

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

JULIA LEITE CORDEIRO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA INDUÇÃO DE APOPTOSE DE
ADUTOS DA REAÇÃO MORITA-BAYLIS-HILLMAN DERIVADOS DA ISATINA
EM CÉLULAS TUMORAIS**

**RECIFE
2021**

JÚLIA LEITE CORDEIRO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA INDUÇÃO DE APOPTOSE DE
ADUTOS DA REAÇÃO MORITA-BAYLIS-HILLMAN DERIVADOS DA ISATINA
EM CÉLULAS TUMORAIS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia como requisito parcial para o cumprimento parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia. Área de concentração: Bioquímica e Fisiologia

Orientador: Gardenia Carmen Gadelha Militão

**RECIFE
2021**

JÚLIA LEITE CORDEIRO DE SOUZA

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA INDUÇÃO DE APOPTOSE DE ADUTOS
DA REAÇÃO MORITA-BAYLIS-HILLMAN DERIVADOS DA ISATINA EM CÉLULAS
TUMORAIS

Dissertação de mestrado apresentada
como um dos requisitos para o
cumprimento parcial das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Banca Examinadora:

Dra. Gardenia Carmen Gadelha Militão
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Leucio Duarte Vieira Filho
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Daniel Pereira Bezerra
Instituto Gonçalo Muniz- FIOCRUZ, BA

Dr. Claudio Gabriel Lima-Júnior
Universidade Federal da Paraíba

Data: 27/08/2021

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Souza, Júlia Leite Cordeiro de

Avaliação da citotoxicidade e da indução de apoptose de adutos da reação Morita-Baylis-Hillman derivados da isatina em células tumorais / Júlia Leite Cordeiro de Souza - 2021.

73 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Gardenia Carmen Gadelha Militão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2021.

Inclui referências e anexo.

1. Câncer 2. Isatina 3. Citotoxicidade

I. Militão, Gardenia Carmen Gadelha (Orientadora) II. Título

614.994 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-305

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todo amor, por sempre, sempre, sempre confiarem no meu potencial e me incentivarem diariamente em todos os aspectos da vida, meu eterno obrigada!

Às minhas avós Lêda e Tereza que sempre me transmitiram além de amor e afeto, a importância da educação .

A Mário, meu grande parceiro de vida, amigo e amor, por toda compreensão, apoio e incentivos incontáveis, por ter sempre me encorajado em diversos momentos de dificuldades e frustrações. Você foi essencial para que eu chegasse até aqui.

A todos os meus amigos, especialmente a Bianca e Bruno pela relação que construímos desde o início da graduação sempre baseada em suporte, risadas e momentos leves. Ter conhecido vocês certamente fez com que eu me tornasse uma pessoa melhor

A Matheus, meu irmão caçula, por desde sempre jogar no meu time, por me motivar a ser melhor e por todos os momentos que me ajudou diretamente para que fosse possível estar aqui.

Ao Sr. Hilde por tornar todas as manhãs no Departamento em momentos mais alegres e animados.

A todos os professores colaboradores, especialmente a Michelly Pereira por todo o apoio, orientação e incentivo e a Leucio Duarte por ensinamentos e disponibilização de tempo e equipamentos.

À professora Gardenia pela orientação, suporte e disponibilidade desde a minha iniciação científica.

Aos meus colegas de laboratório, especialmente a Silvia por toda a parceria, colaboração, disponibilidade,

À Juliana que chegou na reta final, mas que foi imprescindível para que a correria dos últimos experimentos fosse transformada em momentos otimistas, tranquilos, cheios de risadas.

Aos que acreditam e valorizam a ciência.

Aos órgãos de fomento que viabilizaram a execução dessa pesquisa.

E a todos que torcem por mim, mesmo que de longe, meus sinceros agradecimentos.

*“O sol só vem depois
É o astro rei, ok, mas vem depois”
Emicida*

RESUMO

O câncer é um grupo extenso de doenças que apresentam em comum o crescimento desordenado de células anormais que são capazes de se difundir para tecidos e órgãos adjacentes e, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, espera-se um aumento de 49,7% nos casos de câncer até o ano de 2040. Atualmente, a terapia antitumoral enfrenta diversos desafios devido ao surgimento de resistência do tumor ao fármaco, bem como diversos efeitos colaterais indesejados, tornando urgente a busca por novos compostos mais ativos e seletivos. Nesse contexto, a Reação Morita-Baylis-Hillman se mostrou promissora enquanto fonte de moléculas com atividade biológica, entre as quais, já é descrito que adutos derivados de isatina apresentaram citotoxicidade diante células leucêmicas e de carcinoma de pulmão. Neste trabalho buscamos identificar a atividade citotóxica de 21 adutos derivados de isatina frente a seis linhagens tumorais (MCF-7, HEP-2, HepG2, HL60, K562 e NCI H292), nos quais os 8 mais promissores foram testados em células mononucleares do sangue periférico (CMSP). As CI50s determinadas pelo método do MTT após 72h para células tumorais dos adutos mais citotóxicos variaram entre 0,044uM e 29,25uM enquanto que em CMSP variou entre 2,75uM e 19,25 uM. Após a determinação do índice de seletividade, optou-se por dar continuidade aos experimentos com os dois adutos mais ativos e seletivos na linhagem tumoral de leucemia mieloide crônica, K562. São eles: MBH 6 e MBH 9. Foi realizado o teste de exclusão por azul de tripan, no qual foi constatado que, apesar de mais ativo após 72 h, o aduto MBH 9 apresenta uma resposta mais tardia quando comparada ao aduto MBH 6, que já este demonstrou a citotoxicidade significativa a partir das primeiras 24h. Essa afirmação é respaldada através das alterações morfológicas analisadas que constataam indicativos de condensação de cromatina nas células testadas com 16uM do aduto MBH 6 já nas primeiras 24h de tratamento que se intensificaram com 48h e 72h de tratamento para MBH6 e MBH9. Foram realizados ensaios em citometria, nos quais foi possível observar significativa fragmentação de DNA ($p < 0,05$) em todas as concentrações de ambos adutos testados, bem como uma redução da proliferação celular na fase S/G₂/M do ciclo celular ($p < 0,05$). Por fim, foram realizados ensaios de Western Blot que possibilitou a observação de uma redução significativa ($p < 0,05$) das proteínas anti-apoptóticas MCL-1 e BCL-XL nas células K562 tratadas por 24h com os adutos MBH 6 e MBH 9 e uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da Caspase-3 total nas concentrações de 6uM e 12uM do MBH 9, bem

como na concentração de 16uM da MBH6 sugerindo que estes adutos são capazes de induzir apoptose em K562.

Palavras-chave: câncer; morita-baylis-hillman; citotoxicidade.

ABSTRACT

Cancer is a large group of diseases that have in common the disordered growth of abnormal cells that are capable of spreading to adjacent tissues and organs and, according to the World Health Organization, an increase of 49.7% is expected in cancer cases by the year 2040. Currently, antitumor therapy faces several challenges due to the emergence of tumor resistance to the drug, as well as several unwanted side effects, making urgent the search for new more active and selective compounds. In this context, the Morita-Baylis-Hillman Reaction proved to be promising as a source of molecules with biological activity, among which, it has been described that isatin-derived adducts showed cytotoxicity against leukemic cells and lung carcinoma. In this work we sought to identify the cytotoxic activity of 21 isatin-derivative adducts against six tumor lines (MCF-7, HEP-2, HepG2, HL60, K562 and NCI H292), in which the 8 most promising ones were tested in blood mononuclear cells peripheral (PBMC). The IC₅₀s determined by the MTT method after 72h for tumor cells of the most cytotoxic adducts ranged between 0.044 μ M and 29.25 μ M, while in PBMC it ranged from 2.75 μ M to 19.25 μ M. After determining the selectivity index, it was decided to continue the experiments with the two most active and selective adducts in the chronic myeloid leukemia tumor lineage, K562: MBH 6 and MBH 9. The trypan blue exclusion test was performed, in which it was found that, despite being more active after 72h, the MBH 9 adduct shows a later response when compared to the MBH 6 adduct, that already this demonstrated significant cytotoxicity from the first 24h. This statement is supported by the morphological changes analyzed that show indications of chromatin condensation in cells tested with 16 μ M of the MBH 6 adduct already in the first 24 hours of treatment, which intensified with 48 hours and 72 hours of treatment for MBH6 and MBH9. Cytometry assays were performed, in which it was possible to observe significant DNA fragmentation ($p < 0.05$) at all concentrations of both tested adducts, as well as a reduction in cell proliferation in the S/G2/M phase of the cell cycle ($p < 0.05$). Finally, Western Blot assays were performed, which allowed the observation of a significant reduction ($p < 0.05$) of the anti-apoptotic proteins MCL-1 and BCL-XL in K562 cells treated for 24h with the adducts MBH 6 and MBH 9 and a significant decrease ($p < 0.05$) of total Caspase-3 at concentrations of 6 μ M and 12 μ M of MBH 9, as well

as in the concentration of 16 μ M of MBH6, suggesting that these adducts are able to induce apoptosis in K562.

Keywords: cancer; morita-baylis-hillman; cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1- Número de novos casos em 2020 no mundo, em todas as idades e sexos	19
Figura 2- Tipos de câncer mais incidentes por sexo no Brasil em 2020, exceto o câncer de pele não-melanoma	
Figura 3- Reação Morita-Baylis-Hillman	33
Figura 4- Esquema geral da MBHR envolvendo derivados da isatina como substrato	34

ARTIGO

Figura 1- Estrutura química dos adutos 1-9	49
Figura 2- Estrutura química dos adutos 10-17	50
Figura 3- Estrutura química dos adutos 25-30	50
Figura 4- Viabilidade das células K562 após tratamento com MBH 6	58
Figura 5- Viabilidade das células K562 após tratamento com MBH 9	59
Figura 6- Alterações morfológicas das células K562	61
Figura 7- Taxa de fragmentação de DNA em células K562	62
Figura 8- Ciclo celular analisado por citometria de fluxo	63
Figura 9- Relação entre a proteína alvo e a β -actina	64
Figura 10- Proteínas avaliadas na membrana de nitrocelulose	65

LISTA DE SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
2HG	D-2-hidroxi-glutarato
ABL1	Abelson 1
ACA	Anormalidades cromossômicas adicionais
AKT	Proteína quinase B
ANOVA	Análise de variância
APAF 1	Fator de ativação 1 da protease apoptótica
APP	Proteína precursora amiloide
ATP	Adenosina trifosfato
aza-v(MBHR)	Reação Morita-Baylis-Hillman aza-variante
BAK	Antagonista assassino análogo de Bcl-2
BAX	Proteína X associada a Bcl-2
BCL-2	Proteína do linfoma de células B- 2
BCL-W	Proteína 2 semelhante a Bcl-2
BCL-XL	Linfoma de células B extra grandes
BCR	Do inglês, <i>breakpoint cluster region protein</i>
BFL1/A1	Proteína A1 relacionada a Bcl-2
BH3	Homologia 3 de Bcl-2
BID	Agonista de morte de domínio de interação BH3
BMF	Fator modificador de Bcl-2
Ca ²⁺	Íon cálcio
CI50	Concentração inibitória de 50%
cDNA	DNA complementar
CO ₂	Dióxido de carbono
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DR6	Receptor de morte 6

DISC	Complexo de sinalização indutor de morte
DMEM	Do inglês, Dulbecco's modification of. Minimum Essential Media
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
ECL	Do inglês, <i>Enhanced chemiluminescence</i>
ERK	Proteína cinase regulada por sinais extracelulares
FADD	Proteína associada a Fas com domínio de morte
Fas	Fator relacionado a apoptose
FCE	Fator de crescimento epidermal
FISH	Hibridização in situ por fluorescência
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
G-MSF	Fator estimulador da colônia de macrófagos-granulócitos
GST	Glutathione s-transferase
HEP-2	Linhagem celular do carcinoma de laringe humano
HepG2	Linhagem celular do carcinoma hepatocelular
HER 2	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano
HIF	Fator induzível por hipóxia
HL60	Linhagem celular da Leucemia Promielocítica
HMGB 1	Proteína caixa 1 do grupo de alta mobilidade
HRK	Ativador de apoptose Harkiri
IAP	Inibidor de apoptose
IDH	Isocitrato desidrogenase
IFN- α	Interferon-alfa
IGF2	Fator de crescimento semelhante a insulina 2
IL-6	Interleucina 6
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ITQ	Inibidor de tirosina quinase
K562	Leucemia mieloide crônica
kDa	Quilodalton
LC3II	Cadeia leve de proteína associada a microtúbulo
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
LPS	Lipopolissacarídeo

MCF-7	Linhagem celular do adenocarcinoma de mama
MBHA	Aduto da Reação Morita-Baylis-Hillman
MBHR	Reação Morita-Baylis-Hillman
MCL-1	Do inglês, <i>myeloid cell leucemia 1</i>
MEK	Proteína quinase ativada por mitogênio
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MLKL	Domínio quinase de linhagem mista
mTOR	Alvo mecanístico da rapamicina quinase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
NCI H292	Linhagem celular do carcinoma de pulmão
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NK	Do inglês, <i>natural killer</i>
nm	Nanômetro
NOXA	Membro das proteínas apenas BH3
OMS	Organização Mundial de Saúde
p53	Proteína 53
p60	Proteína 60
PBS	Tampão fosfato-salino
Ph	Filadélfia
PI	Iodeto de propídeo
PI3K	Fosfoinosítideo 3-quinase
PIP 2	4,5 bifosfato de fosfatidilinositol
PIP 3	Fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PPMEM	Poros de permeabilidade da membrana externa mitocondrial
pRb	Proteína do Retinoblastoma
PUMA	p53 modulador de apoptose regulado positivamente
qPCR	Reação quantitativa em tempo real da polimerase em cadeia
RAS	Vírus do sarcoma de rato
RAF	Proto-oncogene RAF serina / treonina-proteína quinase
RIPA	Tampão do ensaio de radioimunoprecipitação

RIPK1	Serina / treonina-proteína quinase 1
RIPK3	Serina / treonina-proteína quinase 3
RM	Receptor de morte
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI 1640	Do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S.E.M	Erro médio padrão
SH2	Homologia Scr 2
SRC	Proto-oncogene tirosina-proteína quinase Src
TEM	Transição epitelial-mesenquimal
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TRADD	Proteína do domínio DEATH associada ao receptor do fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
ULK1	Cinase ativadora de autofagia 1
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
XIAP	Inibidor de apoptose ligado ao X

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1	CÂNCER	19
2.1.1	Aspectos gerais	19
2.1.2	Marcas registradas do câncer	20
2.2	MORTE CELULAR	23
2.2.1	Necrose	23
2.2.2	Apoptose	23
2.2.2.1	Via intrínseca da apoptose	25
2.2.2.2	Via extrínseca da apoptose	26
2.2.3	Autofagia	26
2.2.4	Necroptose	27
2.3	LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA	28
2.3.1	Aspectos gerais	28
2.3.2	Fisiopatologia	29
2.4	A REAÇÃO MORITA-BAYLIS-HILLMAN	33
2.5	ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS MBHAs DERIVADOS DA ISATINA	35
3	OBJETIVOS	36
4	REFERÊNCIAS	37
5	ARTIGO -AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA INDUÇÃO DE	45
	APOPTOSE DE ADUTOS DA REAÇÃO MORITA-BAYLIS-HILLMAN DERIVADOS	
	DA ISATINA EM CÉLULAS TUMORAIS	

6	CONCLUSÕES	69
	ANEXO I - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESSOAS (CEP- UFPE)	70

1. INTRODUÇÃO

Por definição, o câncer é um grupo de doenças que apresentam características em comum como o crescimento desordenado de células e a capacidade de invadir um tecido diferente do seu sítio de origem (OMS, 2021). No Brasil, espera-se no ano de 2021 mais de 600 mil novos casos de câncer, o equivalente a cerca de 3% dos casos confirmados no mundo (INCA, 2021). A leucemia mieloide crônica (LMC), um dos tumores mais prevalentes no Brasil em homens, consiste em uma neoplasia mieloproliferativa originária da translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 ($t(9;22)(q34;q11)$) que origina o cromossomo Filadélfia e, conseqüentemente o gene de fusão BCR-ABL1 (SHOLIKAH, T, 2017).

