



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

Thais de Oliveira Conceição

Avaliação do potencial antiproliferativo do composto 2-aminoetil dihidrogeno fosfato e associações farmacológicas em linhagem de células de leucemia mieloide crônica humana K562.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

**São Paulo, 2022**

Thais de Oliveira Conceição

Avaliação do potencial antiproliferativo do composto 2-aminoetil dihidrogeno fosfato e associações farmacológicas em linhagem de células de leucemia mieloide crônica humana K562.

São Paulo, 2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Conceição, Thais de Oliveira  
Avaliação do potencial antiproliferativo do  
composto 2-aminoetil dihidrogeno fosfato e  
associações farmacológicas em linhagem de células de  
leucemia mieloide crônica humana K562 / Thais de  
Oliveira Conceição. -- São Paulo, 2022.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Ciências Médicas. Área de  
Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular,  
Hemodinâmicos e da Hemostasia.  
Orientador: Durvanei Augusto Maria.

Descritores: 1.Neoplasias 2.Leucemia  
3.Hipoglicemiantes 4.Monofosfoester 5.Estatinas  
6.Apoptose

USP/FM/DBD-373/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

# Dedicatória

---

---

Dedico,  
... por nada  
... por tudo...

# Agradecimientos

---

---

Eu quero agradecer a Deus por me permitir chegar aonde estou agora e estar sempre comigo me dando força e sabedoria.

A meu querido Helder Auro dos Santos, pacientemente sempre me dando conselhos, força, coragem, incentivo e por me ensinar a ser uma pessoa melhor com todo amor. Mais uma etapa concluída, de muitas que virão, amo-te! Você me faz melhor!

Ao meu orientar e amigo, Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, pela confiança depositada em meu trabalho, pela sua disponibilidade irrestrita, pelos ensinamentos compartilhados. Agradeço imensamente aos ensinamentos que levo deste grande período no laboratório, pelo aprendizado e crescimento pessoal, ético e moral.

Ao meu querido amigo Laertty Cabral, aprendi com você o valor da verdadeira amizade. Sei que foi difícil me aguentar durante todo este tempo, mais isso foi apenas o começo!

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento e Inovação Industrial do Instituto Butantan, por todo carinho e companheirismo nestes últimos anos, por todas as conversas jogadas foras em horas de descontração, agradeço pelo apoio e pela amizade de vocês: Daniel, Rosely, Sergio, Thalles, Mercedes, Monique.

Então,  
vamos às aventuras –  
“porque explicações sempre levam um tempo medonho”

Lewis Carroll  
(ALICE NO PAÍS DAS MARAVILHAS)



Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

# Sumário

---

---

|   |    |
|---|----|
| Abreviaturas, símbolos e siglas.....  | 13 |
| Lista de Figuras e Tabelas.....   | 17 |
| Resumo.....   | 32 |
| Abstract.....   | 34 |
| 1. Introdução.....  | 36 |
| <b>1.1. Câncer</b> .....  | 37 |
| <b>1.2. Leucemia</b> .....  | 39 |
| <b>1.4. Atividade mitocondrial</b> .....  | 43 |
| <b>1.5. Mesilato de Imatinibe</b> .....   | 45 |
| <b>1.6. 2-Aminoetil Dihidrogeno Fosfato (2-AEH<sub>2</sub>F)</b> .....                                | 46 |
| <b>1.7. Inibidores e Ativadores da atividade mitocondrial e da fosforilação oxidativa</b> .....       | 48 |
| <b>1.7.1. Cloridrato de meclizina</b> .....   | 48 |
| <b>1.7.2. Metil-β-ciclodextrina</b> .....   | 49 |
| <b>1.7.3. Sinvastatina</b> .....  | 51 |
| <b>1.10. Metformina</b> .....   | 52 |
| 2. Objetivos.....   | 54 |
| <b>2.1. Objetivo Geral</b> .....  | 55 |
| <b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....   | 55 |
| 3. Materiais e Métodos.....   | 56 |
| <b>3.1. Caracterização da molécula 2-AEH<sub>2</sub>F</b> .....                                       | 57 |
| <b>3.2. Cultura celular</b> .....   | 57 |
| <b>3.3. Determinação da atividade citotóxica pelo método MTT</b> .....                                | 57 |
| <b>3.4. Avaliação das ultraestruturas por microscopia eletrônica de varredura</b> ....                | 58 |
| <b>3.6. Análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo</b> .....                  | 60 |
| <b>3.7. Ensaio de Proliferação CFSE-DA</b> .....  | 60 |
| <b>3.8. Avaliação da Expressão de marcadores celulares por Citometria de Fluxo</b><br>.....           | 60 |
| <b>3.9. Separação das células polimorfonucleares e mononucleares pelo método Ficoll-paque</b> . ..... | 61 |
| <b>3.10. Avaliação da citotoxicidade do 2-AEH<sub>2</sub>F para linfócitos</b> .....                  | 62 |
| <b>3.11. Análise <i>in silico</i> do efeito sinérgico das associações</b> .....                       | 62 |
| <b>3.12. Análises estatísticas</b> .....  | 63 |
| 4. Resultados.....  | 64 |
| <b>4.1. Caracterização do composto 2-AEH<sub>2</sub>F</b> .....                                       | 65 |

|  |            |
|--|------------|
| <b>4.2. Determinação da atividade citotóxica dos compostos isolados pelo método colorimétrico MTT.....</b>   | <b>67</b>  |
| <b>4.3. Determinação da atividade citotóxica dos compostos associados ao Mesilato de Imatinibe pelo método colorimétrico MTT.....</b>  | <b>76</b>  |
| <b>4.4. Determinação da atividade citotóxica dos compostos associados ao 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e F2 pelo método colorimétrico MTT.....</b>   | <b>84</b>  |
| <b>4.5. Avaliação das ultraestruturas das células tumorais K562 por microscopia eletrônica de transmissão. ....</b>  | <b>93</b>  |
| <b>4.6. Perfil de distribuição das células tumorais nas fases do ciclo celular.....</b>  | <b>97</b>  |
| <b>4.7. Determinação do potencial elétrico da membrana mitocondrial (<math>\Delta\Psi_m</math>) por citometria de fluxo .....</b>  | <b>106</b> |
| <b>4.8. Determinação da atividade proliferativa da célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo teste CSFE-DA. ....</b>  | <b>109</b> |
| <b>4.9. Expressão de proteínas envolvidas no mecanismo de morte celular e proliferação nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 por citometria de fluxo.....</b> | <b>115</b> |
| <b>4.10. Avaliação dos compostos 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e 2-AEH<sub>2</sub>F F2 na ativação de leucócitos polimorfonucleares.....</b>   | <b>128</b> |
| <b>4.11. Determinação da atividade do 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e 2-AEH<sub>2</sub>F F1 em leucócitos monomorfonucleares .....</b>   | <b>143</b> |
| <b>4.12. Determinação das interações farmacológicas pelo software Synergy Findr.....</b>   | <b>150</b> |
| <b>5. Discussão.....</b>   | <b>154</b> |
| <b>6. Conclusões .....</b>   | <b>166</b> |
| <b>7. Referências.....</b>   | <b>169</b> |

## Abreviaturas, símbolos e siglas

|                      |   |
|----------------------|---|
| CTHs                 | Células-tronco hematopoiéticas                            |
| LMA                  | Leucemia mieloide aguda                                   |
| LLA                  | Leucemia linfoblástica aguda                              |
| LMC                  | Leucemia mieloide crônica                                 |
| LLC                  | Leucemia linfocítica crônica                              |
| INCA                 | Instituto Nacional de Câncer                              |
| TKIs                 | Inibidores de tirosina quinase                            |
| FDG                  | F-2-desoxicose  |
| OXPPOS               | Fosforilação oxidativa mitocondrial                       |
| redox                | Oxidação-redução  |
| ROS                  | Espécies reativas de oxigênio                             |
| mtPTP                | Poros de transição de permeabilidade mitocondrial         |
| mtDNA                | DNA mitocondrial  |
| nDNA                 | DNA nuclear   |
| dNTP                 | Desoxirribonucleotídeos Fosfatados                        |
| PDGF                 | Fatores de crescimento derivados de plaquetas             |
| BCR-ABL              | Gene derivado de uma translocação                         |
| VEGF                 | Fator de crescimento endotelial vascular                  |
| bFGF                 | Fator de crescimento do fibroblasto básico                |
| 2-AEH <sub>2</sub> F | 2-Aminoetil Dihidrogeno Fosfato                           |
| CD117                | Proto-oncogene c-KIT                                      |
| Gr-1                 | Resposta gama de proteína 1                               |
| CD34                 | Glicoproteína fator de adesão celular                     |
| IRPTC                | Células normais do túbulo proximal imortalizadas de ratos |
| HUVEC                | Células endoteliais de veias umbilicais humanas           |
| MDA-MB-231           | Célula de câncer de mama humano triplo-negativo           |
| K562                 | Célula de leucemia mieloide crônica                       |
| MDR <sup>+</sup>     | Gene de perfil de resistência molecular                   |
| MEC                  | Cloridrato de meclizina                                   |
| CAR                  | Receptor androstano constitutivo                          |
| LBD                  | Domínio de ligação do ligante                             |
| Etn                  | CDP-etanolamina   |

|               |   |
|---------------|---|
| PE            | Fosfatidiletanolamina   |
| PCYT2         | Fosfoetanolamina citidililtransferase   |
| M $\beta$ CD  | Metil- $\beta$ -ciclodextrina   |
| GD3           | Disialoganglioside  |
| t-Bid         | Proteína pró-apoptótica   |
| rBAX          | Regulador apoptótico  |
| HMG-CoA       | hidroxi-metilglutaril A redutase  |
| LDL-C         | Lipoproteína de baixa densidade   |
| HDL           | Lipoproteína de alta densidade  |
| FPP           | Farnesil pirofosfato  |
| GGPP          | Geranylgeranyl pirofosfato  |
| ETC           | Cadeia de transporte de elétrons  |
| GTPases       | Guanosina trifosfatases   |
| AMPK          | Quinase dependente de AMP   |
| mTOR          | Receptor alvo mecanístico da rapamicina   |
| RNAse         | Ribonuclease  |
| DMEM          | Dulbecco's Modified Eagle's   |
| CFSE-DA       | Carboxifluoresceína   |
| p53           | Proteína supressora tumoral   |
| bcl-2         | Proteína antiapoptótica   |
| PCNA          | Antígeno nuclear de célula proliferante   |
| Trail DR-4    | Receptor de morte   |
| CMSP          | Células mononucleares do sangue periférico  |
| RPMI          | Meio de cultura   |
| MS/MS         | Espectrometria de massas  |
| MTT           | Método colorimétrico  |
| INF- $\alpha$ | Interferon- $\alpha$  |
| RMC           | Resposta citogenética completa  |
| IFN           | Interferon  |
| T315I         | Gene  |
| A549          | Células de câncer de pulmão   |
| PCYT2         | Gene que codifica uma enzima que catalisa a formação de fosfoetanolamina citidililtransferase |

|             |  |
|-------------|--|
| LysoPE      | Lisofosfatidiletanolamina                              |
| MCF-7       | Adenocarcinoma de mama humano                          |
| MTCH2       | Homólogo 2 do portador mitocondrial                    |
| B16-F10     | Células melanoma murino                                |
| Skmel-28    | Células melanoma humano                                |
| Mewo        | Células melanoma murino                                |
| Hepa1c1c7   | Célula de hepatocarcinoma murino                       |
| DNA         | Ácido desoxirribonucleico                              |
| WBC         | Leucócitos totais                                      |
| NK          | Células assassinas naturais                            |
| Akt         | Proteína quinase B                                     |
| PI3K        | Fosfoinosítido 3-quinase                               |
| Jak         | Proteína tirosina kinase fosforilada                   |
| Stat5,6     | Transdutor de sinal e ativador de transcrição 5 e 6    |
| TP53        | Gene supressor tumoral                                 |
| E3          | Ubiquitina ligase                                      |
| PUMA        | Modulador de apoptose                                  |
| Noxa        | Proteína 1 induzida por forbol-12-miristato-13-acetato |
| p21         | Proteína reguladora da transição da fase G1            |
| p27         | Inibidor de quinase dependente de ciclina 1B           |
| iASPP       | Inibidor associado a RelA                              |
| SMAC/DIABLO | Proteína mitocondrial                                  |
| TNF         | Fator de necrose tumoral                               |
| Fas/APO1    | Proteína reguladora de apoptose                        |
| XIAP        | Inibidor da proteína de apoptose ligado ao X           |



## Lista de Figuras e Tabelas

---

---

**Figura 1. As marcas do câncer.** Fonte: Hanahan, G. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation.

**Figura 2. As marcas do câncer.** Fonte: Hanahan, G. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions.

**Figura 3. Ranking Nacional de Câncer como Causa de Morte em Idades < 70 Anos em 2020.** Os números de países representados em cada grupo de classificação estão incluídos na legenda. Fonte: Organização Mundial da Saúde.

**Figura 4. Diagrama de hematopoiese.** Fonte: Chopra & Bohlander. (2019). The cell of origin and the leukemia stem cell in acute myeloid leukemia.

**Figura 5. modelo de desenvolvimento de leucemia a partir da diferenciação mieloide bloqueada.** Fonte: Rosenbauer & Tenen. (2007). Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation.

**Figura 6. Diagrama ilustrando as características após a transformação de células-tronco hematopoiéticas para células-tronco de leucemia mieloide crônica (LMC).** Fonte: Minciacchi et al. (2021). Chronic Myeloid Leukemia: A Model Disease of the Past, Present and Future.

**Figura 7. Características Genéticas do Cromossomo Philadelphia.** Fonte: Foà & Chiaretti. (2022). Philadelphia Chromosome–Positive Acute Lymphoblastic Leukemia.

**Figura 8. Mecanismo de ação do Mesilato de Imatinibe.** Fonte: Foà & Chiaretti. (2022). Philadelphia Chromosome–Positive Acute Lymphoblastic Leukemia.

**Figura 9. Estrutura química do 2-Aminoetil Dihidrogeno Fosfato.** Fonte:  
<https://www.selleckchem.com/datasheet/o-phosphoethanolamine-S648301-DataSheet.html>.

**Figura 10. Estrutura química do Cloridrato de meclizina.** Fonte: Peraman et al. (2015). A Stability-Indicating RP-HPLC Method for the Quantitative Analysis of Meclizine Hydrochloride in Tablet Dosage Form.

**Figura 11. Estrutura química da metil-β-ciclodextrina.** Fonte: Mahammad & Parmryd. (2014). Cholesterol Depletion Using Methyl-β-cyclodextrin

**Figura 12. Estrutura química da Sinvastatina.** Fonte:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54454>

**Figura 13. Estrutura química da metformina.** Fonte:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4091>

**Tabela 1.** Relação dos grupos de tratamentos para a célula tumoral K562.

**Figura 14.** Varredura em massas representativos por infusão direta em espectro (MS/MS) MICROTOF-Bruker Daltonics do composto 2-aminoetil dihidrogeno fosfato. **(a)** 2-AEH<sub>2</sub>F F1; **(b)** 2-AEH<sub>2</sub>F F2. As medidas de massa foram realizadas em modo positivo, com faixa de massa entre 100-240 m/z, energia iônica de 5,0 V, fluxo de gás nitrogênio de 12,0 L min<sup>-1</sup>, multiplicador de 1,0, capilar de 3,0 kV e tensão de cone de 35 V.

**Tabela 2.** Valores de IC<sub>50%</sub> obtidos após os tratamentos com compostos isolados na célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 por um período de 24h.

