE, T.; MATSUMURA, F. Fipronil-Related Heterocyclic Compounds: Structure–Activity Relationships for Interaction with  $\gamma$ -Aminobutyric Acid- and Voltage-Gated Ion Channels and Insecticidal Action. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 66, p. 92-104, 2000.

PACE, A.; PIERRO, P. The new era of 1,2,4-oxadiazoles. **Org. Biomol. Chem.**, v. 7, p. 4337-4348, 2009.

PINHO, M. **Biologia Molecular do Câncer: fundamentos para a prática médica**. 1 ed. Revinter, 2005.

PISTRITTO, G.; TRISCIUOGLIO, D.; CECI, C.; GARUFI, A.; D'ORAZI, G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Aging**. v. 8, n. 4, p. 603-19, 2016.

POON, I. K. H.; HULETT, M. D.; PARISH, C. R. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. **Cell Death Differ.**, v. 17, p. 381-397, 2010.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., FLOWER, R.J., HENDERSON, G. **Farmacologia**. 7<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RAVAL, J. P.; AKHAJA, T. N.; JASPARA, D. M.; MYANGAR, K. N.; PATEL, N. H. Synthesis and in vitro antibacterial activity of new oxoethylthio-1,3,4-oxadiazole derivatives. **J. Saudi Chem. Soc.**, v. 18, p. 101–106, 2014.

SÁNCHEZ-BEATO, M.; SÁNCHEZ-AGUILERA, A.; PIRIS, M. A. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. **Blood**. v. 101, n. 4, p. 1220-1235, 2003.

SESQUES, P.; JOHNSON, N. A. Approach to the diagnosis and treatment of high-grade B-cell lymphomas with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements. **Blood**. v. 129, n. 3, p. 280-288, 2017.

SHANKLAND, K.R.; ARMITAGE, J.O.; HANCOCK, B.W. Non-Hodgkin lymphoma. **Lancet**. v. 380, p. 848–857, 2012.

SHAPIRO, H.M. **Practical Flow Cytometry**. New York. 1 ed, Wiley-Liss, 1995.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. **Science**, v.267, p. 1456- 1462, 1995.

VEAL, G. J.; COLE, M.; CHINNASWAMY, G.; SLUDDEN, J.; JAMIESON, D.; ERRINGTON, J.; MALIK, G.; HILL, C. R.; CHAMBERLAIN, T.; BODDY, A. V. Cyclophosphamide pharmacokinetics and pharmacogenetics in children with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. **Eur. J. Cancer.**, v. 55, p. 56-64, 2016.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **J. Immunol. Methods.**, v. 243, p. 167-190, 2000.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J. Immunol. Methods.**, v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995.

WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v. 30, n. 1, 87, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. <https://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em: 02/06/2019.

XU, W.; PAN, Y.; WANG, H.; LI, H.; PENG, Q.; WEI, D.; CHEN, C.; ZHENG, J. Synthesis and Evaluation of New Pyrazoline Derivatives as Potential Anticancer Agents in HepG-2 Cell Line. **Molecules.** v. 22, 467, 2017.

ZHANG, H. Z.; KASIBHATLA, S.; KUEMMERLE, J.; KEMNITZER, W.; OLLIS-MASON, K.; QIU, L.; CROGAN-GRUNDY, C.; TSENG, B.; DREWE, J.; CAI, S. X. Discovery and Structure-Activity Relationship of 3-Aryl-5-aryl-1,2,4-oxadiazoles as a New Series of Apoptosis Inducers and Potential Anticancer Agents. **J. Med. Chem.**, v. 48, p. 5215-5223, 2005.

ZHANG, P.; CHEN, J. H.; DONG, X.; TANG, M. T.; GAO, L. Y.; ZHAO, G. S.; YU, L. G.; GUO, X. L. 6r, a novel oxadiazole analogue of ethacrynic acid, exhibits antitumor activity both in vitro and in vivo by induction of cell apoptosis and S-phase arrest. **Biomed. Pharmacother.**, v. 67, n. 1, p. 58-65, 2013.

ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, D. R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacol. Ther.**, v. 92, n. 1, p. 57-70, 2001.