O tratamento da LMC passou por diversas mudanças desde o seu descobrimento, sendo a mais revolucionária a descoberta dos inibidores de tirosina quinase, sendo o Mesilato de Imatinibe, primeiro fármaco desenvolvido com esse mecanismo de ação, o “padrão ouro” para o tratamento capaz de propiciar uma taxa de sobrevida de 10 anos em mais de 80% dos pacientes. (LINEV, A. et al, 2018). No entanto, a existência de mutações adicionais fez com que alguns pacientes apresentassem resistência ao tratamento, tão logo surgiram inibidores de tirosina quinase de segunda e de terceira geração com o intuito de driblar esta condição, porém até o presente momento, o principal obstáculo do uso dos inibidores de tirosina quinase segue sendo o desenvolvimento de resistência ao tratamento, tornando de suma importância a investigação de novas moléculas capazes de combater essa enfermidade (SUNDARAN, DN et al, 2018).

A reação Morita-Baylis-Hillman vêm se mostrando como uma fonte promissora de composto bioativos, a partir da qual, com o uso da isatina como grupo eletrófilo, já foi possível a obtenção de adutos com atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antitumoral.

O presente estudo visou investigar a atividade citotóxica de vinte e um adutos de isatina frente a linhagens de células tumorais de diferentes origens e avaliar a seletividade e a toxicidade em células não neoplásicas.

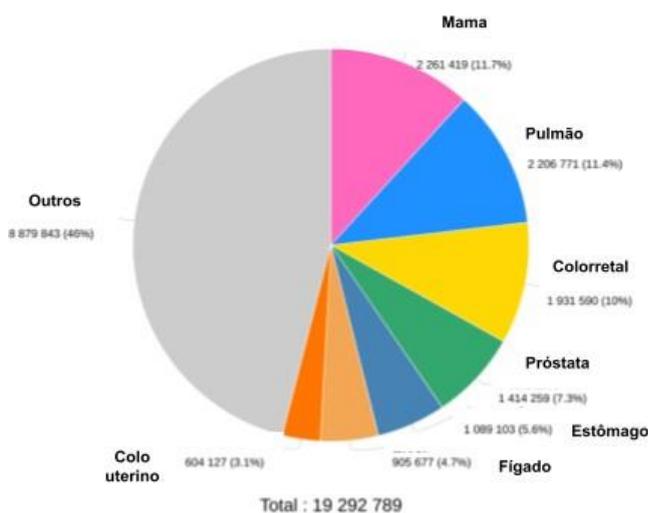
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CÂNCER

2.1.1 Aspectos gerais

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), pode-se entender como câncer um grupo extenso de doenças que têm em comum o crescimento descontrolado de células anormais que possuem a capacidade de ultrapassar os limites dos tecidos ou órgãos de origem e invadir regiões adjacentes (metástase). É esperado que, no mundo, em 2040 essa doença tenha uma incidência de 28.887.940 novos casos representando um aumento de 49,7% quando comparados aos 19.282.789 casos confirmados no ano de 2020, no qual os tumores mais prevalentes foram o câncer de mama, de pulmão, próstata, estômago, fígado, de colo uterino e colorretal, conforme ilustrado na Figura 1. (OMS, 2021)

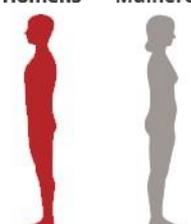
Figura 1: Número de novos casos em 2020 no mundo, em todas as idades e sexos.



Fonte: adaptado de Cancer Today (iarc.fr)

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) , estima o surgimento de novos casos em triênios e, são esperados para o triênio 2020-2022, cerca de 625 mil novos casos a cada ano, sendo os mais comuns o câncer de próstata, nos homens e de mama, nas mulheres conforme ilustrado na Figura 2(INCA, 2021).

Figura 2: Tipos de câncer mais incidentes por sexo no Brasil em 2020, exceto o câncer de pele não-melanoma

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Côlon e Reto	20.540	9,1%			Côlon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.710	7,5%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.200	5,0%			Glândula Tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema Nervoso Central	5.230	2,3%

* Números arredondados para múltiplos de 10

Fonte: Estimativa 2020 - Brasil - estimativa dos casos novos | INCA - Instituto Nacional de Câncer

2.1.2 Marcas registradas do câncer

As marcas registradas do câncer consistem em um método organizacional de agrupamento das principais características envolvidas nas mudanças fenotípicas das células entre o estado de benignidade para a malignidade (FOUAD, Y. & AANEI, C, 2017).

As células tumorais apresentam uma vantagem proliferativa diante de células saudáveis, o mecanismo mais amplamente estudado que confere essa característica é a presença de mutações de genes nas células tumorais, denominados oncogenes, tornando-os transmissores ativos de proliferação celular através da codificação de proteínas ou em maiores concentrações quando comparadas a células saudáveis ou com estrutura e função modificadas (HANAHAN, D. & WEINBERG, R., 2016).

A inativação de moléculas inibidoras e a desregulação do ciclo celular devido a mutações em proteínas presentes nos pontos de checagem também são alterações metabólicas que conferem às células tumorais uma vantagem de sobrevivência em detrimento das células saudáveis bem

como uma capacidade proliferativa maior. (FOUAD, Y. & AANEI C., 2017 ; DELAVEGA, M.; CHAPMAN, E.;ZHANG, D., 2018).

Em condições homeostáticas, a parada do ciclo celular e consequentemente, da proliferação é de responsabilidade, principalmente da proteína do Retinoblastoma (pRb) e da p53. Os genes responsáveis pela codificação dessas proteínas são denominados genes supressores de tumor (GST). Foi observado que pacientes acometidos pelo câncer possuem alterações genéticas que acarretam na perda de função ou até mesmo na deleção dos GSTs, fazendo com que não haja a limitação proliferativa e, consequentemente, contribuindo para a progressão do tumor. (HANAHAN, D. & WEINBERG, R, 2016)

O aumento da conversão da glicose em lactato independente da presença de oxigênio, denominada glicólise anaeróbia ou Efeito de Warburg é um mecanismo metabólico adaptativo das células tumorais com o intuito de driblar os efeitos promovidos em condição de hipóxia(SULLIVAN, L.; GUI, D.; HEIDEN, M., 2016).

Estudos recentes descreveram que vários tumores seguem rotas únicas que, em geral, consistem em mutações em enzimas que acarretam no ganho ou na perda de função. Ao adquirir função, as enzimas são capazes de produzir compostos, denominados oncometabólitos, quando ocorrem mutações que deletam a atividade enzimática, ocorre o acúmulo de moléculas que, em condições homeostáticas, se apresentam em baixas concentrações (KREUZALER, P et al, 2020).

O D-2-hidroxi-glutarato (2HG) é um exemplo de metabólito originado a partir de mutações da enzima isocitrato desidrogenase (IDH) em ambas isoformas 1 e 2, o 2HG é capaz de atuar em vias como a do fator induzido por hipóxia (HIF) como também na metilação de histonas, ainda no Ciclo do Ácido Cítrico existem outros oncometabólitos em maiores concentrações também decorrentes de alterações na IDH, ou de mutações na linha germinativa dos genes da fumarato hidratase ou succinato desidrogenase, são eles o fumarato e o succinato que, assim como o 2HG estão associados a supressão da via de reparo homólogo do DNA (KREUZALER, P et al, 2020; SULKOWSKI, P et al, 2020).

As células tumorais possuem diversos mecanismos de evasão à apoptose como o aumento das proteínas anti apoptóticas da família Bcl-2 e a perda das proteínas “apenas BH3” (PUMA, BID e NOXA) que possuem função pró-apoptótica, bem como a redução das proteínas efetoras BAK e BAX. A autofagia também é citada na literatura como um mecanismo de manutenção da sobrevivência celular, pois em situações de estresse devido a privação

nutricional, promove a reciclagem de biomoléculas a partir da degradação de componentes celulares endógenos, como também é capaz de degradar proteínas reguladoras da apoptose como a caspase 8 (SHARMA; BOISE; SHANMUGAM, 2019).

Para suprir a demanda metabólica de um tumor, ocorrem alterações vasculares através do processo de angiogênese que consiste no processo de surgimento de novos vasos a partir da migração e divisão celular de células endoteliais pré-existentes. Esse processo, em geral, é desencadeado como uma resposta a condições de hipóxia estimulado a partir do HIF através da regulação positiva de moléculas pró-angiogênicas como o VEGF (FOUAD, Y & ANEELI, C., 2017).

Níveis aumentados de VEGF também contribuem para a amplificação do processo inflamatório por meio da indução da vasodilatação e da permeabilidade vascular, permitindo a transmigração de células inflamatórias do sangue para sítio inflamatório. Além disso, o VEGF desencadeia a evasão da apoptose bem como o aumento da proliferação celular (AGUILAR-CAZARES, D. et al, 2019).

A metástase é responsável pelo amplo índice de mortalidade por câncer. Para que ocorra, é necessário que haja uma cascata de eventos que tem início a partir da invasão da matriz extracelular a partir de erros contínuos na segregação cromossômica durante a mitose que acarretam em uma instabilidade cromossômica e, a partir dessas falhas, ocorrem alterações nas células, tais como rupturas do micronúcleo, secreção de DNA genômico no citosol e ativação de vias de sinalização responsáveis pela transição epitelial-mesenquimal (TEM). (ZEESHAN & MUTAHIR, 2017; FARES et. al, 2020)

A TEM é o evento no qual células epiteliais adquirem a capacidade de invadir, resistir ao estresse e se disseminar devido a alterações bioquímicas reversíveis. O processo se inicia quando as células epiteliais perdem suas junções célula-célula tornando-se móveis e então, degradando a membrana basal e a matriz extracelular, destruindo barreiras físicas e, dessa forma, permitindo a migração e invasão de células do tumor primário (FARES et. al, 2020; YANG et. al, 2020).

A etapa seguinte da cascata metastática é denominada intravasão. Esse processo consiste na entrada da célula tumoral nos vasos sanguíneos e/ou linfáticos e, conseqüentemente, na circulação sistêmica. A densidade da microvasculatura bem como o diâmetro do vaso são fatores que influenciam no processo de intravasão. Uma vez que entra nos vasos sanguíneos, as células são capazes de escapar da ação do sistema imunológico por estimular a agregação

plaquetária e por meio dos neutrófilos que suprimem a ativação leucocitária permitindo a sua sobrevivência. Devido ao diâmetro das células normalmente ser superior ao tamanho dos vasos, ocorre um aprisionamento desses tumores na microvasculatura, podendo levar ao rompimento desses capilares ou ao início da extravasão, ou seja, a saída do vaso sanguíneo e, iniciando assim, um tumor secundário (CHIANG, CABRERA, SEGALL, 2016; YANG et. al, 2020; FARES et.al 2020).

Alguns estudos observaram que a extravasão pode ser iniciada a partir da indução da necroptose (necrose programada) em células endoteliais por meio da ligação entre a APP (proteína precursora amiloide) que está nas células tumorais ao DR6 (receptor de morte 6) presente no endotélio. As células necróticas liberam DAMPs (padrões moleculares associados ao dano) como o ATP e HMGB1 que, por sua vez, induzem a abertura da barreira endotelial, promovendo assim, a extravasão (FARES et. al, 2020; STRILIC & OFFERMANNNS, 2017).

Ao atingir o novo tecido, as células cancerígenas são suscetíveis à imunovigilância exercida pelas células NK (natural killers) e linfócitos T, logo, pode-se concluir que a composição de células imunológicas de um órgão tem influência direta na susceptibilidade do mesmo em ser um sítio para metástase. Durante a colonização, células metastáticas expressam mediadores parácrinos como IL-6, IGF2 e mediadores intracelulares como SRC e ezrina que são responsáveis por gerar, amplificar e manter o crescimento e a sobrevivência do tumor (MASSAGUÉ & OBENAUUF, 2016).

2.2 MORTE CELULAR

2.2.1 Necrose

A necrose é um tipo de morte celular definida pela perda da integridade da membrana plasmática. Esse processo é induzido a partir de danos externos às células tais como depleção de ATP, hipóxia, inflamação, toxicidade de drogas, ação de agentes biológicos e respostas autoimunes que, por fim, culminam na tumefação de organelas, ruptura da membrana plasmática, lise da célula e , conseqüentemente, no extravasamento de todo o conteúdo da célula (KHALID, N. & AZIMPOURAN, M., 2020).

Molecularmente, a necrose pode ser resultado do influxo contínuo de Ca^{2+} em associação ao estresse oxidativo promovido pelos danos externos, essas alterações promovem a entrada de diversas moléculas e de água na mitocôndria, resultando na perda do potencial de membrana mitocondrial, perda de ATP e na liberação de proteínas mitocondriais no citoplasma decorrentes da ruptura de sua membrana externa. A lise dessa organela associada ao aumento da expressão de marcadores inflamatórios como o $\text{NF-}\kappa\text{B}$ resulta na lise da membrana celular e, dessa forma, na morte celular (NIRMALA, J. & LOPUS, M., 2019; DARCÝ. M., 2018).

Como consequência da lise, há a liberação de DAMPs que consistem em um grupo de moléculas que desempenham funções específicas nas células saudáveis, como por exemplo o ATP e a proteína do choque térmico. Quando liberadas, essas moléculas são responsáveis pela sinalização do dano celular para o sistema imune ativando a cascata inflamatória nos tecidos adjacentes (DARCÝ. M., 2018; SACHET, M; LIANG, Y.; OEHLER, R., 2017).

Morfologicamente, células em necrose quando comparadas a células vivas, apresentam além da perda da integridade da membrana, a condensação e marginalização da cromatina, cariorrexe (fragmentação do núcleo de no qual a cromatina se distribui irregularmente pelo citoplasma) e baixa densidade citoplasmática. (SACHET, M.; LIANG, Y.; OEHLER. R., 2017).

2.2.2 Apoptose

A apoptose é tida como “a morte celular programada” e exerce uma função importante no equilíbrio homeostático do corpo, pois é através desse mecanismo que células com dano no DNA e que se proliferam descontroladamente são eliminadas do organismo. Células apoptóticas apresentam alterações morfológicas características desse tipo de morte celular, tais como uma redução no seu volume, condensação citoplasmática, fragmentação nuclear, formação de vesículas da membrana plasmática e formação de corpos apoptóticos. Existem dois tipos de vias de sinalização apoptótica: a via intrínseca e a via extrínseca, ambas culminam na via comum com a ativação de caspases efetoras e, dessa forma, levando a ruptura da membrana nuclear e do DNA genômico dentro de estruturas nucleossomais e formação das vesículas membranares (PFEFFER, C. & SINGH, A., 2018; CHEN; KANG; FU, 2018; CARNEIRO, B & EL-DEIRY, W., 2020). No câncer, as células apresentam diversos mecanismos que culminam na evasão da apoptose como, por exemplo, inibição de

caspases, regulação positiva de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 (PFEFFER, C. & SINGH, A., 2018).

A família Bcl-2 consiste em um grupo de proteínas que se relaciona diretamente com a apoptose, as anti-apoptóticas apresentam homologia estrutural nos domínios de homologia Bcl-2 (BH) 1, 2, 3 e 4, são elas: BCL-2, BCL-W, BCL-XL, BFL-1/A1 e MCL-1, estas interagem diretamente com as proteínas pró-apoptóticas apenas-BH3 que apresentam homologia no domínio BH3, são elas: PUMA, BAD, BID, BIK, BMF, HRK e NOXA, culminando na ativação ou na inativação das proteínas efetoras BAK e BAX (HATA; ENGELMAN; FABER, 2015)

2.2.2.1 Via intrínseca da apoptose

A via intrínseca também é conhecida como a via mitocondrial da apoptose, pois depende de proteínas solúveis lançadas pela mitocôndria. Esse mecanismo de morte pode ser estimulado por diversos fatores como dano ao DNA, paradas no processo mitótico ou nos fatores de crescimento da célula, como consequência a esses eventos, ocorre a ativação das proteínas apenas-BH3 que são responsáveis por inibir as proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2 e ativar as proteínas ativadoras BIM, BID, e PUMA que se ligam e ativam diretamente as proteínas efetoras BAK e BAX que, por sua vez, são responsáveis pela permeabilização da membrana externa da mitocôndria, através de mudanças conformacionais e oligomerizações que levam a formação do poro de permeabilidade da membrana externa mitocondrial (PPMEM), permitindo assim, a saída de proteínas solúveis pelo espaço intermembranar, dentre essas moléculas, está o citocromo C que, além de transportar elétrons durante a fosforilação oxidativa, é responsável pela formação do apoptossomo no citosol a partir da associação ao APAF1 (BOCK, F & TAIT, S, 2020; ALVAREZ-PAGGI, D. et al, 2017; CARNEIRO, B & EL-DERY, W., 2020).