**Figura 15. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células tumorais foram tratadas com diferentes concentrações com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias representativas da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

**Figura 16. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com diferentes concentrações com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

**Figura 17. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com diferentes concentrações com o Cloridrato de Meclizina no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

**Figura 18. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com diferentes concentrações com a Metil-β-ciclodextrina no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

**Figura 19. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com diferentes concentrações com a Metformina no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

**Figura 20. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com diferentes concentrações com a Sinvastatina no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células

tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

**Figura 21. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com diferentes concentrações com o Mesilato de Imatinibe no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

**Tabela 3.** Valores de IC<sub>50%</sub> obtidos após os tratamentos com associação com Mesilato de Imatinibe na célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 por um período de 24h.

**Figura 22. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o Mesilato de Imatinibe na concentração de 0,03mM associado ao 2-AEH<sub>2</sub>F F1 em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

**Figura 23. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o Mesilato de Imatinibe na concentração de 0,03mM associado ao 2-AEH<sub>2</sub>F F2 em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

**Figura 24. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o Mesilato de Imatinibe na concentração de 0,03mM associado ao Cloridrato de Meclizina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

**Figura 25. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o Mesilato de Imatinibe na concentração de 0,03mM associado a Metil-β-Ciclodextrina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

**Figura 26. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o Mesilato de Imatinibe na concentração de 0,03mM associado a Metformina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

- Figura 27. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o Mesilato de Imatinibe na concentração de 0,03mM associado a Sinvastatina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.
- Figura 28. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 na concentração de 1,3mM associado ao Cloridrato de Meclizina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.
- Figura 29. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 na concentração de 1,3mM associado a Metil-β-Ciclodextrina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.
- Figura 30. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 na concentração de 1,3mM associado a Metformina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.
- Figura 31. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 na concentração de 1,3mM associado a Sinvastatina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.
- Figura 32. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 na concentração de 0,9 mM associado ao Cloridrato de Meclizina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.
- Figura 33. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 na concentração de 0,9 mM associado a Metil-β-Ciclodextrina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais

K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

**Figura 34. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 na concentração de 0,9 mM associado a Metformina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

**Figura 35. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 na concentração de 0,9 mM associado a Sinvastatina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

**Figura 36. Fotomicrografias eletrônicas representativas do grupo controle de células da linhagem de leucemia mieloide crônica humana (K562).** Obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Morgani modelo 268D. **(a)** Células tumorais K562 apresentando características morfológicas variadas, algumas contendo vesículas endocíticas (círculos) e o plano de corte revelou diversas projeções digitiformes (setas), barra 10µm; **(b)** Núcleo (N), Retículo Endoplasmático Rugoso (seta), mitocôndrias (m), heterocromatina associada à lâmina nuclear (cabeça de seta), barra 1µm. **(c)** Célula tumoral K562 apresentando dois nucléolos (asteriscos), Núcleo (N), barra 5µm. **(d)** Núcleo (N), mitocôndrias (m), Complexo de Golgi (círculo), barra 1µm. **(e)** Projeção da membrana plasmática em formação de vesícula (V), observa-se conteúdo citoplasmático no interior da vesícula em formação, barra 0,5µm. **(f)** Dupla camada do envoltório nuclear apresentando espaçamento normal da cisterna, com cromatina associada à lâmina interna (seta), poro nuclear (cabeça de seta), núcleo (N), invaginação da membrana plasmática com a presença de conteúdo de eletrondensidade diferenciada, barra 0,5µm.

**Figura 37. Fotomicrografias eletrônicas representativas do grupo tratado com 2-AEH<sub>2</sub>F F1 de células da linhagem de leucemia mieloide crônica humana (K562).** Obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Morgani modelo 268D. **(a)** Características gerais das células tumorais K562 tratadas, célula em apoptose (asterisco), núcleo (N), barra 5µm; **(b)** Vesículas endocíticas (círculo), Núcleo (N), barra 5µm. **(c)** Célula tumoral K562 apresentando vacuolização citoplasmática, núcleo (N), vacúolos (V), barra 5µm. **(d)** Detalhe dos vacúolos citoplasmáticos referente à figura “C”, barra 5µm. **(e)** Célula tumoral K562 em processo apoptótico, produzindo projeções citoplasmáticas semelhantes a exossomas (setas), barra 5µm. **(f)** Detalhe de mitocôndria apresentando alteração morfológica interna e formação de estruturas semelhantes a vacúolos (setas), barra 0,5µm.

**Figura 38. Fotomicrografias eletrônicas representativas do grupo tratado com 2-AEH<sub>2</sub>F F2 de células da linhagem de leucemia mieloide crônica humana (K562).** Obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Morgani modelo 268D. **(a)** Características gerais das células tumorais K562 tratadas, observa-

se formação de debris celulares provenientes do processo de apoptose (asteriscos), barra 10 $\mu$ m; **(b)** Célula tumoral K562 com dois núcleos apresentando padrão heterogêneo da cromatina (N), vacúolos citoplasmáticos (círculo), barra 5 $\mu$ m. **(c)** Célula tumoral K562 apresentando morfologia alterada, sem definição de organelas citoplasmáticas, heterocromatina condensada e polarizada em uma região do núcleo (asterisco), nucléolo apresentando alteração morfológica (seta), vacúolos citoplasmáticos (círculo), barra 2 $\mu$ m. **(d)** Detalhe dos vacúolos citoplasmáticos referente à figura “C”, região íntegra do envoltório nuclear (chave), região de afastamento anormal do envoltório nuclear criando um aumento do espaço da cisterna perinuclear entre o nucleoplasma e o citoplasma (setas), formando estrutura semelhante a uma vesícula com conteúdo interno (asterisco), barra 5 $\mu$ m. **(e)** Vesículas endocíticas (asteriscos), Núcleo picnótico (Np), vacúolos citoplasmáticos (V), mitocôndrias apresentando vacúolos internos (setas), barra 5 $\mu$ m; **(f)** Detalhe das mitocôndrias apresentando alterações morfológicas e formação de estruturas semelhantes a vacúolos internos (setas), com degradação, barra 0,5 $\mu$ m.

**Figura 39. Análise das fases do ciclo celular nas células de leucemia mieloide crônica da linhagem K562.** As células foram tratadas em diferentes concentrações com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 isolado e associado ao Mesilato de Imatinibe no período de 24h. **(a)** Histogramas e Densty Plots representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular. **(b)** Distribuição das fases do ciclo celular; **(c)** DNA fragmentado. Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo

**Figura 40. Análise das fases do ciclo celular nas células de leucemia mieloide crônica da linhagem K562.** As células foram tratadas em diferentes concentrações com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 isolado e associado ao Mesilato de Imatinibe no período de 24h. **(a)** Histogramas e Densty Plots representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular. **(b)** Distribuição das fases do ciclo celular; **(c)** DNA fragmentado. Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 41. Análise das fases do ciclo celular nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** As células foram tratadas em diferentes concentrações com o Cloridrato de Meclizina isolado e associado ao Mesilato de Imatinibe no período de 24h. **(a)** Histogramas e Densty Plots representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular. **(b)** Distribuição das fases do ciclo celular; **(c)** DNA fragmentado. Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 42. Análise das fases do ciclo celular nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** As células foram tratadas em diferentes concentrações com a M $\beta$ CD isolada e associada ao Mesilato de

Imatinibe no período de 24h. **(a)** Histogramas e Densty Plots representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular. **(b)** Distribuição das fases do ciclo celular; **(c)** DNA fragmentado. Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . ns=não significativo.

**Figura 43. Análise das fases do ciclo celular nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** As células foram tratadas em diferentes concentrações com a Metformina isolada e associada ao Mesilato de Imatinibe no período de 24h. **(a)** Histogramas e Densty Plots representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular. **(b)** Distribuição das fases do ciclo celular; **(c)** DNA fragmentado. Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . ns=não significativo.

**Figura 44. Análise das fases do ciclo celular nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** As células foram tratadas em diferentes concentrações com a Sinvastatina isolada e associada ao Mesilato de Imatinibe no período de 24h. **(a)** Histogramas e Densty Plots representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular. **(b)** Distribuição das fases do ciclo celular; **(c)** DNA fragmentado. Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . ns=não significativo.

**Figura 45. Análise do potencial elétrico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) na célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 por citometria de fluxo.** As células foram tratadas com os compostos isolados nos valores de  $IC_{50\%}$  por um período de 24h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com  $\Delta\Psi_m$ . **(b)** Gráfico de barras mostrando o  $\Delta\Psi_m$  expresso como média $\pm$ DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . ns=não significativo.

**Figura 46. Análise do potencial elétrico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) na célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 por citometria de fluxo.** As células foram tratadas com os compostos associados ao Mesilato de Imatinibe nos valores de  $IC_{50\%}$  obtidos anteriormente por um período de 24h. Gráfico de barras mostrando o  $\Delta\Psi_m$  expresso como média $\pm$ DP de três experimentos independentes. DensityPlots representativos da distribuição de acordo com  $\Delta\Psi_m$ . As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . ns=não significativo.



**Figura 47. Avaliação do índice proliferativo da célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 por citometria de fluxo.** As células foram tratadas com os compostos isolados nos valores de IC<sub>50%</sub> por um período de 24h. **(a)** Histogramas representativos do índice proliferativo obtido através do Software WinMDI 5.0. **(b)** Gráficos de barras expresso em média±DP de três experimentos independentes do índice proliferativo da célula tumoral K562. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo

**Figura 48. Avaliação do índice proliferativo da célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 por citometria de fluxo.** As células foram tratadas com os compostos isolados nos valores de IC<sub>50%</sub> por um período de 48h. **(a)** Histogramas representativos do índice proliferativo obtido através do Software WinMDI 5.0. **(b)** Gráficos de barras expresso em média±DP de três experimentos independentes do índice proliferativo da célula tumoral K562. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo

**Figura 49. Avaliação do índice proliferativo da célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 por citometria de fluxo.** As células foram tratadas com os compostos associados ao Mesilato de Imatinibe nos valores de IC<sub>50%</sub> obtidos anteriormente por um período de 24h. **(a)** Histogramas representativos do índice proliferativo obtido através do Software WinMDI 5.0. **(b)** Gráficos de barras expresso em média±DP de três experimentos independentes do índice proliferativo da célula tumoral K562. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo

**Figura 50. Avaliação do índice proliferativo da célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 por citometria de fluxo.** As células foram tratadas com os compostos associados ao Mesilato de Imatinibe nos valores de IC<sub>50%</sub> obtidos anteriormente por um período de 24h. **(a)** Histogramas representativos do índice proliferativo obtido através do Software WinMDI 5.0. **(b)** Gráficos de barras expresso em média±DP de três experimentos independentes do índice proliferativo da célula tumoral K562. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Tabela 4.** Análise da expressão dos marcadores nas células tumorais da linhagem K562 após os tratamentos.

**Figura 51. Análise da expressão de p53 em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** A expressão foi quantificada por citometria de fluxo, após 12h de tratamento nos valores de IC<sub>50%</sub>. **(a)** DensityPlots representativos das células expressando a proteína p53 obtido através do Software FCS Express. **(b)** Gráficos de barra expressos como média ± DP de três experimentos independentes da porcentagem de células K562 expressando a proteína p53. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 52. Análise da expressão de Bad em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** A expressão foi quantificada por citometria de fluxo, após 12h de tratamento nos valores de IC<sub>50%</sub>. **(a)** DensityPlots representativos das células expressando a proteína Bad obtido através do Software FCS Express. **(b)** Gráficos de barra expressos como média ± DP de três experimentos independentes da porcentagem de células K562 expressando a proteína Bad. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 53. Análise da expressão de Bax em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** A expressão foi quantificada por citometria de fluxo, após 12h de tratamento nos valores de IC<sub>50%</sub>. **(a)** DensityPlots representativos das células expressando a proteína Bax obtido através do Software FCS Express. **(b)** Gráficos de barra expressos como média ± DP de três experimentos independentes da porcentagem de células K562 expressando a proteína Bax. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 54. Análise da expressão de Bcl-2 em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** A expressão foi quantificada por citometria de fluxo, após 12h de tratamento nos valores de IC<sub>50%</sub>. **(a)** DensityPlots representativos das células expressando a proteína Bcl-2 obtido através do Software FCS Express. **(b)** Gráficos de barra expressos como média ± DP de três experimentos independentes da porcentagem de células K562 expressando a proteína Bcl-2. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 55. Análise da liberação de Citocromo C em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** A expressão foi quantificada por citometria de fluxo, após 12h de tratamento nos valores de IC<sub>50%</sub>. **(a)** DensityPlots representativos das células liberando Citocromo C obtido através do Software FCS Express. **(b)** Gráficos de barra expressos como média ± DP de três experimentos independentes da porcentagem de células K562 liberando Citocromo C. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 56. Análise da expressão de Caspase 3 em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** A expressão foi quantificada por citometria de fluxo, após 12h de tratamento nos valores de IC<sub>50%</sub>. **(a)** DensityPlots representativos das células expressando Caspase 3 obtido através do Software FCS Express. **(b)** Gráficos de barra expressos como média ± DP de três experimentos independentes da porcentagem de células K562 expressando Caspase 3. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 57. Análise da expressão do receptor Trail-DR4 em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** A expressão foi quantificada

por citometria de fluxo, após 12h de tratamento nos valores de IC<sub>50%</sub>. **(a)** DensityPlots representativos das células expressando receptor de morte celular Trail-DR4 obtido através do Software FCS Express. **(b)** Gráficos de barra expressos como média ± DP de três experimentos independentes da porcentagem de células K562 expressando o receptor de morte celular Trail-DR4. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 58. Análise da expressão do PCNA em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** A expressão foi quantificada por citometria de fluxo, após 12h de tratamento nos valores de IC<sub>50%</sub>. **(a)** DensityPlots representativos das células expressando o PCNA obtido através do Software FCS Express. **(b)** Gráficos de barra expressos como média ± DP de três experimentos independentes da porcentagem de células K562 expressando o PCNA. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Tabela 5.** Identificação das amostras

**Figura 59. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 1 (DCR) de sangue coletada, processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F1 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 60. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 1 (DCR) de sangue coletado, processado e tratado com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F2 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 61. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 2 (MRH) de sangue coletado, processado e tratado com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F1 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 62. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 2 (MRH) de sangue coletado, processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F2 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 63. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 3 (SMC) de sangue coletado, processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F1 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 64. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 3 (SMC) de sangue coletado, processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F2 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 65. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 4 (MGA) de sangue coletado, processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F1 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 66. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 4 (MGA) de sangue coletado, processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F2 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 67. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 5 (TADO) de sangue coletado, processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F1 no período de 3h. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 68. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 5 (TADO) de sangue coletado, processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F2 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 69. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 6 (RCBA) de sangue coletado, processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F1 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 70. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 6 (RCBA) de sangue coletado, processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F2 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 71. Determinação da citotoxicidade em células monomorfonucleares linfócitos pelo método colorimétrico MTT.** Amostra 1 (DCR) tratadas em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1. **(b)** Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F2. Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 72. Determinação da citotoxicidade em células monomorfonucleares linfócitos pelo método colorimétrico MTT.** Amostra 2 (MRH) tratadas em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1. **(b)** Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F2. Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 73. Determinação da citotoxicidade em células monomorfonucleares linfócitos pelo método colorimétrico MTT.** Amostra 3 (SMC) tratadas com diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1. **(b)** Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F2. Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experiências independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 74. Determinação da citotoxicidade em células monomorfonucleares linfócitos pelo método colorimétrico MTT.** Amostra 4 (MGA) tratadas em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1. **(b)** Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F2. Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experiências independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 75. Determinação da citotoxicidade em células monomorfonucleares linfócitos pelo método colorimétrico MTT.** Amostra 5 foram (TADO) tratadas em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1. **(b)** Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F2. Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experiências independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 76. Determinação da citotoxicidade em células monomorfonucleares linfócitos pelo método colorimétrico MTT.** Amostra 6 (RCBA) tratadas em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1. **(b)** Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F2. Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experiências independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

**Figura 77. Determinação do efeito aditivo, sinérgico ou antagônico em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** **(a)** Associação 2-AEH<sub>2</sub>F F1+Mesilato de Imatinibe; **(b)** Associação 2-AEH<sub>2</sub>F F2+Mesilato de Imatinibe. O efeito antagônico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde (≤0), o efeito aditivo e o sinergismo são observados no

espaço colorido entre o branco e o vermelho ( $> 0$  e 10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; Tabelas mostrando a combinação de drogas e a pontuação de sinergia para essas combinações.