Quando formado, o apoptossomo recruta e ativa a caspase 9 que é responsável pela clivagem e ativação das caspases efetoras 3 e 7. (BOCK, F. & TAIT, S., 2020; D'ARCY, M, 2019)

Uma outra molécula liberada a partir do poro de permeabilidade da mitocôndria é a SMAC que promove ativação direta das caspases, como também, é responsável pela amplificação do processo promovido pelo citocromo C sinalizando o inibidor de proteínas da apoptose (IAPs) para degradação proteossomal e, assim, bloqueia a atividade inibitória das caspases. É

importante ressaltar que, o bloqueio de IAPs por si só não é suficiente para a ativação da cascata apoptótica, ou seja, se faz necessária a formação do apoptossomo para que essa via de morte celular seja ativada (KESAVARDHANA, S.; MALIREDDI, R.; KANNEGANTI, T., 2020; D'ARCY, M. 2019).

2.2.2.2 Via extrínseca da apoptose

A via extrínseca da apoptose, também conhecida como a via do receptor de morte (RM), é ativada a partir de indução externa através de outras células, como macrófagos ou células NK (do inglês, *natural killers*) que produzem ligantes como o Fas, TNF- α ou TRAIL que, por sua vez, se associam, na superfície da célula, a moléculas receptoras que fazem parte da superfamília do Fator de Necrose Tumoral (TNF), denominadas receptores de morte (D'ARCY, M., 2019).

No interior da célula há um complexo acoplado ao RM formado pela associação entre a procaspase 8 e 10 ao FADD e/ou TRADD, denominado DISC (Complexo Sinalizador de Indução de Morte). (CHEN, Q.; KANG, J.; FU, C., 2018)

Quando ativada, a caspase 8 pode ativar diretamente as caspases efetoras 3 e 7. Entretanto, em algumas situações essa cascata está inativada devido a presença do XIAP (Proteína inibidora de apoptose ligada ao X). Com o intuito de ultrapassar esse obstáculo, a caspase 8 cliva a proteína BID, que, por sua vez, é responsável pela ativação da via BAK-BAX e, conseqüentemente, pela formação do PPMEM que libera proteínas que antagonizam a ação da XIAP possibilitando assim, a ação das efetoras. (TUMMERS, B. & GREEN, D., 2017).

2.2.3 Autofagia

A autofagia consiste no processo no qual macromoléculas e organelas são fagocitadas por lisossomos, que, por sua vez, são capazes de digerir esses substratos que, posteriormente, podem ser utilizados tanto para a criação de novas estruturas celulares quanto como fonte de energia. Por mais que, na maioria das vezes, seja realizada com o intuito de promover a reciclagem dos componentes celulares, a autofagia pode acarretar na destruição da célula, o que a torna diretamente relacionada à supressão de tumores, bem como à remoção de células senescentes (D'ARCY, M., 2019).

Morfologicamente, a célula em morte por autofagia apresenta vacuolizações citoplasmáticas, condensação da cromatina e aumento do volume das organelas. É de suma importância ressaltar que a autofagia apresenta um papel controverso, pois, conforme foi citado anteriormente neste trabalho, em situações de privação nutricional, esse processo é essencial para a sobrevivência da célula. (KARCH, J. et al, 2017)

A autofagia tem início a partir da indução do complexo ULK1 que, na presença da proteína PI3K de classe III, induz a formação de um fagóforo que, se fecha ao redor de proteínas ubiquitinadas ligadas a p60 e a LC3II, há então o fechamento do fagóforo e posteriormente, a fusão do mesmo com lisossomos, acarretando na degradação das proteínas ubiquitinadas através da ação de enzimas hidrolíticas (D'ARCY, M., 2019).

2.2.4 Necroptose

A necroptose é descrita como uma morte celular programada cujos mecanismos são semelhantes aos da apoptose e, morfologicamente se assemelha à necrose. É mediada principalmente pela proteína quinase de interação com o receptor 1 (RIPK1), pela proteína quinase de interação com o receptor (RIPK3) e pela MLKL (do inglês, *Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein*). É descrita como uma alternativa para a morte celular quando a via apoptótica dependente da caspase 8 é bloqueada. (DHURIYA, Y & SHARMA, D., 2018; GONG, Y. et al, 2019)

Essa via é iniciada a partir de ligantes imunológicos como Fas, LPS e TNF, sendo o último o mais amplamente estudado. Ao se ligar ao seu receptor, o TNF promove uma alteração conformacional do mesmo, levando ao recrutamento de diversas proteínas, dentre elas a RIPK1 que se autofosforila no seu resíduo de serina N-terminal, tornando-se ativa, possibilitando assim a sua interação com a RIPK3, formando um complexo denominado Necrossomo. Nessa estrutura, o RIPK3 fosforila a MLKL ativando-a e esta, por sua vez, é translocada para a membrana plasmática da célula, onde promove a execução da necroptose através da permeabilização necrótica da membrana plasmática da célula, a tumefação celular e a perda de integridade da célula e das organelas e, assim, promovendo a morte celular. Esse processo é inibido pela Necrostatina-1, inibidora da RIPK1 (DHURIYA, Y & SHARMA, D., 2018; GONG, Y. et al, 2019).

2.3 LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

2.3.1 Aspectos gerais

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma neoplasia maligna mieloproliferativa que se origina a partir da translocação recíproca entre os genes ABL1 (Abelson 1) localizado no cromossomo 9 e BCR (do inglês, *Breakpoint cluster region*), localizado no cromossomo 22 (t(9;22)(q34;q11.2)) originando assim o Cromossomo Filadélfia (Ph). (ARRIGONI, E. et al, 2018).

É importante ser mencionado que cerca de 5 a 10% dos pacientes acometidos pela LMC não possuem o cromossomo Ph, esse fenômeno pode ser resultante da ocorrência da translocação em um sítio distinto do usual (22q11.2), ou de uma inserção de material não-recíproca entre os cromossomos 9 e 22 (por ser mais frequente que ocorra no cromossomo 9, a inserção de material no cromossomo 22 pode levar a um aspecto distinto da translocação clássica), ou ainda devido a uma translocação reversa, na qual a quebra do cromossomo ocorre em um ponto distinto do clássico t(9;22), fazendo com que o gene de fusão originado seja encontrado em um locus distinto do 9q34. (MOLICA; MASSARO; BRECCIA, 2017)

De acordo com o INCA, é esperado para cada ano do triênio 2020-2022 cerca de 10.810 novos casos de leucemias, sendo mais prevalente em indivíduos do sexo masculino (representam aproximadamente 54% dos diagnósticos confirmados) (INCA, 2021).

Existem alguns fatores de risco associados ao prognóstico da doença como a presença de conteúdo fibroso na biópsia de medula óssea e anormalidades cromossômicas adicionais de alto risco (ACA) sendo o isocromossomo 17q (i(17q)), trissomia do cromossomo 8 ou 9 as mais comuns sendo denominadas na literatura como as “principais alterações de rota” (HOCHHAUS, A. et. al, 2020; WANG, W. et. al, 2015).

A formação do i(17q) se dá a partir de uma quebra ou uma divisão errada do centrômero resultando assim, em duas imagens espelhadas do braço longo do cromossomo e, conseqüentemente, na perda do braço curto. Essa anormalidade possui um papel ainda não bem esclarecido na LMC, entretanto sabe-se que há uma relação direta com a progressão da doença para a fase acelerada (blástica) (KOCZKODAJ, D. et al, 2021).

2.3.2 Fisiopatologia

A formação do gene de fusão BCR-ABL1 resulta na codificação da proteína quimérica homônima com uma atividade constitutiva de tirosina-quinase levando a um processo de autofosforilação de outros sítios presentes em ABL1 que, conseqüentemente, promovem um aumento do número dos sítios de ligação para proteínas contendo SH2 e, assim, ativam diversas vias transdutoras de sinal, sendo as vias RAS/RAF/MEK/ERK e a via PI3K/AKT/mTOR as mais amplamente estudadas e visadas como alvo terapêutico (HOUSHMAND M. et al, 2019; ZHOU; MEDEIROS; HU, 2018).

Ras é responsável pela ativação de Raf, Mek e Erk culmina no aumento da proliferação celular e na redução da função GTPase, permanecendo constantemente no estado ativado. Já a via do PI3K se inicia com a fosforilação do PIP2, originando assim, o PIP3 que, por sua vez, é facilita a ativação da Akt e esta é responsável pela fosforilação das proteínas efetoras da sinalização celular, contribuindo assim para a evasão da apoptose e resistência à terapêutica (SAKAI et. al, 2021; ZHOU; MEDEIROS; HU, 2018; SINGH, P. et al, 2021).

A ativação constitutiva dessas vias tem como principais conseqüências a indução da formação de espécies reativas de oxigênio, quebras na fita dupla de DNA, desregulação da adesão celular e inibição da morte celular por apoptose e autofagia (SAKAI et. al, 2021; ZHOU; MEDEIROS; HU, 2018).

Apesar de ser dividida em três fases, a LMC não apresenta sintomas específicos para nenhum desses estágios, entretanto, é importante ressaltar que é mais comum o aparecimento desses sinais nas fases acelerada e blástica e são eles: febre, suor noturno, fadiga, perda de peso, esplenomegalia e dor nos ossos. (HOUSHMAND M. et. al, 2019; GUDIMETLA, PRABHAKAR, PAL, 2019)

Na fase crônica, há uma proliferação aumentada dos leucócitos tanto na medula óssea quanto no sangue periférico, entretanto, ainda há uma resposta ativa a infecções e aos reguladores G-CSF (do inglês, *Granulocyte colony-stimulating factor*) e G-MSF (do inglês, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), indicando que ocorre a diferenciação celular (HOUSHMAND, M. et. al 2019).

Quando não há o diagnóstico ou o tratamento é ineficaz, há o avanço da doença para a fase acelerada, este estágio é caracterizado pelo aumento do número de células imaturas (blastos)

no sangue periférico (correspondem a cerca de 10-19% das células na contagem diferencial hematológica), porém, é necessário mencionar que o paciente já pode apresentar sintomas, mas na maior parte dos casos a progressão da fase crônica para a acelerada é subclínica, necessitando de uma monitoração laboratorial para que seja identificada. (KANTARJIAN, H et. al, 2019)

Os mecanismos que levam ao desenvolvimento da fase blástica ainda não são completamente compreendidos, sabe-se que é uma fase marcada por um aumento bruto da divisão celular associado a redução da diferenciação, ou seja há um acúmulo de blastos na medula óssea e o extravasamento deles para o sangue periférico (correspondem a mais de 20% das células na contagem diferencial hematológica) ou para qualquer outro tecido .Para que haja a progressão para a fase blástica também se faz necessária a presença de anormalidades cromossômicas adicionais e esplenomegalia aumentada ou persistente. (SAMPAIO, M. et.al, 2021; HAZNEDAROĞLU; KUZU; ÍLHAN, 2020).

2.3.3 Diagnóstico e tratamentos

Existem diversas técnicas de diagnóstico capazes de identificar a LMC e se faz importante mencioná-las pois é a partir desses exames que é realizado o monitoramento do paciente e que a eficácia da terapia antileucêmica é avaliada.

São elas: 1) a citogenética convencional que consiste na visualização de pelo menos 20 t(9;22)(q34;q11.2), neste procedimento o ciclo celular é interrompido na metáfase pois é nesta etapa do ciclo celular que ocorre a contração do DNA, o que possibilita uma melhor visualização das alterações estruturais (MOLICA; MASSARO; BRECCIA, 2017; DORFMAN, L et. al, 2018;); 2) a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), um método citogenético molecular que consiste na hibridização molecular, para isso são utilizadas sondas (sequências de DNA) complementares ao alvo desejado acopladas a um fluorocromo, comumente utilizada em pacientes com o cariótipo complexo (ANKATHIL, R et al, 2020; ASIF, M. et al, 2016); 3) a Reação quantitativa em tempo real da polimerase em cadeia (qPCR), uma técnica molecular para o diagnóstico da LMC que se baseia na utilização de um RNA mensageiro (RNAm) como molde para que sejam sintetizadas fitas de DNA complementares (cDNA) através da transcrição reversa e então, concomitantemente a amplificação e quantificação em tempo real, de ampla sensibilidade, permitindo a identificação de uma célula leucêmica em um universo de 10^5 células (BONAVIGO, A., 2018;

AZAD, N et al, 2018); e 4) o hemograma, pois alterações hematológicas variam de acordo com o estágio da LMC, na fase crônica há uma hiper celularidade, basofilia e desvio à esquerda (aumento de tipos celulares mais imaturos que o neutrófilo segmentado) (OGASAWARA, A. et al, 2019). Na fase acelerada, cerca de 10-19% das células do sangue periférico são blastos, a basofilia torna-se mais intensa (com cerca de 20% de basófilos) e também é possível observar trombocitopenia ou, em casos onde a terapia não é eficaz, trombocitose persistente. Já na fase blástica, devido ao extravasamento de células imaturas da medula óssea para o sangue periférico, é visualizado, no mínimo, 20% de blastos (KNIGHT; GRUNWALD; COPELAN, 2019).

A eficácia de um fármaco enquanto agente anti leucêmico é determinada de acordo com a capacidade do mesmo em promover uma resposta hematológica completa, ou seja, a normalização do número de leucócitos e plaquetas, bem como da esplenomegalia ou outros sintomas associados; e/ou se é capaz de propiciar a remissão citogenética completa que consiste na ausência de células em metáfase com o cromossomo Ph quando analisadas pela citogenética ou por FISH; ou ainda se propicia a resposta molecular completa, que corresponde a ausência da detecção do gene de fusão BCR-ABL1 através da qPCR (MORITA & SASAKI, 2021).

Nos primórdios do descobrimento da LMC, a conduta terapêutica utilizada se baseava no uso da solução de Fowler (arsenito de potássio diluído) e na irradiação do baço, até que em 1953, houve a introdução do Busulfan, um agente quimioterápico alquilante cujo mecanismo de ação consiste na substituição de grupos alquil do DNA da célula tumoral por átomos de hidrogênio e assim, inibe a transcrição do DNA em RNA. (HEHLMANN, R. 2020; PATEL & TADI, 2021).

Entretanto, o elevado índice de efeitos colaterais como, por exemplo, a indução de convulsões, anemia, pancitopenia, amenorreia, comprometimento da espermatogênese e a doença veno-oclusiva hepática fez com que este fármaco possuísse uma lista ampla de contraindicações, mas, apenas em 1963, houve a disponibilização de uma nova alternativa terapêutica: a hidroxiureia (HEHLMANN, R., 2020; PATEL & TADI, 2021).

O mecanismo de ação da hidroxiureia consiste na interrupção da síntese de DNA através da inibição da enzima ribonucleotídeo difosfatase redutase que é responsável pela conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, sendo assim eficaz no controle da leucocitose que ocorre na LMC, todavia, é importante mencionar que apesar da redução dos efeitos

colaterais quando comparada aos seus precursores, o tratamento com doses convencionais esta molécula não é capaz de levar a uma remissão citogenética da doença na maioria dos casos. (JINNA, S. & PARAS, B., 2019; LANGE, T. et al, 2020).

Na década de 1970 foi observado que, após o transplante alogênico de medula óssea, pacientes na fase blástica demonstraram uma regressão da doença para a fase crônica, bem como foi detectada a remissão citogenética, no entanto, pacientes submetidos a esse tratamento ficaram mais susceptíveis ao desenvolvimento da doença do enxerto versus hospedeiro, de problemas hepáticos, cardiopulmonares e genitourinários. Na mesma época, o interferon-alfa (IFN- α) foi identificado como uma alternativa quimioterápica capaz de induzir a remissão citogenética em pacientes jovens (menores de 50 anos), apesar deste feito ter sido alcançado apenas em cerca de 10 a 15% dos acometidos pela LMC, o IFN- α passou a ser utilizado como tratamento de escolha devido a sua capacidade de aumentar a sobrevida dos pacientes, contudo, o seu mecanismo de ação não é bem elucidado (HEHLMANN, R., 2020; RUSSO, D. et al, 2020).

A grande revolução na terapêutica da LMC ocorreu em 2002, com a aprovação do uso do Mesilato de Imatinibe como padrão de tratamento, um quimioterápico inibidor da enzima tirosina quinase (ITQ) que age através da ligação ao domínio catalítico da proteína ABL na sua forma inativa impedindo a ligação do ATP e, conseqüentemente, a ativação das vias transdutoras de sinal. Como o alvo terapêutico não é o DNA, este fármaco se mostrou mais seletivo para as células tumorais quando comparado aos seus antecessores, além de apresentar a melhor resposta molecular, além da taxa de sobrevida de 10 anos ser observada em cerca de 83% dos pacientes (SAGLIO G. & JABBOUR, E., 2017; GAJSKI, G. et al, 2019; LINEV, A. et al, 2018).

Entretanto, foi observado que alguns pacientes apresentaram desenvolvimento de resistência por parte das células leucêmicas à terapêutica com este fármaco, principalmente os que se encontravam na fase acelerada da LMC e isso se deve ao surgimento de mutações adicionais que levam à alteração na codificação de seqüências da proteína BCR-ABL, acarretando assim, na redução da sensibilidade ao ITQ (LINEV, A. et al, 2018).

Logo, surgiram os inibidores de tirosina quinase de segunda geração como alternativa àqueles que apresentavam resistência ao tratamento inicial com o Imatinibe, mas com o passar do tempo se tornaram a opção inicial para a terapia. Dentre os ITQs de segunda geração, três se destacaram em estudos clínicos quando comparados ao seu antecessor apesar de não

apresentarem uma diferença na sobrevida do paciente, foram capazes de induzir a resposta molecular mais rapidamente, reduzindo o avanço da LMC para as fases acelerada e blástica. São eles: Bosutinib, Nilotinib e Dasatinib (CORTES, J., 2018; BRECCIA, M et al, 2020). Entretanto, foi observado que houve o desenvolvimento de resistência em alguns pacientes, o que levou ao desenvolvimento do Ponatinib, um ITQ de terceira geração, mas foi constatado que dentre os acometidos pela LMC, para alguns essa conduta terapêutica também foi ineficaz devido a presença de mecanismos de resistência. (TAN, F. et al, 2019)

Atualmente, o grande obstáculo dos fármacos inibidores de tirosina quinase é a resistência que o paciente pode apresentar ao tratamento, este mecanismo foi classificado por cientistas em dois grupos: BCR-ABL dependente e BCR-ABL independente. No primeiro, observou-se que além do surgimento de mutações adicionais no domínio quinase, a amplificação e superexpressão do gene de fusão, bem como a presença de mutações compostas (mais de uma mutação na mesma proteína) e a instabilidade genômica contribuem para a ineficácia do tratamento com ITQs. (SUNDARAN, DN. et al, 2019)

Os mecanismos de resistência BCR-ABL independentes correspondem a: ativação de vias alternativas de sinalização que contribuem com a sobrevivência celular; a alterações nas proteínas responsáveis tanto pelo transporte plasmático quanto pela internalização do fármaco na célula alvo, reduzindo assim a concentração do mesmo no interior da célula-alvo; a alterações epigenéticas como metilação do DNA e modificação de histonas; a presença de células-tronco leucêmicas inerentemente resistentes; ao elevado número de proteínas antiapoptóticas; e ao microambiente da medula óssea cujo contato célula-célula é mediado através de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que podem contribuir com a resistência (SUNDARAN, DN. et al, 2019).

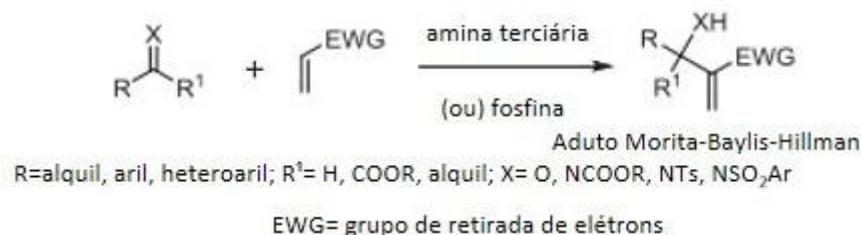
2.4 A REAÇÃO MORITA-BAYLIS-HILLMAN

A reação Morita-Baylis-Hillman (MBHR) começou a ser desenvolvida em 1968 por Morita ao descrever a ligação entre um aldeído e um acrilato, originadora de acrilonitrilos na presença de uma fosfina catalisadora, a triciclohexilfosfina. Em 1972, Baylis e Hillman relataram a ligação correspondente a partir da reação entre diversos aldeídos e alcenos ativados na presença de uma amina terciária como catalisador (PELISSIER, H., 2017).

Popularizada no final da década de 1980, a MBHR consiste na formação de uma nova ligação carbono-carbono entre um posicionado na posição α de um alceno ativado e um carbono

eletrófilo sp^2 de um aldeído ou de uma imina na presença de um agente catalisador que, por sua vez, pode ser uma amina terciária ou uma fosfina dando origem a produtos denominados Adutos da reação Morita-Baylis-Hillman (MBHA) conforme ilustrado na Figura 3 (LIU, Z. et al, 2017).

Figura 3: Reação Morita-Baylis-Hillman



Fonte: REDDY & RAO, 2018 (adaptado)

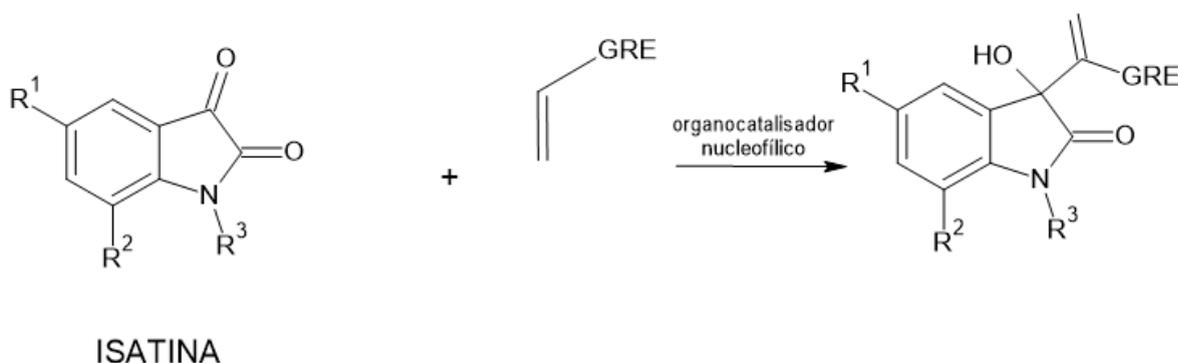
A MBHR apresenta um potencial promissor na química orgânica sintética por ser uma reação sustentável devido a alta economia atômica, ou seja, há uma grande incorporação dos reagentes nos produtos finais, por ocorrer isenta de solventes e pela presença de catalisadores orgânicos, além da importância dos seus adutos como precursores na síntese de produtos naturais úteis, de produtos sintéticos e de moléculas farmacologicamente relevantes. (REDDY & RAO, 2018).

Além do método original, a MBHR pode ser executada a partir de uma reação aza-variante (aza-v(MBHR)) que consiste na substituição do aldeído por iminas e apresenta como produtos diversos β -aminoácidos desejáveis, entretanto, por muito tempo obteve algumas limitações que a tornava menos sustentável como o uso de solventes tóxicos, o tempo extenso de execução (podendo durar dias). Essa limitação foi contornada por estudos recentes que constataram que a partir do uso de métodos de moagem, ou seja, de fragmentação da amostra que levam a uma redução do tamanho da partícula, a execução da aza-v(MBHR) não requer o uso de solventes e tem o seu tempo de execução reduzido para cerca de 3h (WILLIAMS; MORRIL; DUNCAN; 2020).

2.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS MBHAs DERIVADOS DA ISATINA

A isatina (1H-indol-2,3-diona) (Figura 4) é um derivado do indol que já foi encontrado naturalmente em plantas, fungos e animais. É um composto heterocíclico que, assim como seus derivados, possui grande importância na química médica devido a sua ampla atividade biológica e farmacológica, na MBHR, esta molécula atua como eletrófilo conforme ilustrado na Figura 4. (BEULA, S., et al, 2021; BRITO, V. et al, 2020).

Figura 4: Esquema geral da MBHR envolvendo derivados da isatina como substrato.



Fonte: Elaborado pela autora

A atividade biológica de adutos da reação Morita-Baylis-Hillman derivados da isatina já foi constatada diante de organismos vivos, exemplificado pela ação antituberculosa frente ao *Micobacterium tuberculosis*. Tal como a atividade anti-inflamatória através da redução de citocinas como as interleucinas 1 β e 6 e do TNF- ∞ (DE FRANÇA, J.S. et al, 2021; REDDY & RAO, 2018).

Em relação a atividade antitumoral, já é de conhecimento da comunidade científica a ação citotóxica *in vitro* desses adutos diante de linhagens celulares leucêmicas (HL60 e K562) e de câncer de pulmão (NCI-H292) (BRITO, V. et al, 2020; LIMA-JUNIOR, C. G. et al, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Este estudo teve como objetivo identificar a citotoxicidade e indução de apoptose de adutos da reação Morita-Baylis-Hillman derivados da isatina frente a linhagens de células tumorais.

3.2. Específicos

- Avaliar a resposta tempo-dependente dos adutos.
- Avaliar as alterações morfológicas.
- Avaliar a atividade indutora de apoptose.

4. REFERÊNCIAS

AGUILAR-CAZARES, Dolores et al. Contribution of angiogenesis to inflammation and cancer. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 1399, 2019.

ALVAREZ-PAGGI, Damián et al. Multifunctional cytochrome c: learning new tricks from an old dog. **Chemical reviews**, v. 117, n. 21, p. 13382-13460, 2017.

ANKATHIL, Ravindran et al. Clinical implications of conventional cytogenetics, fluorescence in situ hybridization (FISH) and molecular testing in chronic myeloid leukaemia patients in the tyrosine kinase inhibitor era-A review. **The Malaysian Journal of Pathology**, v. 42, n. 3, p. 307-321, 2020.

ARRIGONI, Elena et al. Concise review: chronic myeloid leukemia: stem cell niche and response to pharmacologic treatment. **Stem cells translational medicine**, v. 7, n. 3, p. 305-314, 2018.

ASIF, Muhammad et al. A Novel four-way complex variant translocation involving chromosome 46, XY, t (4; 9; 19; 22)(q25: q34; p13. 3; q11. 2) in a chronic myeloid leukemia patient. **Frontiers in oncology**, v. 6, p. 124, 2016.

AZAD, Niyaz A. et al. Real-time quantitative PCR: a reliable molecular diagnostic and follow-up tool for 'minimal residual disease'assessment in chronic myeloid leukemia. **Bioscience reports**, v. 38, n. 5, p. BSR20180974, 2018.

BEULA, S. Janet et al. A review an Isatin, Isatin derivatives and their pharmacological activity. **Research journal of Pharmacology and Pharmacodynamics**, v. 13, n. 2, p. 59-62, 2021.

BOCK, Florian J.; TAIT, Stephen WG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 21, n. 2, p. 85-100, 2020.

BONAVIGO, Andrei Gustavo. Comparação entre o diagnóstico citogenético e por biologia molecular das leucemias mieloides crônicas (LMC): uma revisão bibliográfica. **Brazilian Journal of Clinical Analyses**, v. 50, n. 2 supl 2, p. 47, 2018.

BRECCIA, Massimo et al. How many chronic myeloid leukemia patients who started a frontline second-generation tyrosine kinase inhibitor have to switch to a second-line treatment? A retrospective analysis from the monitoring registries of the italian medicines agency (AIFA). **Cancer medicine**, v. 9, n. 12, p. 4160-4165, 2020.

BRITO, Vinicius BM et al. Synthesis, anti-proliferative activity, theoretical and ¹H NMR experimental studies of Morita–Baylis–Hillman adducts from isatin derivatives. **Molecular diversity**, v. 24, n. 1, p. 265-281, 2020.

CARNEIRO, Benedito A.; EL-DEIRY, Wafik S. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 17, n. 7, p. 395-417, 2020.

CHEN, Qi; KANG, Jian; FU, Caiyun. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2018.

CHIANG, Serena PH; CABRERA, Ramon M.; SEGALL, Jeffrey E. Tumor cell intravasation. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 311, n. 1, p. C1-C14, 2016.

CORTES, Jorge E. A second-generation TKI should always be used as initial therapy for CML. **Blood advances**, v. 2, n. 24, p. 3653-3655, 2018.

D'ARCY, Mark S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell biology international**, v. 43, n. 6, p. 582-592, 2019.

DE FRANÇA, Juliane Santos et al. Morita-Baylis-Hillman Adduct 2-(3-Hydroxy-2-oxoindolin-3-yl) acrylonitrile (ISACN) Modulates Inflammatory Process In vitro and In vivo. **Inflammation**, v. 44, n. 3, p. 899-907, 2021.

DE LA VEGA, Montserrat Rojo; CHAPMAN, Eli; ZHANG, Donna D. NRF2 and the hallmarks of cancer. **Cancer cell**, v. 34, n. 1, p. 21-43, 2018.

DHURIYA, Yogesh K.; SHARMA, Divakar. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. **Journal of neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2018.

DN, Meenakshi Sundaram et al. Current outlook on drug resistance in chronic myeloid leukemia (CML) and potential therapeutic options. **Drug discovery today**, v. 24, n. 7, p. 1355-1369, 2019.

DORFMAN, Luiza Emy et al. The role of cytogenetics and molecular biology in the diagnosis, treatment and monitoring of patients with chronic myeloid leukemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 54, p. 83-91, 2018.

FARES, Jawad et al. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-17, 2020.

FOUAD, Yousef Ahmed; AANEI, Carmen. Revisiting the hallmarks of cancer. **American journal of cancer research**, v. 7, n. 5, p. 1016, 2017.

GAJSKI, Goran et al. Evaluation of oxidative stress responses in human circulating blood cells after imatinib mesylate treatment—Implications to its mechanism of action. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 8, p. 1216-1221, 2019.

GONG, Yitao et al. The role of necroptosis in cancer biology and therapy. **Molecular cancer**, v. 18, n. 1, p. 1-17, 2019.

GUDIMETLA, Kiranmai; PRABHAKAR, Orsu; PAL, Abhisek. Review on Pathophysiological and Pharmacotherapeutic approach on Chronic Myeloid Leukemia. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 13, n. 6, p. 2971-2976, 2020.

HATA, Aaron N.; ENGELMAN, Jeffrey A.; FABER, Anthony C. The BCL2 family: key mediators of the apoptotic response to targeted anticancer therapeutics. **Cancer discovery**, v. 5, n. 5, p. 475-487, 2015.

HAZNEDAROĞLU, İbrahim C.; KUZU, Işinsu; İLHAN, Osman. WHO 2016 definition of chronic myeloid leukemia and tyrosine kinase inhibitors. **Turkish Journal of Hematology**, v. 37, n. 1, p. 42, 2020.

HEHLMANN, Rüdiger. Chronic myeloid leukemia in 2020. **Hemasphere**, v. 4, n. 5, 2020.

HOCHHAUS, Andreas et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 34, n. 4, p. 966-984, 2020.

HOUSHMAND, Mohammad et al. Chronic myeloid leukemia stem cells. **Leukemia**, v. 33, n. 7, p. 1543-1556, 2019.

INCA. Brasil: estimativa dos casos novos, 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>>. Acesso em: 25 de jul. de 2021.

JABBOUR, Elias; KANTARJIAN, Hagop. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. **American journal of hematology**, v. 93, n. 3, p. 442-459, 2018.

JINNA, Sruthi; KHANDHAR, Paras B. Hydroxyurea Toxicity. 2019.

KANTARJIAN, Hagop et al. Chronic myeloid leukemia. **Molecular Hematology**, p. 71-86, 2019.

KARCH, Jason et al. Autophagic cell death is dependent on lysosomal membrane permeability through Bax and Bak. **Elife**, v. 6, p. e30543, 2017.

KREUZALER, Peter et al. Adapt and conquer: Metabolic flexibility in cancer growth, invasion and evasion. **Molecular metabolism**, v. 33, p. 83-101, 2020.