**Figura 78. Determinação do efeito aditivo, sinérgico ou antagônico em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562. (a)** Associação Metil- $\beta$ -Ciclodextrina+Mesilato de Imatinibe; **(b)** Associação Cloridrato de Meclizina+Mesilato de Imatinibe. O efeito antagônico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde ( $\leq 0$ ), o efeito aditivo e o sinergismo são observados no espaço colorido entre o branco e o vermelho ( $> 0$  e 10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; Tabelas mostrando a combinação de drogas e a pontuação de sinergia para essas combinações.

**Figura 79. Determinação do efeito aditivo, sinérgico ou antagônico em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562. (a)** Associação Metformina+Mesilato de Imatinibe; **(b)** Associação Sinvastatina+Mesilato de Imatinibe. O efeito antagônico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde ( $\leq 0$ ), o efeito aditivo e o sinergismo são observados no espaço colorido entre o branco e o vermelho ( $> 0$  e 10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; Tabelas mostrando a combinação de drogas e a pontuação de sinergia para essas combinações.

Resumo

---

---



Conceição, TO. *Avaliação do potencial antiproliferativo do composto 2-aminoetil dihidrogeno fosfato e associações farmacológicas em linhagem de células de leucemia mieloide crônica humana K562*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2022.

A leucemia mieloide crônica é uma neoplasia oncohematológica mieloproliferativa maligna caracterizada por uma proliferação clonal de células-tronco hematopoética. Apresenta alta taxa de sucesso nos tratamentos com inibidores de tirosina quinase, porém com taxas de resistência ao tratamento, o que tem levado ao desenvolvimento de novos medicamentos. O presente trabalho avaliou os efeitos antitumorais, citotóxicos e de modulação da atividade mitocondrial e metabólico, do Cloridrato de meclizina, Metil- $\beta$ -ciclodextrina, Sinvastatina, Metformina e do 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e F2 associados ao Mesilato de Imatinibe, em linhagem tumoral de leucemia humana K562. Foi avaliado os efeitos da toxicidade e determinado a concentração inibitória (IC<sub>50%</sub>) pelo teste colorimétrico MTT. Foram avaliadas as alterações morfológicas e ultraestruturais envolvidas no processo de apoptose. A expressão de marcadores envolvidos nas vias de morte celular, proliferação, potencial elétrico mitocondrial e ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo. Os tratamentos isolados com 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e F2, Cloridrato de Meclizina, Metformina, Sinvastatina e Mesilato de Imatinibe, promoveram citotoxicidade e redução do índice proliferativo nas linhagens tumorais de leucemia mieloide crônica K562, resultado também observado nas condições de tratamento quando associados ao Mesilato de Imatinibe. O tratamentos com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e Sinvastatina promoveram parada na fase S do ciclo celular, enquanto os tratamentos com 2-AEH<sub>2</sub>F F2 promoveu para na fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular, para a Meclizina, houve redução da fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, redução do potencial elétrico mitocondrial e aumento de DNA fragmentado. O tratamento com os compostos 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e F2 em leucócitos monomorfonucleares não induziram toxicidade, ou inibição de resposta proliferativa. Conclui-se que os tratamentos com 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e F2 e Sinvastatina, sugerem modulação na via intrínseca da apoptose reduzindo a expressão de Bcl-2, aumento de p53, Bax e caspase 3 e liberação do citocromo c. O Cloridrato de Meclizina, a Metformina e as associações com o Mesilato de Imatinibe, modularam a expressão de proteínas pró-apoptóticas da via extrínseca, com aumento de expressão do receptor Trail-DR4, ocorrendo possivelmente o *cross-talk* da via extrínseca. O conjuntos de resultados demonstra potencial *in vitro* para o tratamento de leucemia mieloide crônica humana.

**Descritores:** Mitocôndria; leucemia; hipoglicemiantes, monofosfoester, estatinas, apoptose

# Abstract

---

---

Conceição, TO. *Evaluation of the antiproliferative potential of the compound 2-aminoethyl dihydrogen phosphate and pharmacological associations in human chronic myeloid leukemia cell line K562*. [Thesis]. Sao Paulo: Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, 2022.

Chronic myeloid leukemia is a malignant myeloproliferative oncohematologic neoplasm characterized by a clonal proliferation of hematopoietic stem cells. It has a high success rate in treatments with tyrosine kinase inhibitors, but with rates of resistance to treatment, which has led to the development of new drugs. The present work evaluated the antitumor, cytotoxic, and modulating effects of mitochondrial and metabolic activity of meclizine hydrochloride, Methyl- $\beta$ -cyclodextrin, Simvastatin, Metformin and 2-AEH<sub>2</sub>F F1 and F2 associated with imatinib mesylate, in a tumor cell line of human leukemia K562. The effects of toxicity were evaluated and the inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>%) was determined by the MTT colorimetric test. The morphological and ultrastructural changes involved in the apoptosis process were evaluated. The expression of markers involved in cell death, proliferation, mitochondrial electrical potential, and cell cycle pathways was evaluated by flow cytometry. The isolated treatments with 2-AEH<sub>2</sub>F F1 and F2, Meclizine Hydrochloride, Metformin, Simvastatin and imatinib mesylate, promoted cytotoxicity and reduced proliferative index in K562 chronic myeloid leukemia tumor lines, a result also observed in the treatment conditions when associated with Imatinib Mesylate. The treatments with the compound 2-AEH<sub>2</sub>F F1 and Simvastatin promoted arrest in the S phase of the cell cycle, while the treatments with 2-AEH<sub>2</sub>F F2 promoted to the G<sub>2</sub>/M phase of the cell cycle, for Meclizine, there was a reduction in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase, reduction of mitochondrial electrical potential and increase of fragmented DNA. Treatment with 2-AEH<sub>2</sub>F compounds F1 and F2 in mononuclear leukocytes did not induce toxicity, or inhibition of proliferative response. It is concluded that the treatments with 2-AEH<sub>2</sub>F F1 and F2 and Simvastatin, suggest modulation in the intrinsic pathway of apoptosis, reducing the expression of Bcl-2, increase of p53, Bax and caspase 3 and release of cytochrome c. Meclizine Hydrochloride, Metformin and associations with Imatinib Mesylate, modulated the expression of pro-apoptotic proteins of the extrinsic pathway, with increased expression of the Trail-DR4 receptor, possibly causing the crosstalk of the extrinsic pathway. The result set demonstrates in vitro potential for the treatment of human chronic myeloid leukemia.

Descriptors: Mitochondria; leukemia; hypoglycemic agents, monophosphoester, statins, apoptosis

# 1. Introdução

---

## 1.1. Câncer

O câncer pode ser definido como um conjunto de capacidades funcionais adquiridas por células humanas, que geram crescimento neoplásico decorrente de acúmulo de mutações que levam a proliferação desordenada e capacidade invasiva de tecidos e órgãos, capacidades que são cruciais para formação, manutenção e progressão de tumores malignos <sup>1</sup>.

Bob Weinberg e Douglas Hanahan enumeraram as principais características compartilhadas que unem todos os tipos de células tumorais ao nível do fenótipo celular. As oito marcas propostas, atualmente compreendem as capacidades adquiridas para sustentar a sinalização proliferativa, evitar supressores de crescimento, resistir à morte celular, permitir a imortalidade replicativa, induzir/acessar vasculatura, ativar invasão e metástase, reprogramar o metabolismo celular e evitar a destruição imunológica <sup>2</sup>. Como marcas emergentes do câncer, foi proposto a desregulamentação do metabolismo celular e a prevenção da destruição imunológica (Figura 1)



**Figura 1. As marcas do câncer.** Fonte: Hanahan, G. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation.

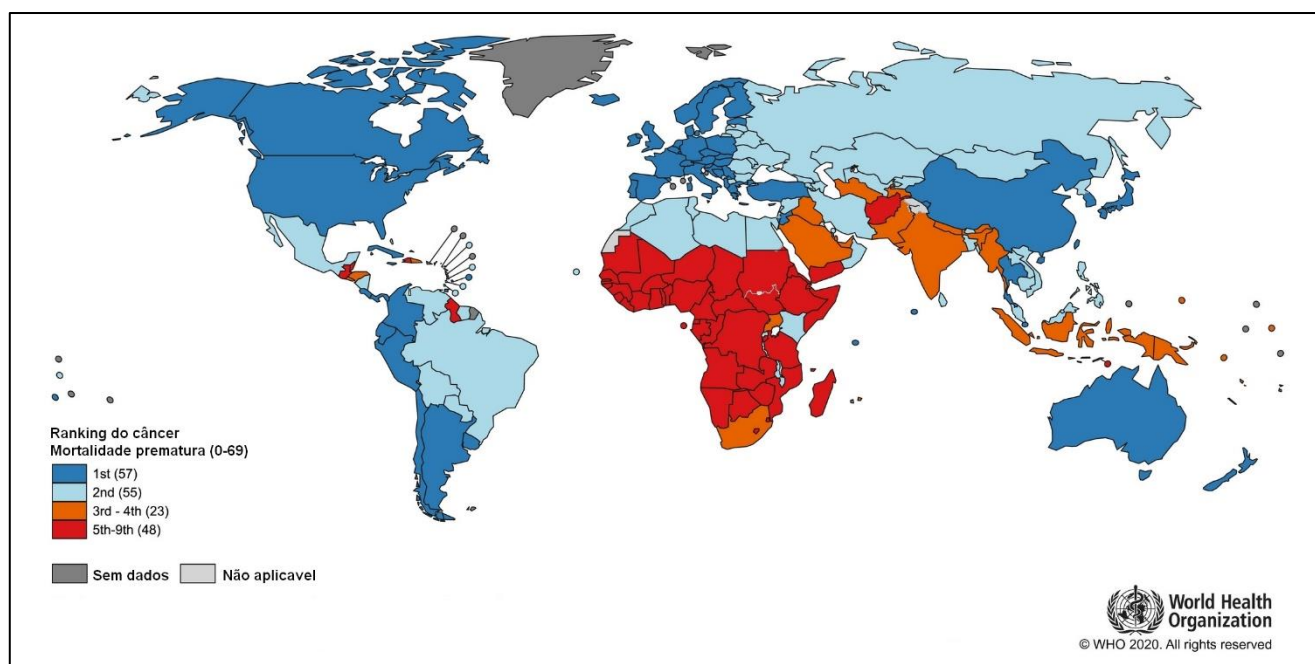
Com o avanço dos estudos, foi observado que somente essas características não abordam as complexidades patogênicas do câncer, pois são necessários outros mecanismos moleculares e celulares para que células pré-

neoplásicas em evolução, desenvolvam e adquiram capacidades fenotípicas aberrantes sustentando assim o desenvolvimento do tumor e progressão maligna. Foi acrescentado outras quatro marcas que podem estar envolvidos diretamente nessa progressão, o desbloqueio da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutativa, os microbiomas polimórficos e a senescência celular (Figura 2) <sup>1</sup>.



**Figura 2. As marcas do câncer.** Fonte: Hanahan, G. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions.

Levando em consideração todas essas características, hoje o câncer é considerado um dos principais problemas de saúde pública no mundo e uma importante barreira para o aumento da expectativa de vida em todos os países do mundo, ocupando a quarta posição em mortes prematuras (Figura 3) <sup>3,4</sup>. Verifica-se aumento dos tipos de câncer relacionados a melhoria das condições socioeconômicas, como sedentarismo, alimentação inadequada, entre outros, com redução dos tipos de câncer associados a infecções <sup>5</sup>.



**Figura 3. Ranking Nacional de Câncer como Causa de Morte em Idades < 70 Anos em 2020.** Os números de países representados em cada grupo de classificação estão incluídos na legenda. Fonte: Organização Mundial da Saúde.

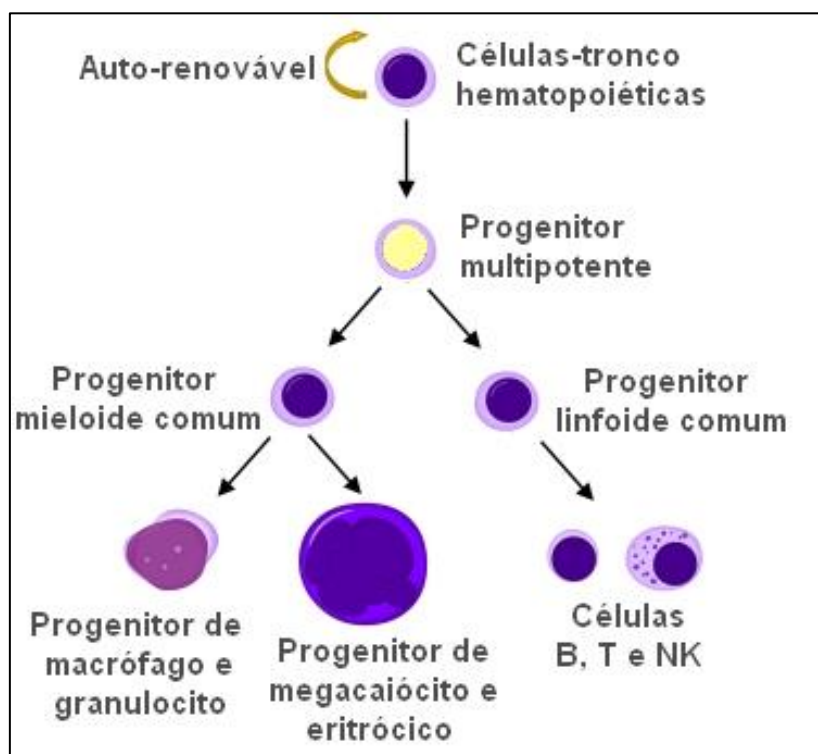
Houve uma estimativa de 19,3 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes por câncer em todo o mundo em 2020. Os 10 principais tipos de câncer para casos e mortes estimados em todo o mundo para homens e mulheres são o câncer de mama feminino (11,7% do total de casos), seguido pelos cânceres de pulmão (11,4%), colorretal (10,0%), próstata (7,3%) e estômago (5,6%). O câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer (18,0% do total de mortes por câncer), seguido por câncer colorretal (9,4%), fígado (8,3%), estômago (7,7%) e câncer de mama feminino (6,9%)<sup>3,4</sup>.

O Instituto Nacional do Câncer José de Alencar (INCA) estima para o Brasil, a cada ano do triênio 2020-2022 que ocorrerão em média 625 mil novo casos de câncer. O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil)<sup>5</sup>.

## 1.2. Leucemia

As células-tronco hematopoiéticas (CTHs) na medula óssea produzem continuamente células progenitoras que se multiplicam e se diferenciam em células sanguíneas e imunes totalmente funcionais das várias linhagens, como eritrócitos, granulócitos, plaquetas, entre outros elementos celulares (Figura 4)

<sup>6</sup>. Este processo é absolutamente vital e é mantido ao longo de nossas vidas pela capacidade de auto renovação dos CTHs para garantir que haja sempre um número suficiente de células sanguíneas maduras de curta duração <sup>7</sup>.