KESAVARDHANA, Sannula; MALIREDDI, RK Subbarao; KANNEGANTI, Thirumala-Devi. Caspases in cell death, inflammation, and pyroptosis. **Annual review of immunology**, v. 38, p. 567-595, 2020.

KHALID, Nabeeha; AZIMPOURAN, Mahzad. Necrosis. **StatPearls [Internet]**, 2020

KNIGHT, Thomas G.; GRUNWALD, Michael R.; COPELAN, Edward A. Chronic myeloid leukemia (CML). In: **Concise Guide to Hematology**. Springer, Cham, 2019. p. 313-322.

KOCZKODAJ, Dorota et al. Prognostic significance of isochromosome 17q in hematologic malignancies. **Oncotarget**, v. 12, n. 7, p. 708, 2021.

KREUZALER, Peter et al. Adapt and conquer: Metabolic flexibility in cancer growth, invasion and evasion. **Molecular metabolism**, v. 33, p. 83-101, 2020.

LANGE, Thoralf et al. No advantage of Imatinib in combination with hydroxyurea over Imatinib monotherapy: a study of the East German Study Group (OSHO) and the German CML study group. **Leukemia & Lymphoma**, v. 61, n. 12, p. 2821-2830, 2020.

LIMA-JUNIOR, C. G. et al. Synthesis, cytotoxic activity on leukemia cell lines and quantitative structure-activity relationships (QSAR) studies of Morita-Baylis-Hillman adducts. **Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 602-612, 2016.

LINEV, Alexandar J. et al. Mutations Associated with Imatinib Mesylate Resistance-Review. **Folia Med (Plovdiv)**, v. 60, n. 4, p. 617-23, 2018.

LIU, Zhen et al. Mechanism and reactivity in the Morita–Baylis–Hillman reaction: the challenge of accurate computations. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 19, n. 45, p. 30647-30657, 2017.

MAJI, Kakoli; RAI, Pramod; MAJI, Biplab. Visible-Light Mediated Metal-Free Cross-Electrophile Coupling of Isatin Derivatives with Electron-Poor Alkenes. **Asian Journal of Organic Chemistry**, 2021.

MASSAGUÉ, Joan; OBENAU, Anna C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 298-306, 2016.

MOLICA, Matteo; MASSARO, Fulvio; BRECCIA, Massimo. Diagnostic and prognostic cytogenetics of chronic myeloid leukaemia: an update. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 17, n. 11, p. 1001-1008, 2017.

MORITA, Kiyomi; SASAKI, Koji. Current status and novel strategy of CML. **International journal of hematology**, p. 1-8, 2021.

OGASAWARA, Atsushi et al. A simple screening method for the diagnosis of chronic myeloid leukemia using the parameters of a complete blood count and differentials. **Clinica Chimica Acta**, v. 489, p. 249-253, 2019.

OMS. Cancer Tomorrow, 2021: estimated number of new cases from 2020 to 2040. Disponível em <<https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/tables?mode=population>>. Acesso em 25 de jul. de 2021.

PATEL, Raj; TADI, Prasanna. Busulfan. **StatPearls [Internet]**, 2021.

PELLISSIER, Helene. Recent developments in the asymmetric organocatalytic Morita–Baylis–Hillman reaction. **Tetrahedron**, v. 73, n. 20, p. 2831-2861, 2017.

PFEFFER, Claire M.; SINGH, Amareshwar TK. Apoptosis: a target for anticancer therapy. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 448, 2018.

REDDY, Thatikonda Narendar; RAO, Vaidya Jayathirtha. Importance of Baylis-Hillman adducts in modern drug discovery. *Tetrahedron letters*, v. 59, n. 30, p. 2859-2875, 2018.

RUSSO, Domenico et al. Chronic myeloid leukemia prognosis and therapy: criticisms and perspectives. 2020.

SACHET, Monika; LIANG, Ying Yu; OEHLER, Rudolf. The immune response to secondary necrotic cells. **Apoptosis**, v. 22, n. 10, p. 1189-1204, 2017.

SAGLIO, Giuseppe; JABBOUR, Elias. First-line therapy for chronic phase CML: selecting the optimal BCR-ABL1-targeted TKI. **Leukemia & lymphoma**, v. 59, n. 7, p. 1523-1538, 2018.

SAKAI, Hiroharu et al. BRAP2 inhibits the Ras/Raf/MEK and PI3K/Akt pathways in leukemia cells, thereby inducing apoptosis and inhibiting cell growth. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 21, n. 5, p. 1-11, 2021.

SAMPAIO, Mariana Miranda et al. Chronic myeloid leukemia-from the Philadelphia chromosome to specific target drugs: A literature review. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 12, n. 2, p. 69, 2021.

SHARMA, Aditi; BOISE, Lawrence H.; SHANMUGAM, Mala. Cancer metabolism and the evasion of apoptotic cell death. **Cancers**, v. 11, n. 8, p. 1144, 2019.

SHOLIKAH, Tri Agusti. Fusion gene bcr-abl: From etiopathogenesis to the management of chronic myeloid leukemia. **Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia**, v. 8, n. 1, p. 29-37, 2017.

SINGH, Priyanka et al. Combating TKI resistance in CML by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway in combination with TKIs: a review. **Medical Oncology**, v. 38, n. 1, p. 1-16, 2021.

STRILIC, Boris; OFFERMANN, Stefan. Intravascular survival and extravasation of tumor cells. **Cancer Cell**, v. 32, n. 3, p. 282-293, 2017.

SULKOWSKI, Parker L. et al. Oncometabolites suppress DNA repair by disrupting local chromatin signalling. **Nature**, v. 582, n. 7813, p. 586-591, 2020.

SULLIVAN, Lucas B.; GUI, Dan Y.; VANDER HEIDEN, Matthew G. Altered metabolite levels in cancer: implications for tumour biology and cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 11, p. 680, 2016.

TAN, Fiona H. et al. Ponatinib: a novel multi-tyrosine kinase inhibitor against human malignancies. **OncoTargets and therapy**, v. 12, p. 635, 2019.

TUMMERS, Bart; GREEN, Douglas R. Caspase-8: regulating life and death. **Immunological reviews**, v. 277, n. 1, p. 76-89, 2017.

WANG, Wei et al. Clinical and prognostic significance of 3q26. 2 and other chromosome 3 abnormalities in CML in the era of tyrosine kinase inhibitors. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 126, n. 14, p. 1699-1706, 2015.

YANG, Jing et al. Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 21, n. 6, p. 341-352, 2020.

ZEESHAN, Rabia; MUTAHIR, Zeeshan. Cancer metastasis-tricks of the trade. **Bosnian journal of basic medical sciences**, v. 17, n. 3, p. 172, 2017.

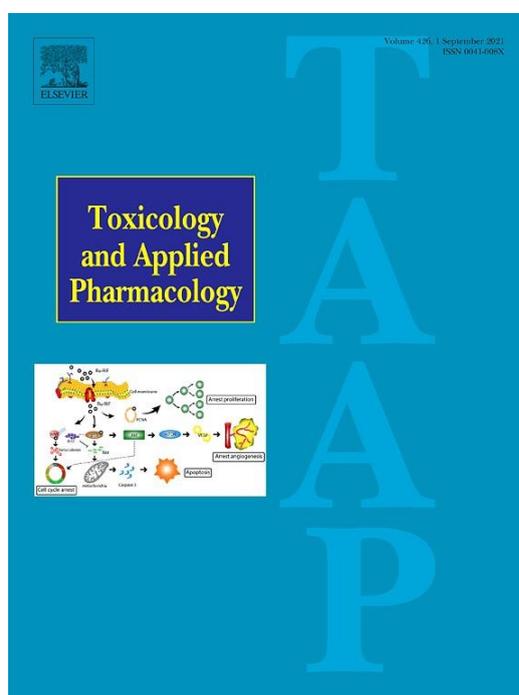
ZHOU, Ting; MEDEIROS, L. Jeffrey; HU, Shimin. Chronic myeloid leukemia: beyond BCR-ABL1. **Current hematologic malignancy reports**, v. 13, n. 6, p. 435-445, 2018

5. ARTIGO

Avaliação da citotoxicidade e da indução de apoptose de adutos de isatina derivados da reação Morita-Baylis-Hillman

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO

“Toxicology and applied Pharmacology”



Fator de impacto: 4.219

Instruções para autores:

<https://www.elsevier.com/journals/toxicology-and-applied-pharmacology/0041-008X/guide-for-authors>

Avaliação da citotoxicidade e da indução de apoptose de adutos da reação Morita-Baylis-Hillman derivados da isatina em células tumorais

SOUZA, J.L.C¹, LIMA-JUNIOR, C.G.², MILITAO, G.C.G¹

¹ Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

² Departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

ABSTRACT

Nowadays, antitumor therapy faces challenges due to tumor resistance to the drug development, as well as several unwanted side effects, urging the search for most active and selective compounds. In this context, the MBHR proved to be promising as a source of bioactives molecules, among which, isatin-derivatives adducts showed cytotoxicity against cancer cells. In this work we sought to identify the cytotoxic activity of 21 isatin-derivatives against tumor lineages, in which the most promising ones were tested in PBMC. The IC50s after 72h for tumor cells of the most cytotoxic adducts ranged between 0.044 μ M and 29.25 μ M, while in PBMC it ranged from 2.75 μ M to 19.25 μ M. The following experiments were performed with the most active and selective adducts in K562 lineage: MBH 6 and MBH 9. In the trypan blue exclusion test it was found that the MBH 9 adduct has a later response compared to MBH 6. The morphological changes analyzed showed indications of chromatin condensation in cells treated with MBH 6 in the first 24h of treatment, it was intensified over time for both adducts. Was observed by citometry assays, significant DNA fragmentation and reduction in cell proliferation in both adducts. Western Blot assays allowed the observation of a reduction ($p < 0.05$) of MCL-1, BCL-XL and of total Caspase-3 in cells treated with MBH 6 and MBH 9, suggesting that these adducts are apoptosis inducers in K562.

Introdução

O câncer, a segunda causa de morte no mundo, consiste em doenças que podem acometer quase qualquer órgão e apresentam em comum o crescimento desordenado de células com a capacidade de invadir tecidos adjacentes bem como se espalhar para órgãos distantes do sítio de origem. Espera-se até o ano de 2025 um aumento de cerca de 12,5% dos casos de câncer confirmados no mundo (OMS, 2021).

A leucemia mieloide crônica (LMC) consiste em um câncer que acomete o tecido hematopoiético causada a partir da formação do cromossomo Filadélfia (Ph) e, conseqüentemente do gene de fusão BCR-ABL responsável pela codificação da p210, sendo esta, uma marca registrada a LMC, por ser encarregada pela ativação constitutiva da tirosina quinase e, conseqüentemente, da expansão do clone leucêmico. (HOUSHMAND, M. et al, 2019). Atualmente, diversos inibidores de tirosina quinase são aprovados para o uso na clínica e a escolha do fármaco se dá individualmente de acordo com a eficácia, tolerância, toxicidade e custos de acordo com cada paciente (HOCHHAUS, A. et al, 2020) , entretanto o surgimento de resistência à terapêutica desses fármacos causada por diversos mecanismos desde a instabilidade genética medida pelo gene de fusão como o torna urgente busca por novos compostos bioativos capazes de combater essa patologia (TALATI e PINILLA-IBARZ, 2018). Nesse contexto, a reação Morita-Baylis-Hillman surge como uma fonte de compostos bioativos de suma relevância na terapia antitumoral, pois já é descrito na literatura que a formação de ligações carbono-carbono apresentam-se como uma das mais importantes e poderosas ferramentas na química orgânica moderna e essa reação baseia-se na formação de estruturas moleculares altamente funcionalizadas a partir da ligação entre um alceno e um aldeído ou imina, através da ação catalisadora de uma amina terciária ou fosfina. Nesta reação, a isatina (indol-2,3-diona) - uma molécula amplamente conhecida como precursora de agentes indutores de apoptose, antivirais, anticonvulsivantes e até mesmo com atividade antitumoral - atua como grupo aceptor de elétrons e neste trabalho buscamos avaliar a citotoxicidade de adutos de isatina derivados da reação Morita-Baylis-Hillman (MEDVEV, A. et al, 2018; BRITO, V. et al, 2020).

Materiais e métodos

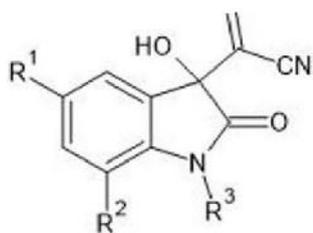
Célula tumoral e tratamento

Foram utilizadas as linhagens tumorais MCF-7 (carcinoma de mama), HEP-2 (carcinoma de laringe), NCIH 292 (carcinoma de pulmão), HepG2 (carcinoma hepatocelular), K562 (leucemia mieloide crônica) e HL60 (leucemia promielocítica) obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro e cultivadas em meio RPMI 1640 ou DMEN, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Obtenção dos adutos derivados da reação Morita-Baylis-Hillman

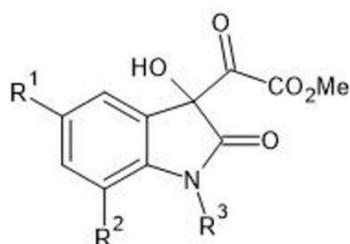
Os adutos testados foram sintetizados no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM-PB) do Departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba sob responsabilidade do Prof. Dr. Claudio Gabriel Lima Junior. Os códigos e as estruturas químicas dos MBHAs podem ser observados nas Figuras 1, 2 e 3.

Figura 1: Estrutura química dos adutos 1-9



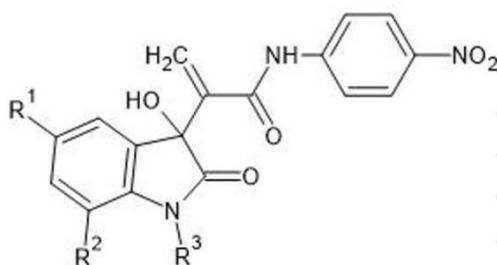
	R ¹	R ²	R ³
MBH 1	H	H	H
MBH 2	H	H	CH ₃
MBH 3	H	H	alil
MBH 4	NO ₂	H	H
MBH 5	NO ₂	H	CH ₃
MBH 6	NO ₂	H	alil
MBH 7	Cl	Cl	H
MBH 8	Cl	Cl	CH ₃
MBH 9	Cl	Cl	alil

Fonte: Elaborado pela autora

Figura 2: Estrutura química dos adutos 10-17

	R ¹	R ²	R ³
MBH 10	H	H	H
MBH 11	H	H	CH ₃
MBH 12	H	H	alil
MBH 13	NO ₂	H	H
MBH 14	NO ₂	H	CH ₃
MBH 15	NO ₂	H	alil
MBH 16	Cl	Cl	H
MBH 17	Cl	Cl	CH ₃

Fonte: Elaborado pela autora

Figura 3: Estrutura química dos adutos 25-30

	R ¹	R ²	R ³
MBH 25	H	H	CH ₃
MBH 26	Cl	Cl	CH ₃
MBH 27	H	H	alil
MBH 30	Cl	Cl	alil

Fonte: Elaborado pela autora

Avaliação da citotoxicidade em células tumorais

A análise da citotoxicidade foi efetuada pelo método do 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT). As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 cél/mL e tratadas com o composto por 72 horas. Três horas antes de completar o período de incubação, 25 μ L da solução estoque (5 mg/mL) de MTT foi adicionado em cada poço. Após 3 horas, o sobrenadante foi retirado e o precipitado

resultante foi dissolvido em 100 μ L de DMSO e lido em espectrofotômetro de placa na absorvância de 575nm.

Avaliação da atividade citotóxica em células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) pelo método do MTT

Para esse ensaio foram utilizadas células mononucleadas de sangue periférico humano (CMSP). A coleta do sangue periférico humano foi conduzida de acordo com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e aprovada pelo Comitê de Ética em Pessoas (CEP-UFPE) sob número de registro 16767119.6.0000.5208.

Foram utilizadas seringas de 10 mL estéreis e descartáveis. Voluntários adultos saudáveis foram escolhidos na faixa etária de 18 a 30 anos, sem histórico de doenças recentes, não fumante ou etilista, sem exposição recente a radiações ou a medicamentos.