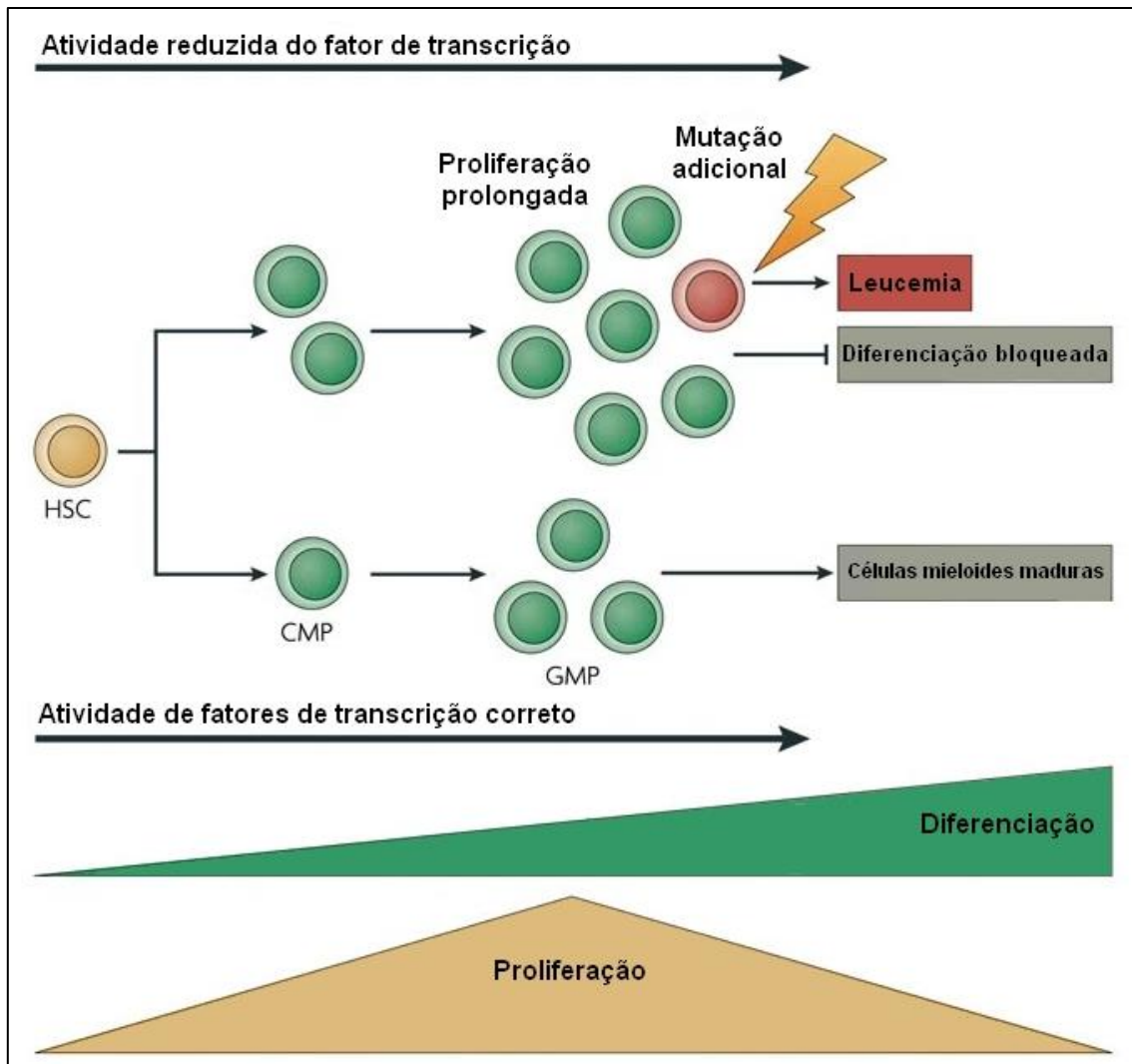
**Figura 4. Diagrama de hematopoiese normal.** Fonte: Chopra & Bohlander. (2019).  
The cell of origin and the leukemia stem cell in acute myeloid leukemia.

As leucemias constituem um grupo heterogêneo de neoplasias oncohematológicas decorrentes da proliferação clonal de células hematopoiéticas na medula óssea e/ou nos tecidos linfóides, que, posteriormente, atingem a circulação periférica e podem infiltrar-se em outros sistemas <sup>8,9</sup>. As células leucêmicas originam-se a partir de uma mutação somática em uma única célula-tronco ou célula primordial (CTHs), a qual forma o clone leucêmico. A transformação leucêmica pode ocorrer em diferentes fases da diferenciação de precursores linfóides ou mielóides, o que a caracteriza como uma doença heterogênea sob o aspecto biológico e morfológico (Figura 5) <sup>10-12</sup>.

As leucemias agudas, que compreendem a leucemia mieloide aguda (LMA) e a leucemia linfoblástica aguda (LLA), são progressivas e agressivas caracterizadas por rápida proliferação de células imaturas <sup>13</sup>. Isso ocorre porque a célula que origina o clone neoplásico é um precursor cuja alteração mutacional causa perda da capacidade maturativa, com consequente acúmulo de blastos



na medula óssea e no sangue periférico <sup>14</sup>. Na leucemia mieloide crônica (LMC) e a leucemia linfocítica crônica (LLC), as mutações permitem a manutenção da capacidade de diferenciação e maturação celular, havendo um característico aumento no número de células maduras na medula óssea e no sangue periférico <sup>15</sup>.



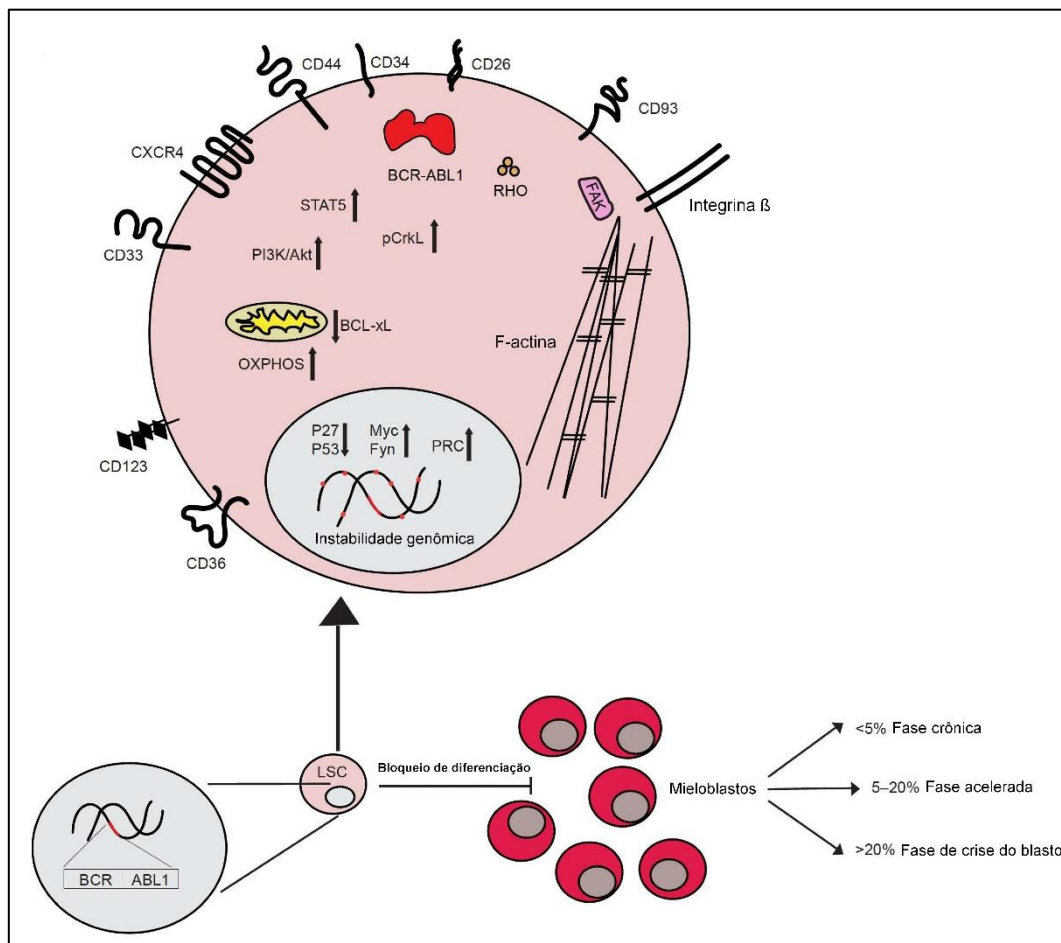
**Figura 5. modelo de desenvolvimento de leucemia a partir da diferenciação mieloide bloqueada.** Fonte: Rosenbauer & Tenen. (2007). Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation.

Segundo o INCA, as estimativas de novos casos de leucemia no Brasil são de 10.810, sendo 5.920 homens e 4.890 mulheres, com número de mortes totalizando 6.738, sendo 3.703 homens e 3.035 mulheres (Atlas de Mortalidade por Câncer - INCA).

### 1.3. Leucemia Mieloide Crônica

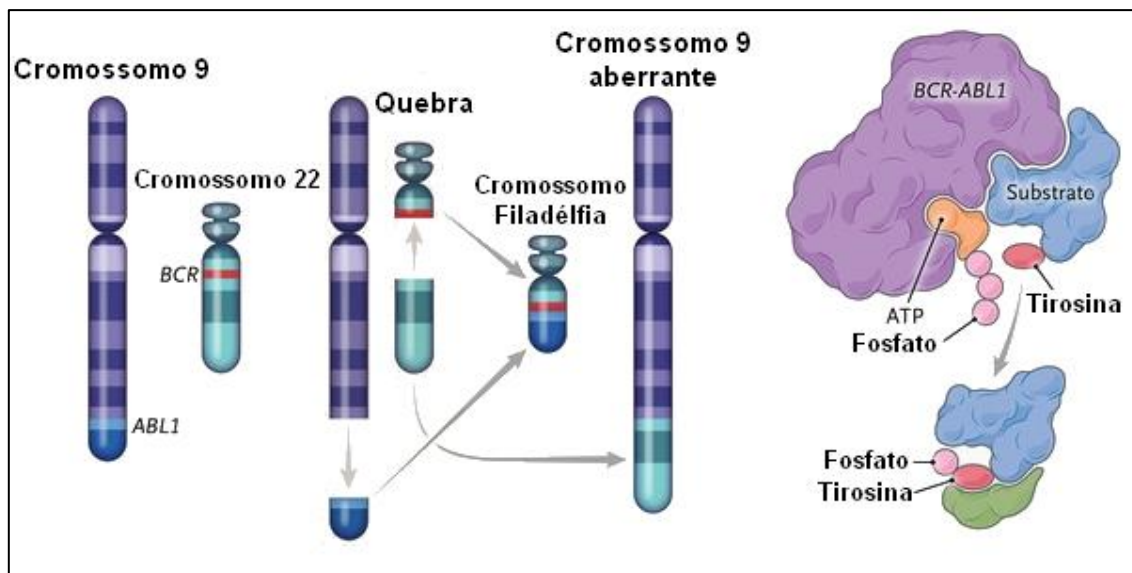
A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa maligna caracterizada por uma proliferação clonal de células-tronco

hematopoéticas (Figura 6) <sup>16</sup>. A LMC foi a primeira doença maligna relacionada a uma anormalidade citogenética, com patogênese amplamente estudada <sup>17</sup>. Os avanços neste campo permitiram o desenvolvimento de terapias direcionadas com inibidores de tirosina quinase (TKIs) com altas taxas de sucesso terapêutico, aumentando substancialmente a sobrevida do paciente e a prevalência da doença <sup>18</sup>. Quanto à incidência, a LMC atinge cerca de 0,7-1,3/100.000, com idade mediana no diagnóstico de 56-60 anos e uma razão masculino/feminino de 1,2-1,7, essa taxa tem se mantido estável nos últimos anos <sup>19</sup>. No que se refere ao perfil sociodemográfico dos pacientes com LMC, há uma predominância um pouco maior entre os homens, e o diagnóstico geralmente ocorre por volta da sexta ou sétima década de vida <sup>20</sup>.



**Figura 6. Diagrama ilustrando características dos genes de transformação de células-tronco hematopoéticas em clones de leucemia mieloide crônica (LMC).** Fonte: Minciacchi et al. (2021). Chronic Myeloid Leukemia: A Model Disease of the Past, Present and Future.

A LMC é caracterizada pela presença do cromossomo *Philadelphia*, resultado de uma translocação recíproca balanceada entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 [t (9; 22) (q34; q11)]. A fusão do gene da leucemia murina *Abelson* (*ABL*) no cromossomo 9 com o gene *breakpoint cluster region* (*BCR*) no cromossomo 22 resulta no gene de fusão *BCR-ABL1*, que codifica a oncoproteína BCR-ABL (Figura 7) <sup>16,21,22</sup>. Esta proteína é uma tirosina quinase persistentemente ativa que promove replicação irrestrita, diferenciação inadequada e resistência à apoptose <sup>23</sup>. A contínua proliferação dessas células-tronco com alta capacidade de diferenciação favorece o aparecimento de mutações adicionais que podem proporcionar resistência ao tratamento padrão representando um impacto negativo no prognóstico <sup>24</sup>.



**Figura 7. Características Genéticas do Cromossomo *Philadelphia*.** Fonte: Foà & Chiaretti. (2022). Philadelphia Chromosome–Positive Acute Lymphoblastic Leukemia.

Apesar da alta taxa de sucesso nos tratamentos com TKIs, o surgimento de resistência aos TKIs tem levado ao desenvolvimento de novos medicamentos e a imunoterapia tem sido considerada uma alternativa para esses pacientes, com o objetivo de reduzir a recorrência da doença e o uso crônico de medicamentos <sup>23,25</sup>.

#### 1.4. Atividade mitocondrial

Otto Warburg, a mais de 90 anos observou que as células tumorais produzem lactato excessivo na presença de oxigênio, um estado que ele chamou de "glicólise aeróbica" <sup>26–28</sup>. Durante o século XX, foi realizado um esforço

considerável para determinar se a via metabólica da glicólise aeróbica é devido a defeitos na fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS) e metabólicas <sup>29</sup>.

Muitos parâmetros celulares vitais são controlados pelas mitocôndrias. Estes incluem a regulação da produção de energia, a modulação do status de oxidação-redução (redox), a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), controle dos níveis do cálcio citosólico (Ca<sup>2+</sup>), contribuição para precursores biossintéticos citosômicos como acetil-CoA e pirimidinas, e iniciação da apoptose através da ativação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mtPTP). Mudanças nesses parâmetros podem afetar vias de biossíntese, vias de transdução de sinal celular, fatores de transcrição e estrutura de cromatina para mudar de um estado quiescente e diferenciado da célula para um que prolifera ativamente <sup>30</sup>.

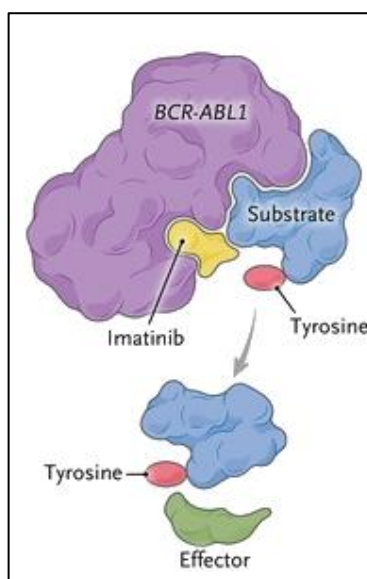
O DNA mitocondrial (mtDNA) contém os 13 genes relacionados a fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS), enquanto o DNA nuclear (nDNA) contém todos os genes OXPHOS restantes, bem como os genes para metabolismo mitocondrial e sua biogênese <sup>30</sup>.

A disfunção mitocondrial leva ao desequilíbrio lipídico e à superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS). O estresse oxidativo pode quebrar a homeostase no nível celular, como morte celular por apoptose, degeneração e necrose celular, peroxidação lipídica da membrana, superprodução de citocinas pró-inflamatórias, ativação das células hepáticas ou fibrogênese. Diferentes tipos de danos ao mtDNA podem causar mutações e deleções pontuais, aumentar o nível de 8-hidroxi-desoxiguanosina e o desenvolvimento de doença hepática gordurosa não alcoólica <sup>31</sup>.