As células mononucleadas foram obtidas do sangue periférico após centrifugação em gradiente de Ficoll. As células foram lavadas com tampão fosfato e ressuspendidas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina, 100 μ g/mL estreptomicina para uma concentração final de final 3×10^5 células/mL. Fitohemaglutinina (3%) foi adicionada para induzir a proliferação dos linfócitos. Após 24 horas de incubação, os compostos foram adicionados em diferentes concentrações e as células incubadas em estufa por 72h. Três horas antes de completar o período de incubação, 25 μ L da solução estoque (5 mg/mL) de MTT foi adicionado em cada poço. Após 3 horas, o sobrenadante foi. O precipitado resultante foi dissolvido em 100 μ L de DMSO e lido em espectrofotômetro de placa a 575nm.

Análise da viabilidade celular pelo teste de exclusão por azul de Tripán

O teste de exclusão por azul de Tripán permite a quantificação das células viáveis e das células mortas após o período de incubação com a substância testada. Este método se baseia no princípio de que o corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o azul de tripan para fora, sendo possível desta forma, observar uma coloração azulada nas células mortas enquanto que as células vivas ficam translúcidas.

Células tumorais em suspensão, na concentração de 3×10^5 células/mL foram incubadas por 24h, 48h e 72h com a substância testada e examinadas ao microscópio de inversão. A concentração utilizada foi estimada a partir do valor da CI50 encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular. Foram retirados 90 μ L da suspensão de células e adicionados 10 μ L do azul de tripan (tripan a 10%). As células viáveis e as não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer. A Doxorrubicina foi usada como controle positivo

Análise de alterações morfológicas através da coloração por May-Grunwald-Giemsa

A coloração por May-Grunwald-Giemsa baseia-se em interações eletrostáticas entre os corantes e moléculas-alvo. Essa coloração possui azul de metileno (corante básico), eosina (corante ácido), entre outros componentes básicos que permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma.

Células K562 foram plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ e tratadas nas concentrações de 8 μ M e 16 μ M do MBH 6 e de 6 μ M e 12 μ M do MBH 9 por 24, 48 e 72h. Para observar a morfologia das células, lâminas foram preparadas, com 50 μ L da suspensão de células tratadas com os compostos testados, em citocentrífuga (Cytospin®) e fixadas com metanol 100% por 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram coradas com May-Grunwald, por 10 segundos, e em seguida com Giemsa por 10 segundos.

Análise em Citometria de Fluxo

Todas as análises foram realizadas no citômetro Accuri C6®, da Plataforma Multiusuário do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT-UFPE). Cinco mil eventos foram contabilizados em cada experimento e os debris celulares foram omitidos das análises. Os resultados dos experimentos serão expressos como média \pm S.E.M. de experimentos independentes ($n = 3$). Possíveis diferenças significativas serão calculadas por análise de variância (ANOVA) seguida de Dunnet ($P < 0.05$), usando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

Análise da Fragmentação de DNA e do Ciclo Celular Através da Citometria de Fluxo

Esse método consiste na capacidade do iodeto de propídeo (PI) se ligar ao DNA das células cuja membrana plasmática foi primeiramente permeabilizada por um detergente (triton X-100) para permitir a entrada do corante no núcleo. Após 24 h de tratamento, uma alíquota de 1 mL foi retirada da suspensão de células, centrifugadas a 200 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi retirado e foi adicionada ao pellet 500µL de uma solução de lise contendo PI 20 µg/mL, 0,1 % de citrato de sódio e 0.1 % de triton X-100. Após 30 min de incubação protegido de luminosidade, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo no filtro vermelho, onde foram obtidos histogramas representando a quantidade de células com DNA fragmentado e o ciclo celular.

Ensaio de Western Blot (WB)

Para este ensaio foram utilizados os seguintes anticorpos primários: MCL-1 (Cell Signaling Technology), BCL-XL (Cell Signaling Technology), Caspase-3 (Cell Signaling Technology) e β-actina (controle) (Sigma Aldrich).

As células tumorais foram plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ em garrafas de 5mL, foi aguardada uma confluência entre 70 e 80% para que então fossem tratadas com as amostras testadas por 24h antes da extração de proteínas totais. O sobrenadante das células foi retirado, lavado com PBS e foi adicionado o tampão RIPA 1X acrescido de um coquetel com inibidores de proteases ver detalhes (1:100 v/v), ortovanadato de sódio (1:100 v/v) e PMSF (1:100 v/v). Ao final da incubação, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante foi coletado, alíquotado e armazenado a -80 °C, e a quantificação das proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford. Na montagem do sistema vertical o gel de resolução foi confeccionado para uma concentração final de 12,5% de poliacrilamida. De cada amostra, 40µg de proteína total carregada com o tampão Blue Juice 5X foi aplicado nos poços do gel de concentração. O marcador de peso molecular usado será o Full-Range Rainbow Marker (12 – 225 kDa; GE Healthcare). A corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 100 V e 30 mA à temperatura ambiente. As proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (GE Healthcare). Com a realização de alguns procedimentos, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário

acoplado à enzima peroxidase, seguindo-se da revelação usando ECL Western Blotting (GE healthcare).

Resultados

1. Atividade citotóxica dos adutos da reação Morita-Baylis-Hillman

Inicialmente, foram avaliadas as concentrações inibitórias de 50% (CI₅₀), ou seja, a concentração do aduto capaz de inibir o crescimento de 50% das células de 21 adutos em seis linhagens de células tumorais: MCF-7, HEP-2, HEPG2, NCI H292, HL60 e K562. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

Dentre os adutos testados, 8 apresentaram uma atividade citotóxica satisfatória (<20µM) em pelo menos quatro das seis linhagens tumorais testadas, são eles os MBHs 1, 2, 3,5, 6, 7, 8 e 9. Por isso, foram determinadas as CI₅₀ desses adutos em células mononucleares do sangue periférico (Tabela 1).

Tabela 1: Citotoxicidade de 21 adutos após 72h em células tumorais e em CMSP em µM

	MCF-7	HEP-2	NICIH292	HL60	HEP G2	K562	CMSP
MBH 01	6,0	3,4	2,40	3,60	17,45	23,55	19,25
	5,0-7,0	2,85-4,00	1,75-3,35	2,65-3,05	13,70 – 22,19	13,44- 41,27	14,58-25,41
MBH 02	11,59	4,06	5,05	1,77	29,25	11,10	14,72
	7,36- 18,86	3,27 – 5,05	4,67 – 6,31	3,70 – 5,19	22,99 -37,29	8,10- 15,22	11,03-19,63
MBH 03	4,20	2,33	3,42	1,83	19,58	8,17	2,75
	3,92 – 4,50	1,96 – 2,79	3,00 – 3,88	1,59 – 2,13	14,60 -25,88	5,65-12	1,96-3,83
MBH 04	>50	>50	>50	>50	>50	>50	NT
MBH 05	6,49	5,79	3,86	2,93	11,78	6,53	11,16
	5,95- 7,03	5,02-6,56	3,67-4,48	2,70 –3,17	9,34 – 14,83	3,6-11,77	8,57-14,48
MBH 06	6,88	5,96	3,51	0,048	8,04	6,57	13,54
	5,93 –8,04	4,91-7,37	3,26-4,21	0,036-0,063	6,28– 10,32	5,02-8,6	11,23-16,35
MBH 07	8,39	5,22	3,50	1,30	2,54	4,81	6,79
	6,82– 9,10	4,10-6,72	2,95-4,18	1,16- 1,45	2,09– 3,06	2,5-9,3	5,19-8,89
MBH 08	9,57	2,10	1,77	1,42	12,34	6,63	8,40
	8,65 –10,60	1,81–2,41	1,63-1,95	1,28-1,52	10,43-14,18	5,23-8,4	6,10-11,67
MBH 09	3,90	3,90	2,69	0,044	9,81	3,62	7,14
	3,27 -4,84	3,25-4,55	2,37-3,25	0,036-0,053	8,34-11,56	2,35-5,58	5,68- 8,96

MBH 10	>50	48,80	NT	27,51	>50	>50	NT
		40,30–59,06		21,67–34,98			
MBH 11	25,18	38,22	28,9	17,25	>50	>50	NT
	21,21–29,92	29,15–50,17	21,25–39,23	11,54–25,83			
MBH 12	18,02	32,42	45,20	16,08	>50	>50	NT
	12,60–25,82	26,04–40,40	40,59–50,37	12,93–20,00			
MBH 13	>50	>50	>50	>50	>50	>50	NT
MBH 14	34,25	21,37	20,34	6,27	48,70	>50	NT
	31,93–46,60	18,30–31,70	14,59–31,97	5,48–9,11	44,28–66,49		
MBH 15	7,55	30,72	20,22	5,42	40,89	22,49	NT
	5,50–10,37	24,94–37,83	15,82–25,85	4,34–6,76	33,84–49,43	16,27–31,08	
MBH 16	7,52	6,68	14,63	4,76	34,75	>50	NT
	5,35–10,60	5,55–8,04	12,19–17,54	3,92–5,75	27,14–44,45		
MBH 17	30,32	>50	43,90	4,20	31,08	>50	NT
	25,97–35,43		39,30–49,05	3,40–5,14	26,57–36,41		
MBH 25	>50	18,79	34,20	18,04	33,74	>50	NT
		12,49–29,24	27,82–42,07	12,66–27,72	17,75–64,07		
MBH 26	41,98	18,73	38,52	5,38	21,64	>50	NT
	36,41–48,36	11,87–26,60	31,21–47,55	3,43–8,42	12,91–50,82		
MBH 27	38,88	>50	13,92	5,49	33,09	>50	NT
	30,80–49,05		11,43–16,96	3,73–8,03	22,23–48,55		
MBH 30	>50	42,19	24,20	14,14	>50	>50	NT
		23,85–74,68	18,95–30,92	8,90–22,50			
DOX	0,37	1,3	0,55	0,11	0,6	0,24	1,4
	0,18–0,92	0,55–2,6	0,37–0,92	0,1–0,33	0,51–0,81	0,16–0,39	0,9–2,6

Os dados apresentados correspondem aos valores da CI50 (Concentração inibitória em 50%) em μM e seu respectivo intervalo de confiança de 95% obtidos por regressão não-linear através do programa Graphpad Prism através do método do MTT após 72h de incubação. Células tumorais: MCF-7 (carcinoma de mama); HEP2 (carcinoma de laringe); NCIH292 (carcinoma de pulmão humano); HL60 (leucemia promielocítica humana); HepG2 (carcinoma hepatocelular humano); K562 (leucemia mieloide crônica humana). Células não-tumorais: CMSP (células mononucleares do sangue periférico). Doxorrubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

Foi realizada uma relação entre as CI50 das células cancerígenas e das CMSP e assim estabelecido o índice de seletividade dos adutos pelas células tumorais e os resultados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Índice de seletividade dos MBHAs pelas células tumorais

	MCF-7	HEP-2	NCIH292	HL60	HEPG2	K562
MBH 1	3,2	5,66	8,02	5,35	1,1	0,82
MBH 2	1,27	3,63	2,91	8,31	0,5	1,33
MBH 3	0,65	1,18	0,8	1,5	0,14	0,34
MBH 5	1,72	1,93	2,89	3,81	0,95	1,71
MBH 6	1,97	2,27	3,86	282,08	1,68	2,06
MBH 7	0,81	1,3	1,94	5,22	2,67	1,41
MBH 8	0,88	4	4,75	5,92	0,68	1,27
MBH 9	1,83	1,83	2,65	162,27	0,73	1,97

O índice de seletividade foi obtido através da relação $CI50_{CMSP}/CI50_{CÉLULA\ TUMORAL}$

É possível observar que os adutos MBH 6 e MBH 9 foram os mais citotóxicos em todas as linhagens tumorais e, na linhagem HL60, chegou a apresentar um índice de seletividade pela célula tumoral de 282,02 (MBH 6) e 162,27 (MBH 9).

Levou-se em consideração que células K562 são mais resistentes quando comparadas à HL60 devido a mutações que conferem a essa linhagem uma ativação constitutiva da tirosina quinase e que, apesar disso, os adutos MBH 6 e 9 apresentaram uma boa atividade citotóxica com CI_{50} s de $6,57\mu M$ e $3,62\mu M$, respectivamente. Também foi constatado que o MBH 6 e 9 foram os adutos que apresentaram maiores índices de seletividade em células K562 e, por esses motivos, escolheu-se avaliar a citotoxicidade desses dois adutos na linhagem tumoral de leucemia mieloide crônica, K562.

2. Análise da viabilidade celular e da ação tempo-dependente

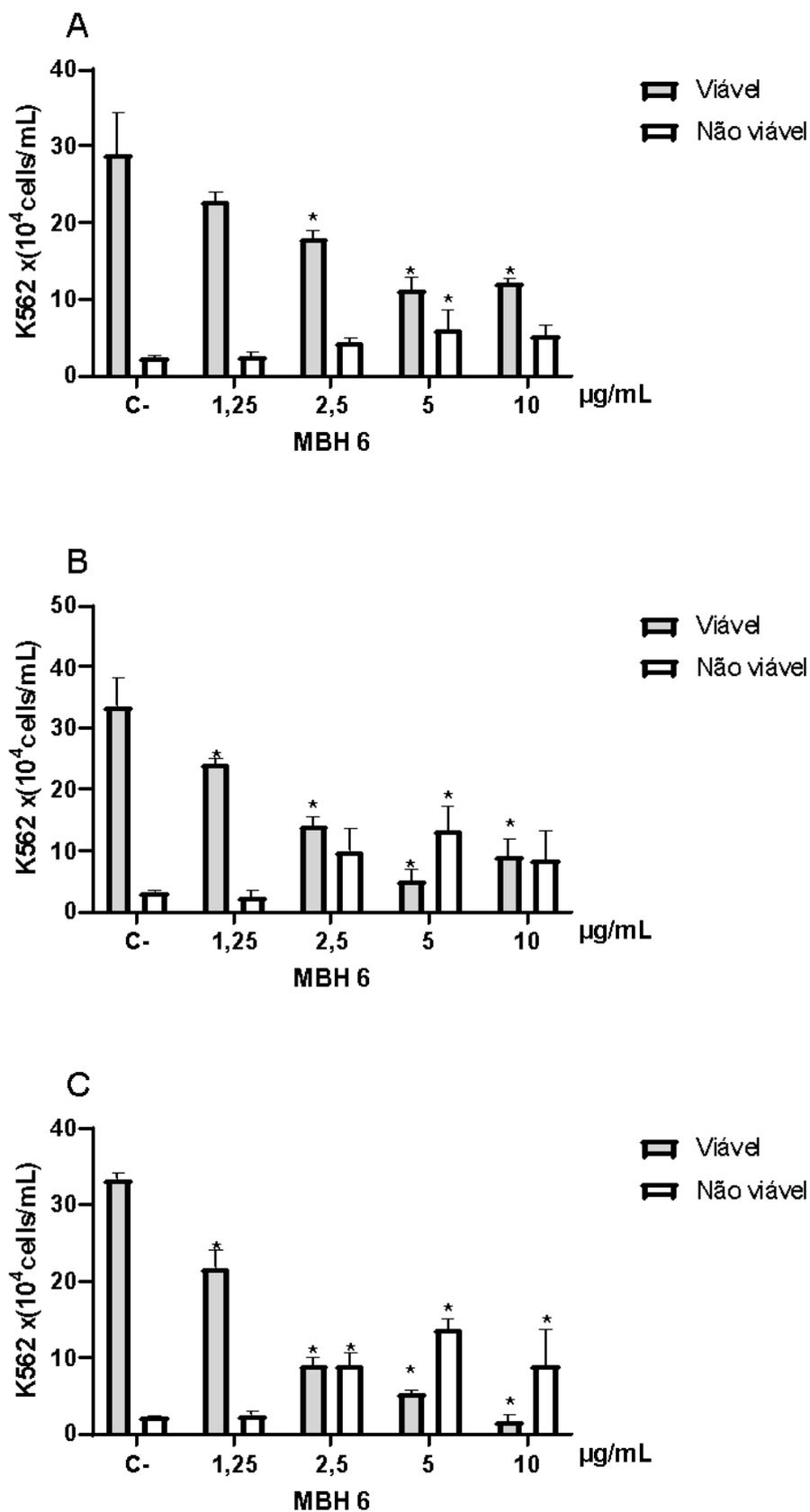
Para avaliar se os MBHAs apresentam uma resposta tempo-dependente foi realizado o Teste de Exclusão por Azul de Tripán nos tempos de 24, 48 e 72h e nas concentrações de $1,25\mu g/mL$, $2,5\mu g/mL$, $5\mu g/mL$ e $10\mu g/mL$. A partir desse teste foi possível observar que nas primeiras 24h, os dois adutos testados apresentaram uma redução significativa da viabilidade celular ($p < 0,05$) sendo possível observar uma redução de, aproximadamente, 58% da população de células viáveis na maior concentração testada do MBH 6 (Figura 4) e de 39% da

população tratada com o aduto MBH 9 (Figura 5) quando comparados aos seus respectivos controles negativos. Já no tempo de 48h, foi possível notar que na concentração de 1,25µg/mL, o MBH 6 reduziu a viabilidade de 28,7% das células enquanto a mesma concentração do MBH 9 levou a 51% de inibição. na concentração de 10µg/mL essa redução chegou a 79,5% no MBH 9 e 73% no MBH 6. Em 72h, constatou-se uma redução de, aproximadamente 64% de células viáveis na menor concentração testada, enquanto na maior, a redução de viabilidade foi de cerca de 95% nas células tratadas com MBH 6 e de 88% nas tratadas com MBH 9 (Figuras 4 e 5).