A expressão de enzimas no metabolismo lipídico é regulada negativamente, incluindo os genes CPT1 e acil-CoA sintetase na translocação de ácidos graxos de cadeia longa ou outras enzimas envolvidas na  $\beta$ -oxidação, levando ao acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa no plasma. A  $\beta$ -oxidação defeituosa é provavelmente responsável pela depleção do dNTP e perda gradual do mtDNA do fígado <sup>32</sup>.

### 1.5. Mesilato de Imatinibe

O Mesilato de Imatinib (Gleevec®, Glivec®) é um inibidor de tirosina quinase sintético usado no tratamento da leucemia mieloide crônica (LMC) <sup>33</sup>. Foi especificamente desenvolvido para inibir a proteína de fusão da região do cluster de breakpoint (BCR)-Abelson (ABL) que resulta da anormalidade cromossômica conhecida como cromossomo *Philadelphia* (Figura 8) <sup>33,34</sup>. Também promove inibição dos receptores de tirosina quinases ligados a fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e de células-tronco <sup>34</sup>.



**Figura 8. Mecanismo de ação do Mesilato de Imatinibe.** Fonte: Foà & Chiaretti. (2022). Philadelphia Chromosome–Positive Acute Lymphoblastic Leukemia.

Estudos *in vitro*, mostraram que o Mesilato de Imatinibe inibiu significativamente o crescimento e induziu apoptose de células cromossomos-positivas *Philadelphia* derivadas do LMC (Ph+) expressando BCR-ABL, enquanto as linhagens de células normais não foram afetadas <sup>33,35</sup>. Também tem mostrado atividade *in vivo* em modelos de tumores regulados por PDGF, incluindo glioblastoma, dermatofibrosarcoma e leucemia mielomonocítica crônica. Os efeitos antiangiogênicos têm sido demonstrados pela inibição do PDGF, VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e bFGF (fator de crescimento do fibroblasto básico) <sup>36–38</sup>.

Estudos iniciais sobre alterações na medula óssea associadas à terapia do Mesilato de Imatinibe em pacientes com LMC sugeriram uma normalização da eritropoiese, produzindo mudanças acentuadas na histopatologia da medula óssea de pacientes que responderam à terapia <sup>39</sup>.

Resistência primária ou adquirida ao Mesilato de Imatinibe é comum em pacientes com LMC avançado. Existem vários mecanismos de resistência e a maioria envolve a reativação da sinalização BCR-ABL<sup>33</sup>. Medições seriais dos níveis de transcrição BCR-ABL e triagem mutacional ABL podem ajudar a identificar a presença de mutações de domínio de tirosina BCR-ABL e, assim, resistência emergente<sup>33,40</sup>.

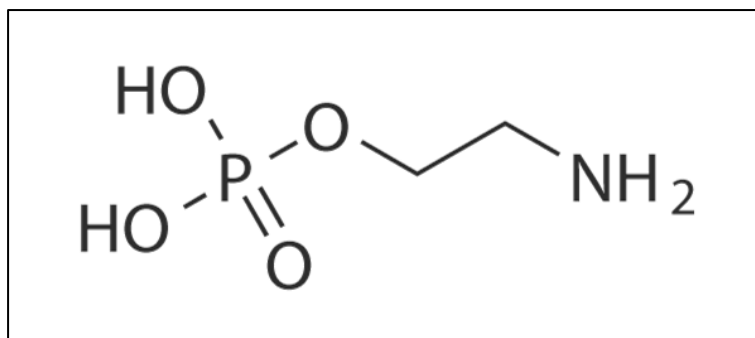
A combinação de Mesilato de Imatinibe e outros agentes terapêuticos, como interferon- $\alpha$ , citarabina e doxorubicina, tem sido demonstrada para melhorar os efeitos citotóxicos do Mesilato de Imatinibe *in vitro*<sup>39</sup>.

### **1.6. 2-Aminoetil Dihidrogeno Fosfato (2-AEH<sub>2</sub>F)**

O monofosfoester 2-AEH<sub>2</sub>F (Figure 9) é uma molécula envolvida no *turnover* de fosfolipídios, agindo como um precursor na síntese de fosfolipídios de membrana, entre eles fosfatidilcolina e da fosfatidiletanolamina, ambos participam das vias de sinalização lipídica atuando como ligantes ou gerando substratos intermediários<sup>41,42</sup>. Nosso grupo de pesquisa vem relatando efeitos antiproliferativos em uma ampla variedade de linhagens de células tumorais. Estudos *in vivo* o tratamento de camundongos com o 2-AEH<sub>2</sub>F exibe efeitos antiproliferativos em modelo de leucemia promielocítica aguda (APL) reduzindo o número de células mieloides imaturas CD117 e Gr-1 na medula óssea, baço e fígado. O 2-AEH<sub>2</sub>F reduz a expansão de clones com expressão de CD34/CD117, CD34 e Gr-1 na medula óssea. Além disso, 2-AEH<sub>2</sub>F induz a apoptose de células imaturas no baço e no fígado<sup>43</sup>.

Outro estudo *in vivo* avaliou a administração intravenosa do 2-AEH<sub>2</sub>F em doses escalonadas em cães, mostrando que a droga é segura, não foi observado advento de mortalidade durante o período de estudo ou toxicidade aguda. Não é um medicamento com propriedades hemolíticas ou que induza anemia. Não leva a alterações nas funções hepáticas e renais e foi capaz de modular a produção de leucócitos. 2-AEH<sub>2</sub>F é um composto com potencial antitumoral,

sendo útil para futuros tumores veterinários e humanos, como uma combinação de agentes quimioterápicos <sup>44</sup>.



**Figura 9. Estrutura química do 2-Aminoetil Dihidrogeno Fosfato.** Fonte:

<https://www.selleckchem.com/datasheet/o-phosphoethanolamine-S648301-DataSheet.html>.

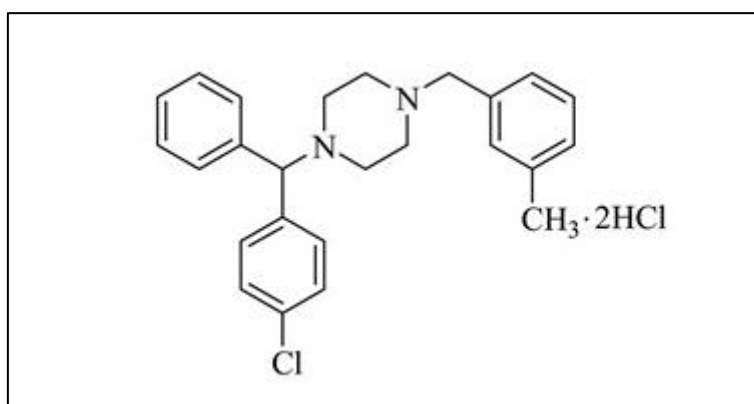
O 2-AEH<sub>2</sub>F apresenta efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos em células do melanoma (B16-F10 e SKMEL) induzindo uma parada na fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular com a perda do potencial mitocondrial e aumento da atividade da caspase-3 fosforilada. No modelo de carcinoma renal murino é mais sensível a 2-AEH<sub>2</sub>F quando comparado às células normais do túbulo proximal imortalizadas de ratos (IRPTC) e células endoteliais de veias umbilicais humanas (HUVEC), sendo capaz de induzir a fragmentação nuclear e afeta a organização do citoesqueleto através da ruptura dos filamentos de actina, potencializando inibição da formação de metástase pulmonar em camundongos nude, com uma eficácia superior quando comparado ao Sunitinibe <sup>45,46</sup>.

Foi observada atividade citotóxica para as células de câncer de mama humano triplo-negativo (MDA-MB-231) e diminuição significativa da produção de lipoperoxidos, aumento do DNA fragmentado e diminuição das fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> <sup>47,48</sup>. O 2-AEH<sub>2</sub>F também apresentou uma significância terapêutica para a leucemia mieloide crônica (K562), promovendo apoptose independente do perfil de expressão de genes resistência (MDR<sup>+</sup>) <sup>49</sup>.

## 1.7. Inibidores e Ativadores da atividade mitocondrial e da fosforilação oxidativa

### 1.7.1. Cloridrato de meclizina

O cloridrato de meclizina (MEC) é quimicamente conhecida como (RS)-1-[(4-clorofenil)(fenil)metil]-4-(3-metilbenzil)piperazina (Figura 10) é o primeiro da classe piperazina de anti-histamínico H1. Como muitos anti-histamínicos H1, o Cloridrato de meclizina tem atividade anticolinérgica, além de ser mostrada como alvo do receptor androstano constitutivo (CAR) <sup>50</sup>. A estrutura e o comportamento biológico da meclizina é semelhante à buclizina, cetirizina, ciclizina e hidroxizina <sup>51,52</sup>.



**Figura 10. Estrutura química do Cloridrato de meclizina.** Fonte: Peraman et al. (2015). A Stability-Indicating RP-HPLC Method for the Quantitative Analysis of Meclizine Hydrochloride in Tablet Dosage Form.

O CAR receptor nuclear é um membro da superfamília de receptores de hormônios esteroides e hormônios tireoidianos, sendo um fator de transcrição que está envolvido na regulação de genes xenobióticos e intermediários do metabolismo. O CAR tem sido reconhecido como um receptor nuclear sensível a xenobióticos que transcricionalmente regula a expressão de enzimas de desintoxicação e transportadores envolvidos no metabolismo e eliminação de substâncias endógenas e exógenas tais como bilirrubina, esteroides e xenobióticos <sup>53</sup>.

O CAR está envolvido na regulação do metabolismo de lipídios, glicose e ácidos biliares <sup>54</sup>. O CAR humano exhibe propriedades únicas em comparação com outros receptores nucleares ou com seus ortólogos de roedores, incluindo alta atividade constitutiva, tanto direta como dependente de domínio de ligação



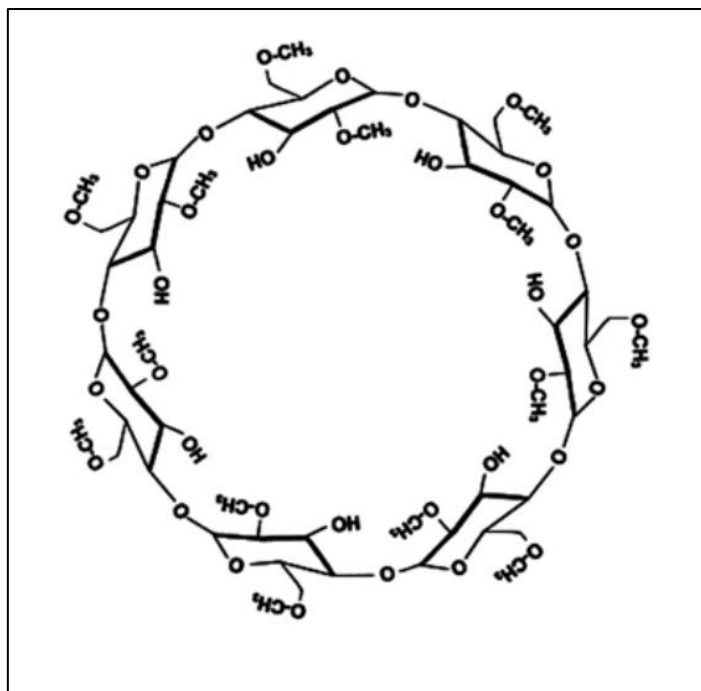
do ligante (LBD) e ativação independente de LBD, e localização nuclear espontânea em linhagens de células tumorais <sup>55</sup>.

A inibição da respiração celular pelo Cloridrato de meclizina foi demonstrada, e ao contrário dos inibidores respiratórios clássicos (antimicina e rotenona), a meclizina não inibe a respiração em mitocôndrias isoladas, mas sim em células intactas. Foi relatado anteriormente que este efeito é independente do seu comportamento anti-histaminérgico e atividade anticolinérgica, mas o mecanismo de ação ainda é desconhecido <sup>56</sup>.

Para entender o mecanismo de ação do Cloridrato de meclizina, um estudo foi realizado por GOHIL et al. (2013) utilizando o perfil metabólico global do tratamento com a meclizina em células para detectar alterações nos metabólitos intracelulares <sup>50</sup>. O perfil metabólico revelou acentuado aumento nos níveis intracelulares de fosfoetanolamina, que é um intermediário no CDP-etanolamina (Etn) resultante da biossíntese da fosfatidiletanolamina (PE) da via de Kennedy. Os experimentos bioquímicos confirmaram a inibição direta da fosfoetanolamina citidililtransferase (PCYT2), uma enzima limitante da CDPEtn na via de Kennedy. A inibição da PCYT2 resulta em acumulação da fosfoetanolamina, que por sua vez inibe diretamente a respiração mitocondrial. Esse trabalho identificou um novo alvo molecular de Cloridrato de meclizina e liga a CDP-Etn da via de Kennedy com a respiração mitocondrial <sup>50</sup>.

### **1.7.2. Metil- $\beta$ -ciclodextrina**

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos não tóxicos derivados do amido ( $\alpha$ -D-glicose), exibem superfície externa hidrofílica e cavidade central lipofílica <sup>57</sup>. O interior da cavidade da ciclodextrina pode abrigar drogas pouco solúvel em água, enquanto o exterior hidrofílico aumenta a sua solubilidade. CDs são nomeadas de acordo com o número de unidades de unidades  $\alpha$ -d-glucopyranose presentes na sua estrutura, seis ( $\alpha$ -CD), sete ( $\beta$ -CD), oito ( $\gamma$ -CD) ou mais <sup>58</sup>. As  $\beta$ -CD (Figura 11) e seus derivados, metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) e 2-hidroxiopropil- $\beta$ -CD são utilizados principalmente em estudos sobre a manipulação do colesterol em membranas. M $\beta$ CD (Figura 10) são moléculas que são amplamente utilizadas para remover e para carregar colesterol a partir de membranas artificiais e naturais <sup>58</sup>.



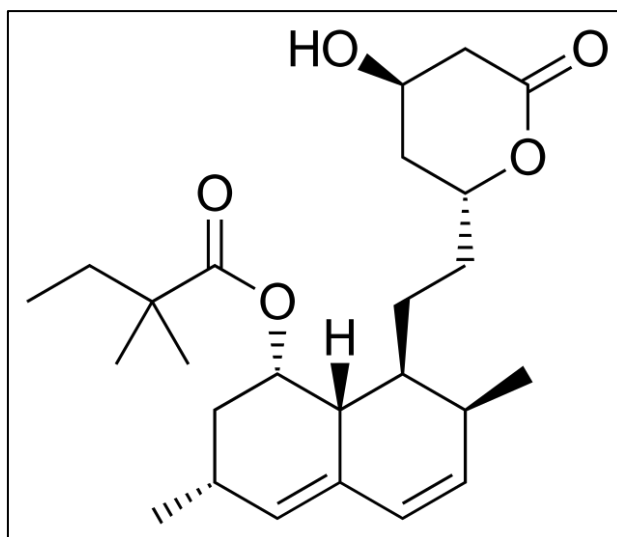
**Figura 11. Estrutura química da metil- $\beta$ -ciclodextrina.** Fonte: Mahammad & Parmryd. (2014). Cholesterol Depletion Using Methyl- $\beta$ -cyclodextrin.

Garofalo et al. (2005) relata que M $\beta$ CD induz ruptura dos microdomínios *raft-like* em mitocôndrias isoladas de células de linfoblastos humanos impedido a despolarização das mitocôndrias e a liberação do citocromo C após o tratamento com disialoganglioside (GD3) ou t-Bid, proteína pró-apoptótica <sup>59</sup>. Além disso, em outro estudo foi observado um efeito inibitório da M $\beta$ CD na abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (mPTP) induzida por rBAX. M $\beta$ CD diminuiu o teor do colesterol e gangliosídeo na mitocôndria do córtex do rim de rato <sup>60</sup>.

Uma resistência semelhante na abertura do mPTP induzida por rBAX, foi observado nas mitocôndrias do córtex do rim de ratos com hipotireoidismo que foram caracterizadas por ter menor teor de colesterol e gangliosídeo. Em geral, estes dados sugerem que a composição lipídica dos microdomínios *raft-like* da membrana mitocondrial, podem desempenhar um papel importante na regulação de fases iniciais de apoptose. Portanto, há uma hipótese de que o rompimento de microdomínios *raft-like* mitocondriais por remoção do colesterol poderia afetar a estrutura mitocondrial e do metabolismo energético <sup>61</sup>.

### 1.7.3. Sinvastatina

A sinvastatina (Figura 12) é um inibidor de hidroximetilglutaril A redutase (HMG-CoA) enzima limitante da taxa de biossíntese do colesterol que catalisa a conversão de HMG-CoA em ácido mevalônico. É um medicamento comumente usado para redução da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), triglicérides e apolipoproteína B, e um aumento modesto da lipoproteína de alta densidade (HDL) <sup>62,63</sup>. O único efeito adverso importante, embora raro, é a miopatia, um efeito compartilhado por todos os membros da classe; quando grave, isso pode assumir a forma de rabdomiólise, que pode levar a insuficiência renal aguda <sup>62</sup>. O mecanismo da miopatia não é compreendido. Segundo Collins et al. (2016) relata que a causa dos efeitos adversos das estatinas nas células musculares ainda é desconhecida, embora muitas das evidências apontem para alterações nas mitocôndrias <sup>64</sup>.



**Figura 12. Estrutura química da Sinvastatina.** Fonte:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54454>

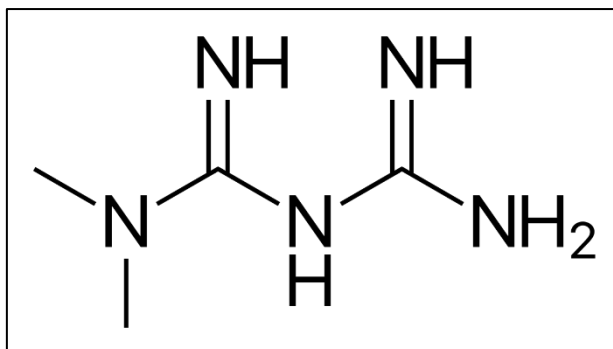
Para tanto, a via do MVA também resulta na síntese de isoprenóides importantes, como o farnesil pirofosfato (FPP) e o geranylgeranyl pirofosfato (GGPP); precursores do colesterol e outros produtos que regulam várias funções celulares <sup>64</sup>. Farnesilação e geranylgeranilação envolvem a síntese de dolícois, usados para N-glicosilação e síntese de ubiquinona (coenzima Q10), um componente da cadeia de transporte de elétrons (ETC). Além disso, FPP e GGPP são necessários para a função adequada de proteínas-chave da membrana, como a família Rho de guanosina trifosfatases (GTPases). Os

isoprenóides FPP e GGPP funcionam ativando GTPases por meio da prenilação, facilitando assim sua fixação às membranas celulares e permitindo a ativação das vias de transdução de sinal <sup>65</sup>.

A interrupção dessas proteínas celulares preniladas, podem ter consequências significativas em relação à apoptose, transporte vesicular, dinâmica mitocondrial e controle de qualidade <sup>66</sup>. Collins et al. (2016) também relatam uma associação com diabetes em pacientes em terapia de longo prazo com estatinas, com pouca percepção mecanicista. No entanto, variações genéticas da HMG-CoA redutase foram identificadas em populações diabéticas <sup>64-66</sup>. Além disso, foi relatado que as estatinas reduzem a captação de glicose nas células tumorais, mas a caracterização adicional da utilização da glicose após a exposição às estatinas é limitada <sup>67</sup>. Esses resultados auxiliam na definição dos complexos mecanismos de toxicidade dos compostos de estatina, permitindo discussões sobre o potencial uso da sinvastatina em outros espaços patológicos, como terapia adjuvante aos quimioterápicos tradicionais <sup>68</sup>.

### **1.10. Metformina**

A metformina (Figura 13) é um antidiabético da classe das biguanidas, indicada para tratamento de hiperglicemia no diabetes tipo 2 e melhora o controle glicêmico sem induzir hipoglicemia ou ganho de peso <sup>62,63</sup>. Estudos mostraram que a metformina atua no fígado, onde inibe a gliconeogênese bloqueando o balanço mitocondrial redox <sup>71</sup>. No entanto, uma compreensão completa do mecanismo de ação da metformina permanece desconhecida, seus efeitos da droga são provavelmente pleiotrópicos. Por exemplo, a metformina também tem se mostrado um sensibilizador de insulina e provavelmente age no lúmen intestinal através de múltiplos mecanismos <sup>70</sup>.



**Figura 13. Estrutura química da metformina.** Fonte:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4091>

Propriedades quimiopreventivas e antitumorais diretas vem sendo identificadas para a metformina em vários estudos clínicos em andamento, sendo utilizado sozinho ou em combinação com esquemas quimioterápicos para determinar prospectivamente sua segurança e eficácia no tratamento <sup>72-76</sup>. A metformina ativa a quinase dependente de AMP (AMPK), seja através do supressor de tumor LKB1, ou promovendo um aumento nas razões AMP/ATP, como resultado da inibição moderada da cadeia de transporte de elétrons <sup>72,77</sup>.

Embora a ativação da AMPK e a subsequente inibição da sinalização induzida por mTOR tenham sido sugeridas para mediar os efeitos antitumorais da metformina, as propriedades inibidoras do crescimento independentes de AMPK desse agente em células tumorais também foram descritas [48-52] 50], sugerindo que a antagonização do transporte de elétrons, por si só pode ser citostática ou citotóxica para as células de câncer.

O presente trabalho busca avaliar os efeitos antitumorais e antiproliferativos da associação de medicamentos já empregados em outras terapias, envolvidos na modulação da cadeia respiratória, metabolização lipídica e inibidores da tirosina quinase, com o 2-aminoetil dihidrogeno fosfato em modelo de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.

## 2. Objetivos

---

---

## 2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos antitumorais e de modulação da atividade mitocondrial do Cloridrato de meclizina, Metil- $\beta$ -ciclodextrina, Sinvastatina, Metformina e do monofosfoester 2-AEH<sub>2</sub>F obtidos por diferentes processos de síntese (Fórmula 1 e Fórmula 2) associados ao Mesilato de Imatinibe, em célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.

## 2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a viabilidade celular das células tumorais após os tratamentos e suas associações para a obtenção dos valores da concentração inibitória IC<sub>50</sub> da linhagem;
- Determinar a curva de crescimento pelo teste CSFE-DA;
- Avaliar a viabilidade dos neutrófilos, após tratamentos com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e F2;
- Avaliar a toxicidade do 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e F2 nos leucócitos monomorfonucleares após tratamentos;
- Analisar a distribuição das populações celulares nas das fases do ciclo celular por citometria de fluxo;
- Avaliar a expressão dos marcadores de superfície e citoplasmáticos, e de controle e progressão do ciclo celular e apoptose por citometria de fluxo;
- Determinar o potencial elétrico mitocondrial das células tumorais por citometria de fluxo;

## 3. Materiais e Métodos

---

---



### 3.1. Caracterização da molécula 2-AEH<sub>2</sub>F

O 2-aminoetil dihidrogeno fosfato 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e F2 utilizado no presente projeto foi avaliado e caracterizada por espectrometria de massa (ms/ms) usando um espectrômetro de massa modelo MICROTOF – Bruker Daltonics.

### 3.2. Cultura celular

Foi utilizada a linhagem tumoral de leucemia mieloide crônica humana: K562 originária da *American Type Culture Collection* (ATCC), tendo o código CCL-243<sup>TM</sup>, mantida e estocada no banco de células pelo Dr. Durvanei Augusto Maria (Laboratório de Desenvolvimento e Inovação, Instituto Butantan). Após descongelamento as células foram transferidas para garrafa de cultura celular (25 cm<sup>2</sup>), contendo o meio de cultura meio Dulbecco MEM (DMEM – Sigma) suplementado com soro fetal bovino 10%, bicarbonato de sódio 200 mM, pH 7,4 em estufa 5% CO<sub>2</sub> à 37°C. As células em suspensão foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 10<sup>5</sup> células/mL<sup>-1</sup>. A viabilidade celular foi determinada pelo teste de exclusão pelo azul de Tripán, sendo considerada ideal para a execução dos experimentos a viabilidade superior a 94%.

### 3.3. Determinação da atividade citotóxica pelo método MTT

As células tumorais foram incubadas em placas de 96 orifícios a concentração 1x10<sup>5</sup> células/mL<sup>-1</sup> durante 24h e tratadas com os grupos descritos abaixo, em diversas concentrações. Após 24h de tratamento o sobrenadante foi desprezado e adicionado 100 µL da solução de MTT (Calbiochem – Darmstadt, Alemanha) na concentração de 5 mg/mL<sup>-1</sup>, as células foram incubadas por 3h em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após este período, o conteúdo foi removido e acrescenta-se 100 µL de álcool metílico para dissolver os cristais de formazan formados e precipitados. A quantificação da absorbância foi feita em leitor de ELISA em comprimento de onda de 540 nm. A concentração que induz toxicidade em 50% das células (IC<sub>50</sub>) foi determinada no tratamento após 24h em diferentes concentrações para avaliação do efeito dose-resposta.

**Tabela 1.** Relação dos grupos de tratamentos para a célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.

| <b>Grupos</b>      | <b>Tratamentos</b>                                |
|--------------------|---|
| <b>GRUPO I</b>     | Controle sem tratamento                           |
| <b>GRUPO II</b>    | 2-AEH <sub>2</sub> F F1                           |
| <b>GRUPO III</b>   | 2-AEH <sub>2</sub> F F2                           |
| <b>GRUPO IV</b>    | Cloridrato de Meclizina                           |
| <b>GRUPO V</b>     | Metil-β-Ciclodextrina                             |
| <b>GRUPO VI</b>    | Sinvastatina                                      |
| <b>GRUPO VII</b>   | Metformina  |
| <b>GRUPO VIII</b>  | Mesilato de Imatinibe                             |
| <b>GRUPO IX</b>    | 2-AEH <sub>2</sub> F F1+Mesilato de Imatinibe     |
| <b>GRUPO X</b>     | 2-AEH <sub>2</sub> F F2+Mesilato de Imatinibe     |
| <b>GRUPO XI</b>    | Cloridrato de Meclizina+Mesilato de Imatinibe     |
| <b>GRUPO XII</b>   | Metil-β-Ciclodextrina+Mesilato de Imatinibe       |
| <b>GRUPO XIII</b>  | Sinvastatina+Mesilato de Imatinibe                |
| <b>GRUPO XIV</b>   | Metformina+Mesilato de Imatinibe                  |
| <b>GRUPO XV</b>    | 2-AEH <sub>2</sub> F F1 + Cloridrato de Meclizina |
| <b>GRUPO XVI</b>   | 2-AEH <sub>2</sub> F F1 + Metil-β-Ciclodextrina   |
| <b>GRUPO XVII</b>  | 2-AEH <sub>2</sub> F F1 + Sinvastatina            |
| <b>GRUPO XVIII</b> | 2-AEH <sub>2</sub> F F1 + Metformina              |
| <b>GRUPO XIX</b>   | 2-AEH <sub>2</sub> F F2 + Cloridrato de Meclizina |
| <b>GRUPO XX</b>    | 2-AEH <sub>2</sub> F F2 + Metil-β-Ciclodextrina   |
| <b>GRUPO XXI</b>   | 2-AEH <sub>2</sub> F F2 + Sinvastatina            |
| <b>GRUPO XXII</b>  | 2-AEH <sub>2</sub> F F2 + Metformina              |

#### **3.4. Avaliação das ultraestruturas por microscopia eletrônica de varredura**

As células tumorais foram incubadas em placas de 6 orifícios na concentração  $1 \times 10^5$  células/mL<sup>-1</sup>. Após o tratamento com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 no período de 12h, em seguida, as amostras foram coletadas e

fixadora de glutaraldeído 5% e formaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 por 2h a temperatura ambiente, sob agitação constante. Posteriormente foram fixadas com uma solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 por 1h. Após a fixação, as amostras foram centrifugadas, levadas com o tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 por 10min, esse processo se repetiu por três vezes. O material foi desidratado gradualmente em etanol 70% e 90%, por 15 min e em etanol 100% duas vezes por 15 min, em seguida, passado em óxido de propileno duas vezes por 15 min. O material incluído em resina foi submetido ao tratamento com óxido de propileno/resina Epon® (2:1) por 3h, seguido de óxido de propileno/Resina Epon® (1:1) overnight, no dia seguinte colocado em resina pura por 2h, seguido de mais 2h em uma câmara de vácuo. Para a polimerização o material foi colocado em estufa a 60 °C por 48h. Os cortes semi-finos e ultra-finos e a montagem das telas, foram feitos no laboratório de processamento para Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. As análises das telas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão foram realizadas no microscópio marca Morgani modelo 268D.

### **3.5. Análise das fases do ciclo celular e DNA fragmentado por Citometria de Fluxo**

As células tumorais foram submetidas aos tratamentos por período de 24h. As células tratadas e do grupo controle foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 min. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensão em solução de etanol absoluto gelado com RNase e armazenado no freezer -20°C por 24h. As amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 min e ressuspensas em 200 µL de tampão Facs, 20 µL de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e 50 µg/mL de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich), mantidas por 30 min à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após este período as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 min, o *pellet* foi ressuspensão em tampão Facs Flow e transferidas para tubos de citometria e levadas para análise em citômetro de fluxo FACScanto (BD) em intensidade de fluorescência FL-1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest - BD.

### **3.6. Análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo**

A rodamina-123 é um fluorocromo específico para a marcação mitocondrial em células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior destas organelas, fluorescendo em verde. Alterações em nível de integridade mitocondrial podem ser detectadas pelo aumento da fluorescência verde citosólica, indiciando uma difusão da rodamina-123 da mitocôndria para o citosol <sup>78</sup>. As amostras das células tumorais dos grupos tratados e os grupos controles foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e adicionados 200µl de solução (MitoRed – 200nM+ DMEM completo). Em seguida, as amostras foram mantidas em estufa 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por 30 min. Após este período, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 100 µL de tampão FACS Flow. A leitura e análise da marcação da rodamina-123 nas células foi realizada em citômetro de fluxo FACScanto (BD) em intensidade de fluorescência FLH-1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest - BD.

### **3.7. Ensaio de Proliferação CFSE-DA**

Células tumorais tratadas, foram incubadas com o marcador carboxifluoresceína (CFSE-DA - Thermo Fisher, K17C34571). O CFSE-DA foi diluído em PBS 0,1% de albumina humana e adicionado 5µl ao meio das células logo em seguida ao tratamento. O tempo de marcação foi de 10 min a 37°C, homogeneizando a cada 3 min. As células foram lavadas e ressuspensas em 500µl de meio de cultura DMEM. Após 24 e 48h de tratamento as células foram analisadas por citometria de fluxo - FACScanto (BD), os dados foram gerados no programa ModFit LT 5.0, fornecendo os índices usados para avaliar a proliferação espontânea de células marcadas com CFSE, e porcentagem de células divididas e índices de taxa de divisão celular usados neste estudo.

### **3.8. Avaliação da Expressão de marcadores celulares por Citometria de Fluxo**

Alíquotas de 100 µL das suspensões de células tumorais obtidas dos tratamentos *in vitro* foram incubadas por 1h a 4°C, com 1 µg de anticorpo

específico. Foram utilizados os seguintes marcadores envolvidos nas vias de morte e proliferação celular como p53, caspase 3, bax, bad, bcl-2, citocromo C, PCNA, DR-4. Após este período as células foram centrifugadas a 1200 rpm e lavadas com PBS gelado. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspenso em 200 µL de Tampão Facs Flow contendo 0,1% de paraformaldeído. A leitura e análise da expressão dos receptores na superfície celular das células tumorais foi realizada em citômetro de fluxo FACScanto (BD) em intensidade de fluorescência FL-1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest - BD.