Esse experimento possibilitou a determinação das CI_{50} de forma direta nos três tempos testados. Nas primeiras 24 os valores obtidos desse parâmetro foram de 16,41µM (12,4 - 21,72) para o aduto MBH6 enquanto que o MBH 9 apresentou valores superiores a 20 µM. Já no tempo de 48h, pode-se constatar que a concentração necessária para eliminar 50% das células K562 foi de 7,46µM (5,47-10,16) do MBH 6 e 5,71µM (2,91-8,23) do MBH 9. Após 72h, esses valores foram de 5,8µM (5,15-6,54) e 1,98µM (1,34-2,59) para o MBH 6 e MBH 9, respectivamente.

Para os experimentos subsequentes, utilizamos as concentrações equivalentes aos valores das CI_{50} s de 48h, e o dobro da mesma, sendo assim o aduto MBH 6 avaliado nas concentrações de 8µM e 16µM, enquanto o MBH 9 foi testado nas concentrações de 6µM e 12µM.

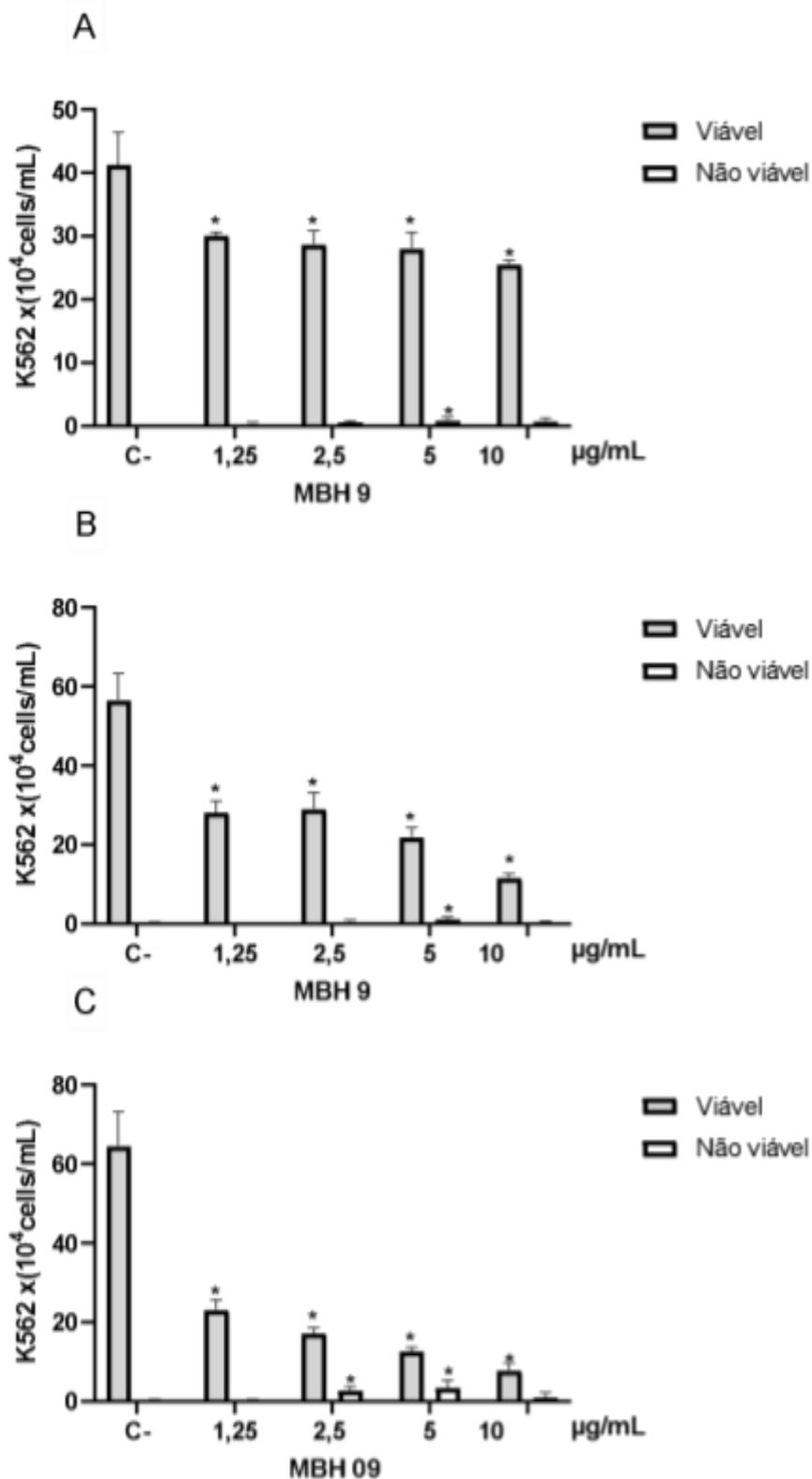
Figura 4: Viabilidade das células K562 após o tratamento com MBH6



Viabilidade celular determinada por coloração com azul de tripan em células K562 tratadas com o aduto MBH 6

durante 24h (A), 48h (B) e 72h (C). O controle negativo (C-) foi tratado apenas com o veículo (DMSO 0,1%) usado para diluir a substância testada. Os resultados apontados são correspondentes a média \pm S.E.M. * $p < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Dunnett

Figura 5: Viabilidade das células K562 após tratamento com MBH 9



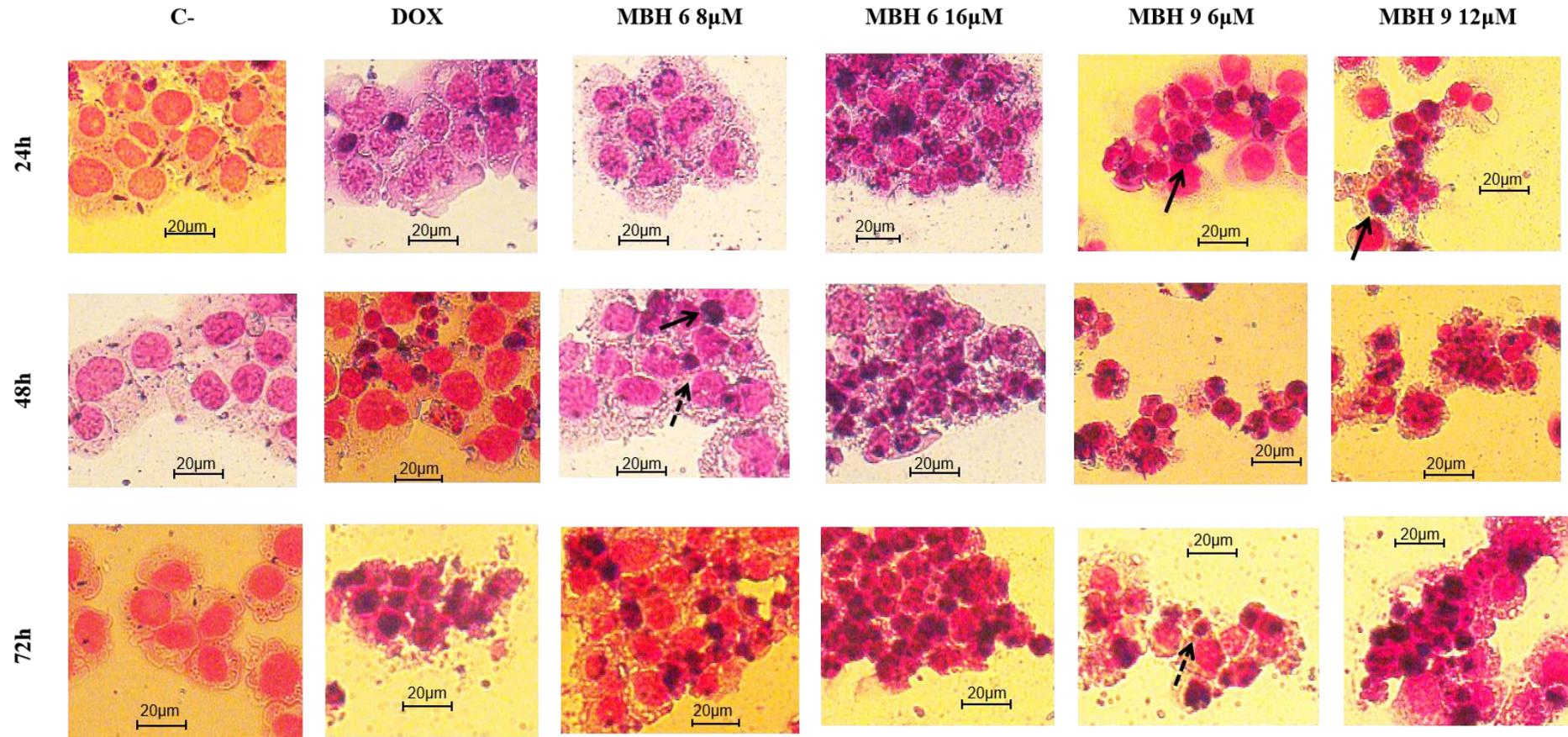
Viabilidade celular determinada por coloração com azul de tripan em células K562 tratadas com o aduto MBH 9 durante 24h (**A**), 48h (**B**) e 72h (**C**). O controle negativo (**C**-) foi tratado apenas com o veículo (DMSO 0,1%) usado para diluir a substância testada. Os resultados apontados são correspondentes a média \pm S.E.M. * $p < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Dunnet.

3. Análise das alterações morfológicas

A análise morfológica das células corrobora com os achados encontrados no Teste de Exclusão por Azul de Tripan, nesta, é possível observar que as lâminas de células K562 coradas com a coloração May-Grunwald-Giemsa após o período de incubação de 24h já apresentou pontos de fragmentação nuclear evidentes nas concentrações de do MBH 6 e de 12 μ M do MBH 9.

É importante destacar que as células que apresentaram essa alteração também evidenciaram uma redução em seu volume e que essas alterações foram se intensificando com o passar do tempo tanto nas maiores quanto nas menores concentrações de ambos adutos testados enquanto que no controle negativo, nos três períodos de tempo avaliados, foi possível observar diversas células com o núcleo em intérfase em forma redonda conforme ilustrado pela Figura 6.

Figura 6: Alterações morfológicas das células K562

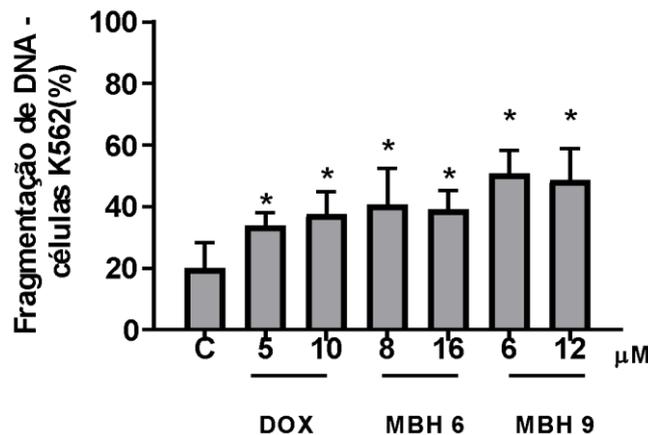


Análise microscópica de células K562 coradas com May-Grunwald-Giemsa após 24h, 48h e 72h de incubação com o aduto. O controle negativo (C-) foi tratado com o veículo usado para diluir as substâncias (DMSO 0,1%). Doxorubicina (DOX) 10 μ M foi utilizada como controle positivo. Setas: ↗ Fragmentação nuclear ↑ Núcleo picnótico.

4. Avaliação do conteúdo de DNA das células tratadas com os MBHAs

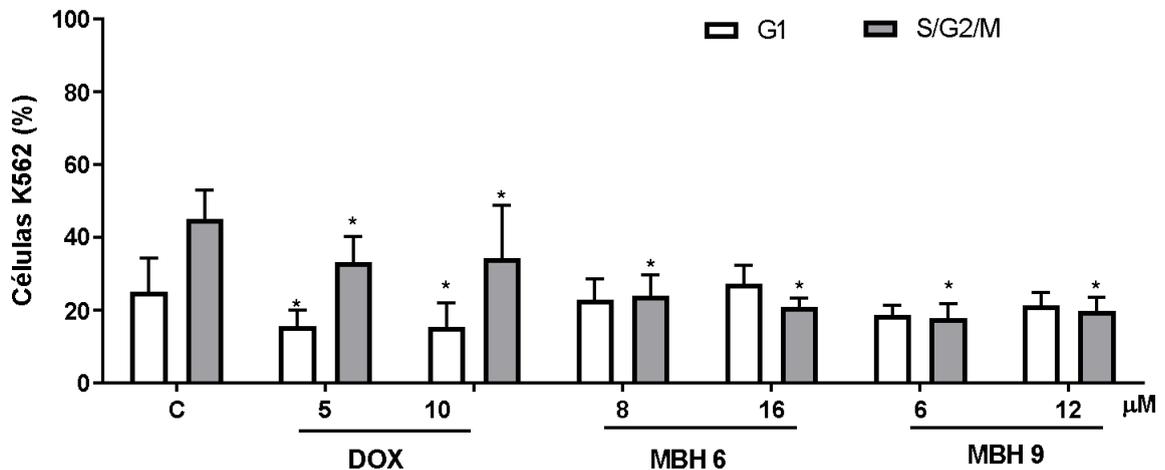
Nos ensaios realizados a partir da citometria de fluxo foi possível analisar a atividade citostática de MBHAs. Inicialmente, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) da fragmentação de DNA em todas as concentrações dos dois adutos testados, sendo o percentual de fragmentação cerca de 104% maior que o controle negativo na concentração de $8\mu\text{M}$ do aduto MBH 6 e um aumento de, aproximadamente, 95% nas células tratadas com $16\mu\text{M}$ do mesmo quando comparadas ao controle negativo. Já nas populações celulares tratadas com o aduto MBH 9, foi possível observar um aumento de 151% na concentração de $6\mu\text{M}$ e de 143% na concentração de $12\mu\text{M}$ (Figura 7).