### **3.9. Separação das células polimorfonucleares e mononucleares pelo método Ficoll-paque.**

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram coletadas de 6 indivíduos, sendo 3 do sexo masculino e 3 do sexo feminino, isoladas por gradiente de densidade Ficoll-Paque™ Plus® (GEHealthcare, EUA, n°. cat. 17-1440-03) (densidade 1,077g/cm<sup>3</sup>) em fluxo laminar sob condições estereis. Resumidamente, 10mL de sangue periférico foram adicionados a 10mL de meio de cultura celular RPMI-1640® (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA, n°. cat. R7638) contendo 2mM de L-glutamina (GIBCO™ Invitrogen, Grand Island, EUA, n°. cat. 21051-024) e 2mM de 2-mercaptoetanol (Invitrogen, Grand Island, EUA, n°. cat. 21985-023). A solução celular resultante foi cuidadosamente colocada sobre a fase de Ficoll e submetida à centrifugação (2000 rpm) por 40 minutos a 18°C. Após a centrifugação, a camada de células mononucleares, localizada na interfase entre a camada de Ficoll e do plasma, foi coletada e transferida para tubo cônico de 15mL, que foi completado com RPMI1640®, e submetido à centrifugação (1500 rpm) por oito minutos. Posteriormente, procedeu-se à lise das hemácias utilizando-se 10mL de solução de cloreto de amônio (0,8% de NH<sub>4</sub>Cl, 0,1mM EDTA). Realizada nova centrifugação (1500 rpm por 5 minutos), o *pellet* celular resultante foi ressuspendido em 200 µL de tampão Facs, e adicionado 50 µg/mL de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich), mantidas por 30 min à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após este período as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min, o *pellet* foi ressuspenso em tampão Facs Flow e transferidas para tubos de citometria e levadas para análise em citômetro

de fluxo FACScanto (BD) em intensidade de fluorescência FL-1 e os DensityPlots adquiridos e analisados pelo programa FCS Express.

### 3.10. Avaliação da citotoxicidade do 2-AEH<sub>2</sub>F para linfócitos

Para as avaliações da resposta proliferativa dos leucócitos mononucleares, foram contadas em câmara de Neubauer com teste de exclusão por azul de Trypan (EMD Chemicals Inc., Gibbstown, EUA, cat. n° 368-12), o que permitiu verificar a viabilidade dos linfócitos, bem como o ajuste do número de células para  $1 \times 10^7$  células/mL. Em seguida, as células foram incubadas em placas de 96 poços e expostas em diferentes concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e 2-AEH<sub>2</sub>F F2. Após 24h de tratamento o sobrenadante foi desprezado e adicionado 100 µL da solução de MTT (Calbiochem – Darmstadt, Alemanha) na concentração de 5 mg/mL<sup>-1</sup>, as células foram incubadas por 3h em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após este período, o conteúdo foi removido e acrescenta-se 100 µL de álcool metílico para dissolver os cristais de formazan formados e precipitados. A quantificação da absorbância foi feita em leitor de ELISA em comprimento de onda de 540 nm. A concentração que induz toxicidade ou proliferação foi determinada no tratamento após 24h em diferentes concentrações para avaliação do efeito dose-resposta.

### 3.11. Análise *in silico* do efeito sinérgico das associações

Para determinar a potencial sinergia das formulações, foi realizado o estudo matricial com o Mesilato de Imatinibe associado as demais drogas. A matriz de combinação foi testada na célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562. O software SynergyFinder 2.0 quantificou o grau de sinergia como o excesso sobre o efeito multiplicativo de drogas únicas como se tivessem agido independentemente (Bliss). As seguintes formulações de ordem superior foram usadas para quantificar a sinergia da combinação de drogas (S) para o efeito de combinação múltipla de drogas medido entre 2 drogas:

$$S_{BLISS} = E_{A,B} - (E_A + E_B)$$

$$SynergyScore = \frac{-10g(p)}{\log(0.05)} \times \frac{t}{|t|}$$

### **3.12. Análises estatísticas**

Todos os valores obtidos da célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 serão expressos em média  $\pm$  desvio médio e após a obtenção dos valores individuais de cada linhagem celular tratada e controle, os resultados serão tabelados e analisados no programa Graphpad, Version 5.0 e InStatPad Prism Version 7.0. A análise dos dados foi realizada pelas comparações de dois ou mais grupos com distribuição não paramétrica utilizando-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação múltipla de TUKEY-KRAMER considerando como nível crítico para significância valores de  $p < 0.05$ .

## 4. Resultados

---

---

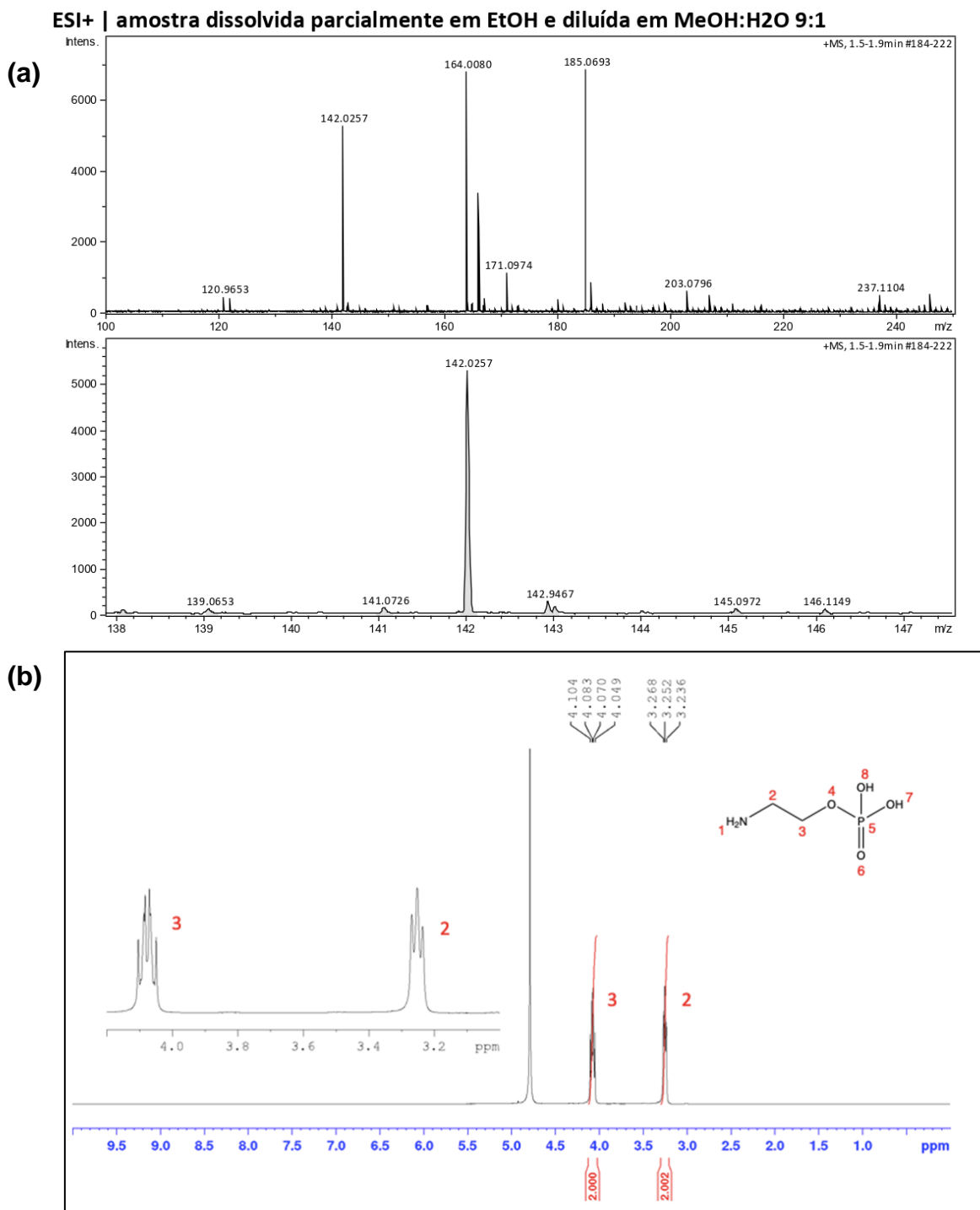


#### 4.1. Caracterização do composto 2-AEH<sub>2</sub>F

Os dados obtidos pela análise em espectrometria de massas (MS/MS) demonstraram conter o 2-aminoetil dihidrogeno fosfato nas diferentes preparações analisadas, levando em consideração o peso molecular de 141,063g/mol, em correspondência ao peso de 142,0257 obtidos pelo espectrômetro MICROTOF-Bruker Daltonics (Figura 14 A).

Foi realizada uma análise por RMN <sup>1</sup>H (300 MHz Inova, Varian) de uma amostra de 2-AEH<sub>2</sub>F F2 (sigma-aldrich) para obtenção do seu perfil espectral para a comparação com os espectros dos produtos das reações exploradas. Para tanto foi utilizado 1,5 mg de padrão (2-AEH<sub>2</sub>F F2) em 700 µL de água deuterada (D<sub>2</sub>O, óxido de deutério, sigma-aldrich).

O espectro mostra dois sinais referentes aos hidrogênios ligados aos átomos 2 e 3 e outro relativo ao solvente. O sinal dos hidrogênios do átomo 2 (Figura 14 B) apresenta um deslocamento químico ( $\delta$ ) em 3,25 ppm (t, 2, 2H), a integral do sinal mostra que existem dois hidrogênios equivalentes (CH<sub>2</sub>). Os hidrogênios do átomo 3 apresentam um  $\delta$  4,07 ppm e integral de dois hidrogênios (CH<sub>2</sub>), no entanto, este se apresenta como um quarteto, mas é considerado um multiplete, pois ocorre um acoplamento heteronuclear, <sup>3</sup>J<sub>PH</sub> e outro <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>, devido ao isótopo de fósforo ter uma abundância natural próxima a do hidrogênio. O efeito do acoplamento ocorrido com os hidrogênios alquílicos mais próximos do fósforo permitiu que as reações fossem monitoradas por RMN <sup>1</sup>H, indicando a formação de produtos ligados ao fósforo. Os hidrogênios dos grupos amina, hidroxila e fosfato não apresentam sinais no espectro de RMN <sup>1</sup>H, pois, acontece uma troca entre os átomos de deutério e hidrogênios específico desses grupos e por terem um tempo relaxamento muito rápido.



**Figura 14.** Varredura em massas representativos por infusão direta em espectro (MS/MS) MICROTOF-Bruker Daltonics do composto 2-aminoetil dihidrogeno fosfato. **(a)** 2-AEH<sub>2</sub>F F1. As medidas de massa foram realizadas em modo positivo, com faixa de massa entre 100-240 m/z, energia iônica de 5,0 V, fluxo de gás nitrogênio de 12,0 L min<sup>-1</sup>, multiplicador de 1,0, capilar de 3,0 kV e tensão de cone de 35 V. **(b)** 2-AEH<sub>2</sub>F F2. Espectro de RMN 1H 300 MHz do 2-AEH<sub>2</sub>F em D<sub>2</sub>O ( $\delta$  4.79 ppm).

#### 4.2. Determinação da atividade citotóxica dos compostos isolados pelo método colorimétrico MTT.

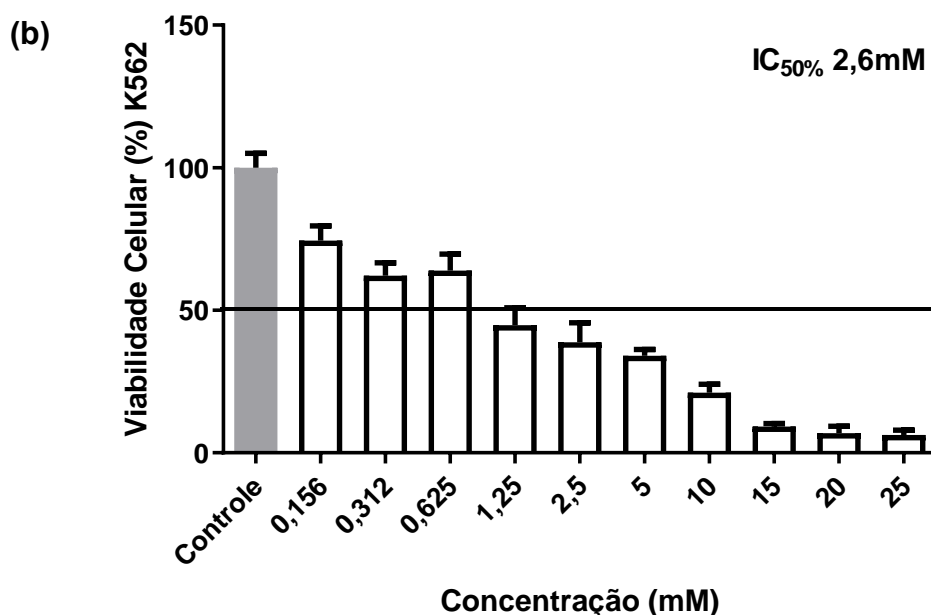
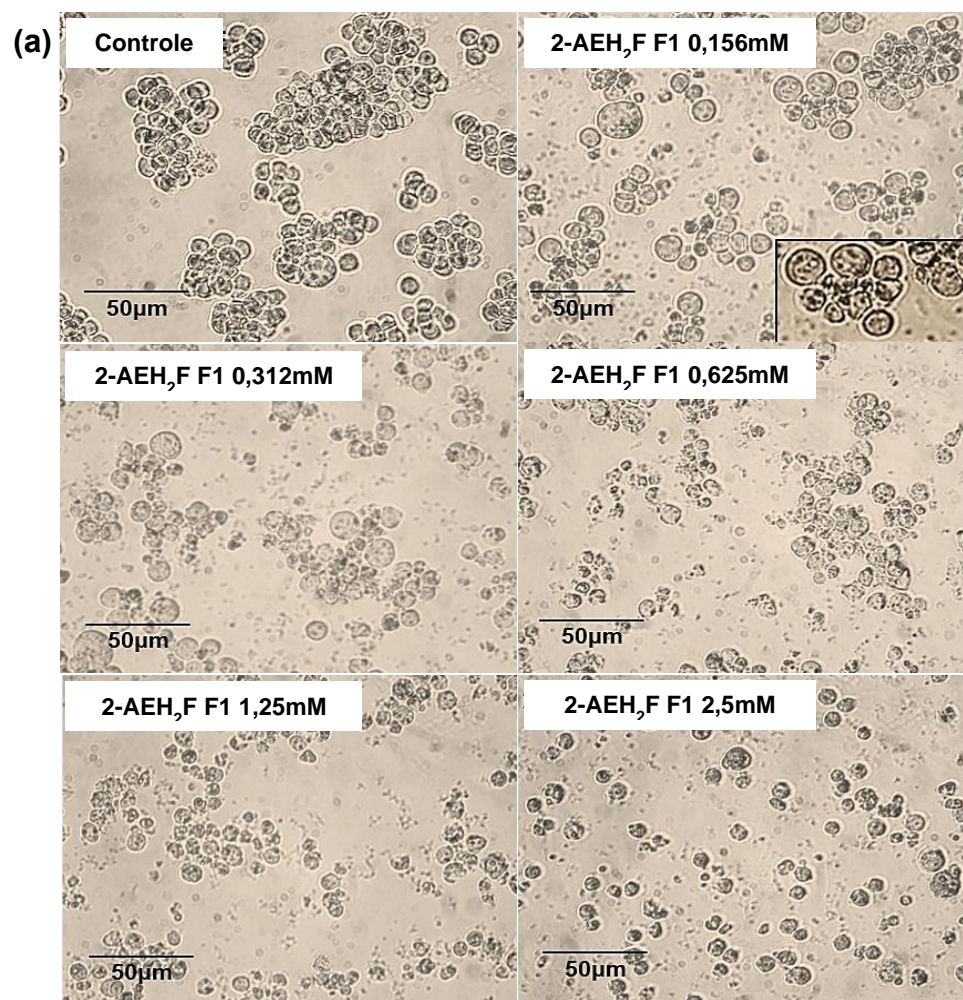
A capacidade de induzir toxicidade foi avaliada e fotodocumentada, com utilização de microscópio óptico invertido. A célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 foi submetida a todos os tratamentos descritos na Tabela 1 do item 3.3. Foram observadas alterações morfológicas, sendo possível observar células com aumento do volume citoplasmático, vacuolização e fragmentação celular para maioria dos tratamentos isolados.