Figura 7: Taxa de fragmentação de DNA em células K562



As células foram incubadas com o aduto testado durante 24h e a fragmentação de DNA foi analisada por citometria de fluxo utilizando-se o iodeto de propídeo (PI). O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo (DMSO 0,1%) usado para diluir a substância testada. Os resultados apontados são correspondentes a média \pm S.E.M. * $p < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Dunnet. Doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

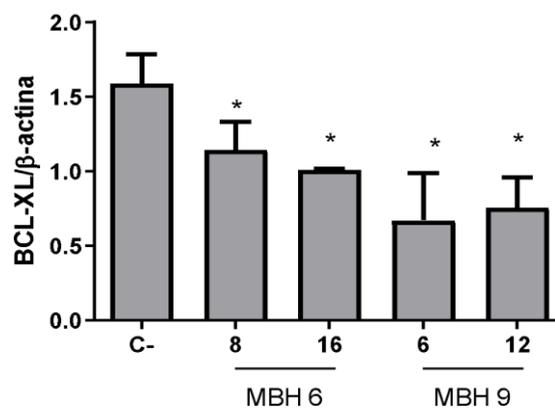
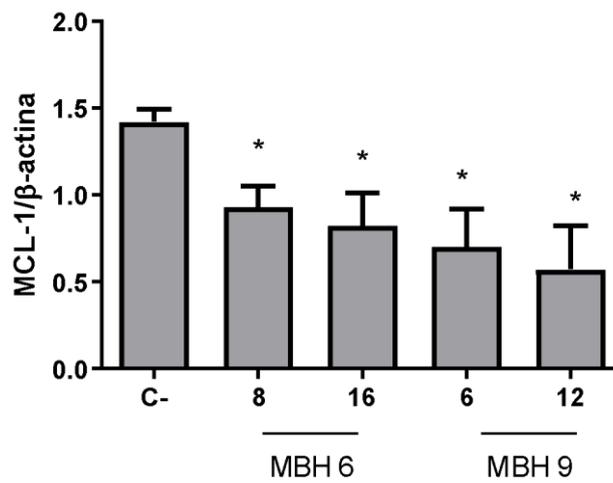
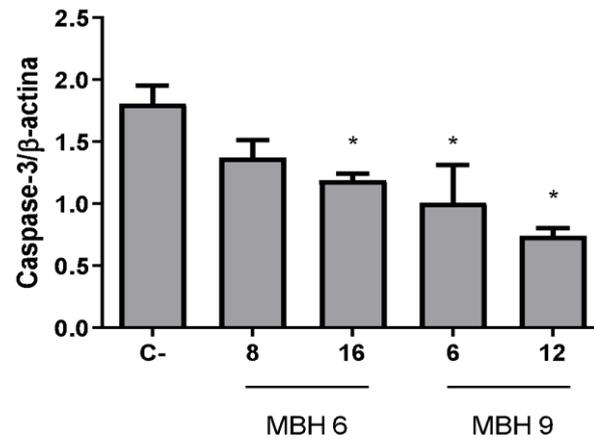
Através da análise do ciclo celular, não foi possível determinar a atuação direta dos adutos em alguma etapa específica do ciclo celular, no entanto, constatou-se a diminuição significativa da proliferação celular devido a diminuição significativa da população celular na fase S/G2/M nas concentrações de $8\mu\text{M}$ e de $16\mu\text{M}$ do aduto MBH 6 e de $9\mu\text{M}$ e $12\mu\text{M}$ do MBH 9 (Figura 8).

Figura 8: Ciclo celular analisado por citometria de fluxo

As células foram incubadas com o aduto testado durante 24h e o ciclo celular foi analisado por citometria de fluxo utilizando-se o iodeto de propídeo (PI). O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo (DMSO 0,1%) usado para diluir a substância testada. Doxorrubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo. Os resultados apontados são correspondentes a média \pm S.E.M. * $p < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Dunnet.

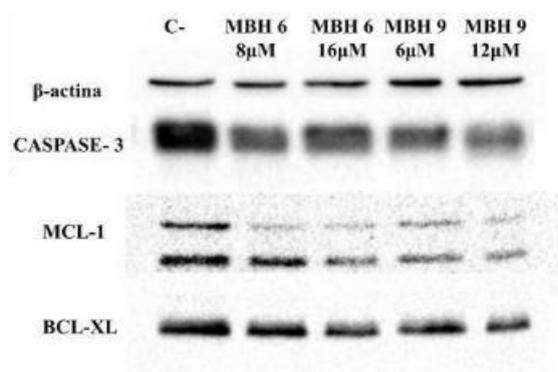
5. Avaliação da indução de apoptose

Os ensaios de Western Blotting foram realizados com o intuito de avaliar a indução de apoptose, através dos níveis de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas. Foi possível observar uma redução significativa ($p < 0,05$) na concentração da Caspase-3 total nas amostras tratadas com o aduto MBH 9 e nas que foram tratadas com 16μM do MBH 6. Também foram avaliadas nesses ensaios duas proteínas da família Bcl-2 que desempenham um papel anti-apoptótico: MCL-1 e BCL-XL, os resultados demonstram uma redução na concentração dessas moléculas nas amostras testadas com os dois adutos avaliados corroborando com a sugestão da indução de apoptose por parte deste MBHA (Figuras 9 e 10).

Figura 9: Relação entre a proteína alvo e a β -actina

As amostras analisadas em Western Blotting foram tratadas por 24h com os adutos MBH 6 e MBH 9 enquanto que o controle negativo (C-) foi tratado apenas com o veículo usado para diluir as substâncias (DMSO 1%). os dados quantificados são apresentados como a média \pm S.E.M da razão dos valores densitométricos entre as proteínas Caspase-3, MCL-1 e BCL-XL e a β -actina

Figura 10: Proteínas avaliadas na membrana de nitrocelulose



Western Blot com 40 μ g de proteína das células K562 tratadas por 24h com os adutos testados. Utilizou-se os anticorpos anti-caspase 3, anti-MCL-1, anti-BCL-XL e anti- β -actina (controle de massa)..

Discussão

Já é bem descrito na literatura que compostos heterocíclicos apresentam-se como uma ampla fonte de substâncias biológica e farmacologicamente ativas, a isatina é um exemplo importante desses precursores, pois sabe-se que é uma unidade farmacofórica de dois fármacos aprovados clinicamente para o tratamento do câncer: sunitinib e fosfato de toceranib (KAKKAR et al, 2019).

Assim como nesse trabalho, estudos anteriores já demonstraram atividade citotóxica de adutos de isatina provenientes da MBHR diante de células de leucemia promielocítica (HL60), de carcinoma de mama (MCF-7) e de leucemia mieloide crônica (K562), no entanto, quando comparados os resultados, os MBHAs testados no presente estudo se mostraram mais citotóxicos demonstrando uma CI50 de 3,9 μ M diante de células MCF-7, de 0,044 μ M em células HL60 e de 3,62 μ M em K562 do aduto mais ativo, MBH 9 enquanto que os descritos na literatura apresentaram CI50 de 61,1 μ M em MCF-7, de 7,8 μ M em HL60 e 43 μ M em K562 (LIMA-JUNIOR, C. G. et al, 2016).

Entre os adutos aqui testados, observou-se através do ponto de relação entre a estrutura química e a atividade dos compostos (SAR) que, aqueles que apresentavam na sua estrutura a porção nitrila foram mais ativas enquanto que os que possuíam a porção carboximetiléster, foram menos citotóxicos diante das linhagens tumorais avaliadas.

A fragmentação nuclear é a principal característica da apoptose, sendo utilizada como um marcador da indução desse tipo de morte celular (MAJTNEROVÁ e ROUŠAR, 2018), aqui foi possível observar esse indicador aumentado a partir das primeiras 24h através da análise de alterações morfológicas a partir da coloração por May-Grunwald-Giemsa bem como através de ensaios em citometria de fluxo, sugerindo a indução de apoptose em linhagem tumoral K562, com destaque para o aduto MBH 9, que se demonstrou mais citotóxico. A indução de morte pode também ser respaldada pela diminuição da proliferação celular devido a redução da população nas fases S/G2/M, quando comparadas ao controle negativo, indicando uma menor síntese de DNA, menor preparo para o evento mitótico e, conseqüentemente, uma redução de células em mitose, no entanto, por não terem promovido nenhuma parada em uma etapa específica do ciclo celular, sugerimos que a atuação desses adutos seja através de outro mecanismo ainda desconhecido.

Observou-se nas células submetidas ao tratamento com 6 μ M e 12 μ M do MBH 9 uma redução da caspase-3 total, bem como nas tratadas com 16 μ M do MBH 6 indicando sua clivagem. Sabe-se que para atuar na cascata apoptótica, esta proteína precisa ser clivada, no entanto, esse processo pode desempenhar um efeito anti ou pró-apoptótico (ZAMAREV, A, et al, 2017). De acordo com os resultados aqui obtidos, sugerimos que o efeito da clivagem da caspase-3 tenha culminado na ativação da apoptose, pois sabe-se que proteínas da família Bcl-2 possuem um papel central no controle da via intrínseca da apoptose através de alterações na permeabilidade da membrana externa mitocondrial e liberação do citocromo C, bem como já é descrito que proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 apresentam-se em maiores concentrações em diversos tipos de câncer, bem como que a super expressão dessas moléculas contribui tanto para o surgimento quanto para a progressão do tumor (HATA et. al, 2015). Estudos anteriores demonstraram que na leucemia mieloide crônica, a inibição de BCL-XL e de MCL-1, a partir de inibidores de tirosina quinase, culminou em um aumento de sobrevivência em modelos murinos (BATHIA, R, 2017), como nossos resultados demonstraram

uma redução significativa dessas proteínas nas células K562 tratadas com os adutos aqui testados, se faz possível sugerir o papel promissor destes derivados na terapia antileucêmica.

Agradecimentos

Os autores expressam seus agradecimentos aos colaboradores ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento da pesquisa.

Referências

BHATIA, Ravi. Novel approaches to therapy in CML. Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book, v. 2017, n. 1, p. 115-120, 2017.

BRITO, Vinicius BM et al. Synthesis, anti-proliferative activity, theoretical and ¹H NMR experimental studies of Morita–Baylis–Hillman adducts from isatin derivatives. Molecular diversity, v. 24, n. 1, p. 265-281, 2020.

HATA, Aaron N.; ENGELMAN, Jeffrey A.; FABER, Anthony C. The BCL2 family: key mediators of the apoptotic response to targeted anticancer therapeutics. Cancer discovery, v. 5, n. 5, p. 475-487, 2015.

HOCHHAUS, Andreas et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. Leukemia, v. 34, n. 4, p. 966-984, 2020.

HOUSHMAND, Mohammad et al. Chronic myeloid leukemia stem cells. Leukemia, v. 33, n. 7, p. 1543-1556, 2019.

KAKKAR, Rita et al. Isatin and its derivatives: a survey of recent syntheses, reactions, and applications. MedChemComm, v. 10, n. 3, p. 351-368, 2019.

LIMA-JUNIOR, C. G. et al. Synthesis, cytotoxic activity on leukemia cell lines and quantitative structure-activity relationships (QSAR) studies of Morita-Baylis-Hillman adducts. Medicinal Chemistry, v. 12, n. 7, p. 602-612, 2016.

MAJTNEROVÁ, Pavlína; ROUŠAR, Tomáš. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular biology reports*, v. 45, n. 5, p. 1469-1478, 2018.

MEDVEDEV, Alexei et al. Isatin, an endogenous nonpeptide biofactor: A review of its molecular targets, mechanisms of actions, and their biomedical implications. *BioFactors*, v. 44, n. 2, p. 95-108, 2018.

OMS. Cancer Tomorrow, 2021: estimated number of new cases from 2020 to 2040. Disponível em <<https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/tables?mode=population>>. Acesso em 25 de jul. de 2021.

TALATI, Chetasi; PINILLA-IBARZ, Javier. Resistance in chronic myeloid leukemia: definitions and novel therapeutic agents. *Current opinion in hematology*, v. 25, n. 2, p. 154-161, 2018.

ZAMARAIEV, Alexey V. et al. Post-translational modification of caspases: the other side of apoptosis regulation. *Trends in cell biology*, v. 27, n. 5, p. 322-339, 2017

6. CONCLUSÕES

MBHAs derivados da isatina se mostraram citotóxicos diante de seis linhagens tumorais. Diante da linhagem K562, os adutos MBH 6 e 9, foram os mais seletivos e, dentre estes, observou-se que a atividade do MBH 9 é mais tempo-dependente quando comparada ao MBH 6, no entanto, este aduto é mais eficiente na indução de apoptose nas primeiras 24h.

ANEXO I - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESSOAS (CEP-UFPE)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da citotoxicidade e da indução de apoptose em células tumorais de adutos de isatina da reação Morita-Baylis-Hillman

Pesquisador: JULIA LEITE CORDEIRO DE SOUZA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 16767119.6.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.556.026

Apresentação do Projeto:

O projeto "Avaliação da citotoxicidade e da indução de apoptose em células tumorais de adutos de isatina da reação Morita-Baylis-Hillman" trata-se de um projeto de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da UFPE, da mestrandia Júlia Leite Cordeiro de Souza, tendo como orientadora a profa. Gardenia Carmen Gadelha Militão, professora do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE. A reação Morita-Baylis-Hillman é fonte de diversos compostos com atividade biológica, incluindo atividade antitumoral. Dessa forma, o estudo proposto buscará, através de ensaios in vitro, avaliar a citotoxicidade em linhagens de células tumorais, bem como em células mononucleares do sangue periférico para que seja estabelecido o índice de seletividade do aduto pela célula tumoral.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral:

Avaliar a atividade citotóxica contra células tumorais de compostos derivados de isatina da reação Morita-Baylis-Hillman.

Objetivos específicos:

- Determinar a citotoxicidade in vitro dos compostos no painel de quatro linhagens tumorais.
- Avaliar a atividade citotóxica em células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) pelo

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.556.026

método do MTT.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

As medidas de segurança adotadas serão a lavagem de mãos e utilização de equipamentos de proteção individual pelo coletor, como luva, máscara e jaleco, higienização da mesa de coleta com álcool a 70%, utilização de materiais descartáveis, como seringa, agulhas e tubos de armazenamento, higienização do local da punção com álcool a 70%, formação de hematoma é a complicação mais comum da punção venosa. O hematoma origina-se do extravasamento do sangue para o tecido, durante ou após a punção, sendo visualizado na forma de uma protuberância. A dor é o sintoma de maior desconforto ao voluntário, e eventualmente, pode ocorrer a compressão de algum ramo nervoso. Caso alguns desses efeitos sejam observados serão tomadas medidas imediatas suspendendo o procedimento de coleta do sangue. O risco será reduzido pelo fato de ser um profissional habilitado e treinado que irá coletar o sangue.

Benefícios:

O benefício indireto gerado pela participação do voluntário na pesquisa será a indicação para a sociedade de uma possível substância (princípio ativo) com potencial antitumoral.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa tem o objetivo de testar uma nova substância com potencial para tratamento do câncer, utilizando as células tumorais de culturas obtidas em banco de células e células normais do sangue periférico dos voluntários. Para tanto será realizada uma coleta de 10 mL de sangue, de uma veia na região do braço, utilizando seringas estéreis e descartáveis. A coleta de sangue será realizada por um profissional habilitado. Após a coleta do material serão isoladas as células do sangue (células saudáveis) para serem cultivadas in vitro (modelo de cultura de células) e submetidas a testes de toxicidade com vários fármacos, com a proposta de selecionar fármacos não tóxicos. Serão selecionados voluntários adultos na faixa etária de 18 a 30 anos, sem histórico de doenças recentes, não fumante ou etilista, sem exposição recente a radiações ou a medicamentos. Todas as despesas serão custeadas pela pesquisadora responsável pelo projeto de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora responsável anexou Folha de Rosto assinada pela Coordenadora do Programa de

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.556.026

Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da UFPE; Declaração de matrícula no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Carta de Anuência do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE; projeto de pesquisa; Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para maiores de 18 anos ou emancipados, Termo de Compromisso e Confidencialidade assinado pela pesquisadora responsável e os currículos das duas pesquisadoras envolvidas no projeto.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Metodologia respaldada na literatura, projeto sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.556.026

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1329673.pdf	04/07/2019 09:03:07		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetojuliacep.pdf	04/07/2019 09:02:49	JULIA LEITE CORDEIRO DE SOUZA	Aceito
Outros	Cartaanuencia.pdf	04/07/2019 08:16:55	JULIA LEITE CORDEIRO DE SOUZA	Aceito
Outros	Termoconfidencialidade.pdf	02/07/2019 00:37:59	JULIA LEITE CORDEIRO DE SOUZA	Aceito
Outros	Declaracao.pdf	02/07/2019 00:37:29	JULIA LEITE CORDEIRO DE SOUZA	Aceito
Outros	LattesGardenia.pdf	02/07/2019 00:28:33	JULIA LEITE CORDEIRO DE SOUZA	Aceito
Outros	LattesJulia.pdf	02/07/2019 00:27:53	JULIA LEITE CORDEIRO DE SOUZA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Julia.pdf	02/07/2019 00:26:12	JULIA LEITE CORDEIRO DE SOUZA	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto1.pdf	02/07/2019 00:17:59	JULIA LEITE CORDEIRO DE SOUZA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 05 de Setembro de 2019

Assinado por:

**Gisele Cristina Sena da Silva Pinho
(Coordenador(a))**

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br