Os resultados da avaliação da viabilidade demonstraram que os 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 induziram citotoxicidade desde as menores concentrações com valores de IC<sub>50%</sub> 2,8mM e 1,9mM, respectivamente, como apresentado na Tabela 2. Foi possível observar desagregação celular e aumento do volume intracelular nas menores concentrações (0,156mM-0,625mM), enquanto nas maiores concentrações (1,25mM-2,5mM) foi observada retração celular e formação de *debri* celular no sobrenadante (Figuras 15 e 16 A-B).

**Tabela 2.** Valores de IC<sub>50%</sub> obtidos após os tratamentos com compostos isolados na célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 por um período de 24h.

|  | TRATAMENTO              | IC <sub>50%</sub> 24 H |
|--|-------------------------|------------------------|
| <b>Célula de Leucemia<br/>Mieloide Crônica<br/>Humana - K562</b> | 2-AEH <sub>2</sub> F F1 | 2,6 mM                 |
|  | 2-AEH <sub>2</sub> F F2 | 1,9 mM                 |
|  | Cloridrato de Meclizina | 2,8 mM                 |
|  | MβCD                    | SE                     |
|  | Metformina              | 30 mM                  |
|  | Sinvastatina            | 12 mM                  |
|  | Mesilato de Imatinibe   | 0,06 mM                |

SE= Sem efetividade



**Figura 15. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células tumorais foram tratadas com diferentes concentrações com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias representativas da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

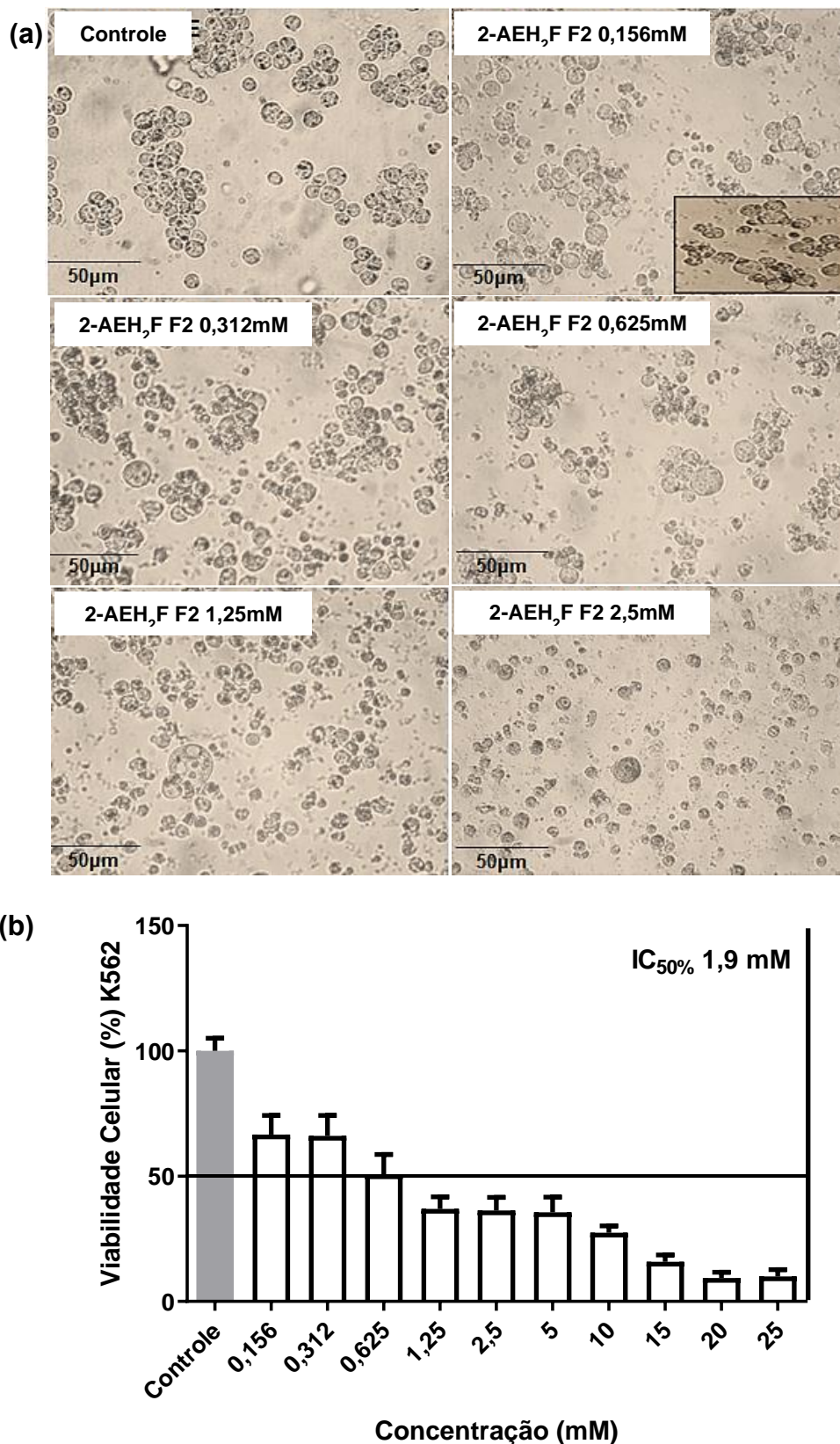
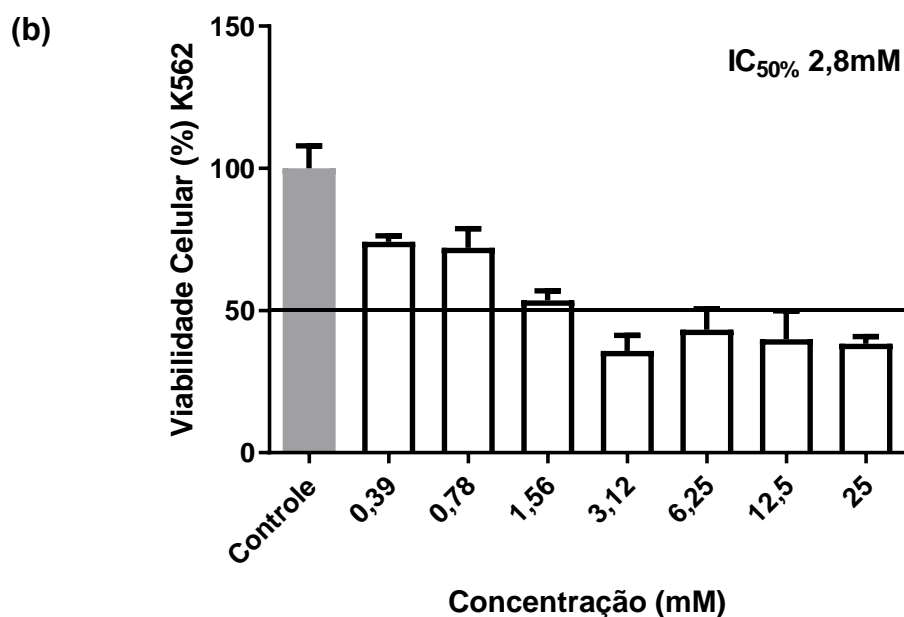
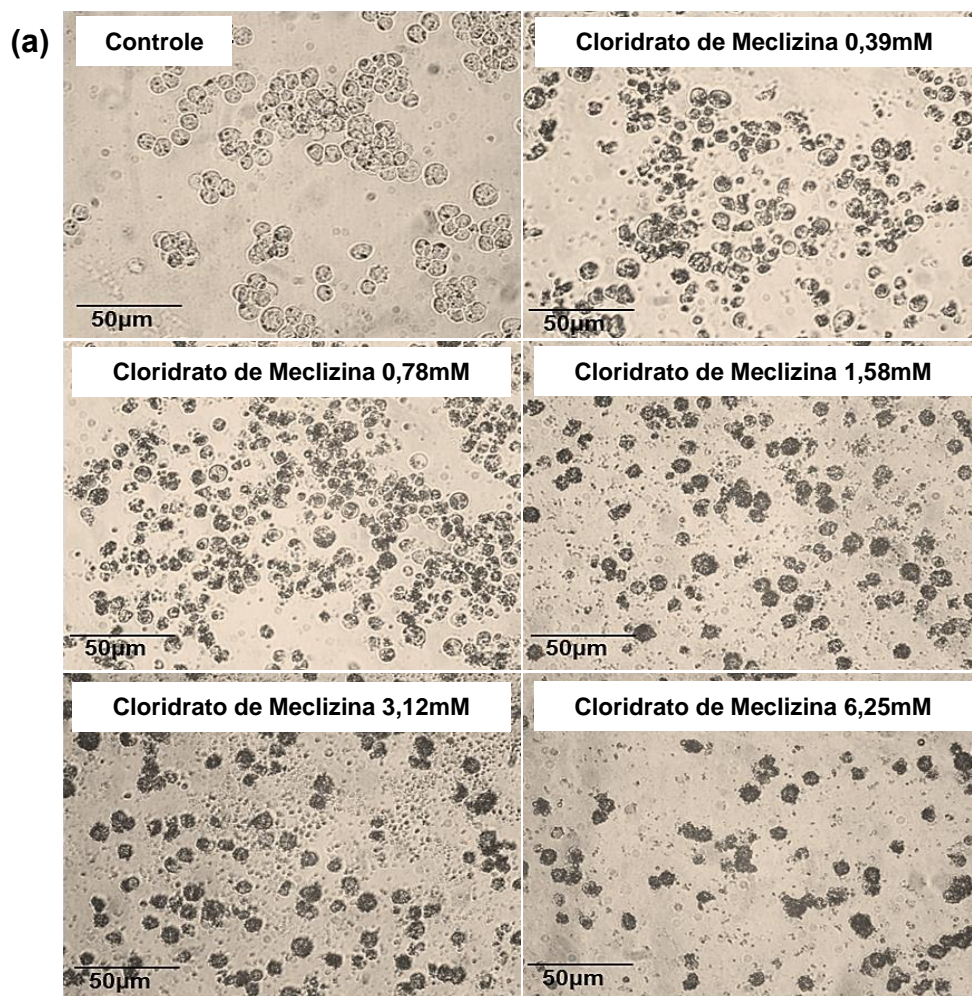


Figura 16. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT. As células foram tratadas com diferentes concentrações com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 no período de 24h. (a) Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; (b) Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

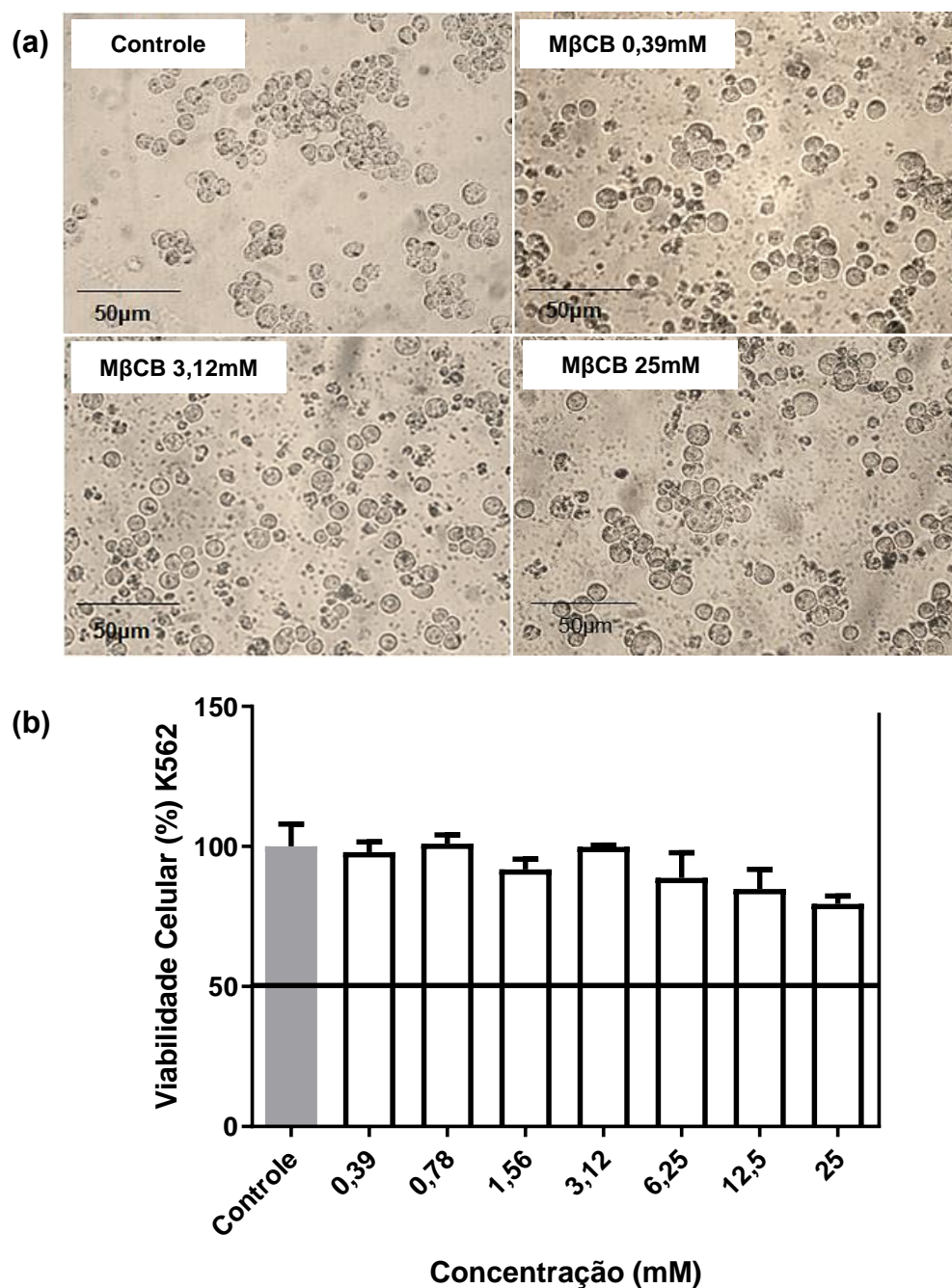
O tratamento com o Cloridrato de Meclizina, também apresentou efetividade na indução de citotoxicidade nas células tumorais da linhagem K562, com valor de  $IC_{50\%}$  de 2,8mM (Tabela 2), resultando em alterações morfológicas importante, como retração citoplasmática, desagregação dos agrupamentos celulares. É possível observar nas maiores concentrações, deposição de precipitado na membrana da célula, podendo ser decorrente do próprio tratamento (Figura 17 A-B). O tratamento com a Metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) não apresentou atividade citotóxica para a célula tumoral (Figura 18 A-B).

A Metformina apresentou toxicidade para as células tumorais a partir da concentração de 6,25mM, com valor de  $IC_{50\%}$  de 30mM (Tabela 2). As alterações morfológicas foram basicamente aumento do volume intracelular, que se acentua com o aumento da concentração do tratamento, com pouco desagregação celular, ainda sendo observado a característica de formação de “cachos” no sobrenadante em todas as concentrações como visto no grupo controle sem tratamento (Figura 19 A-B). O tratamento com a Sinvastatina também apresentou citotoxicidade para a célula tumoral, com obtenção de valor de  $IC_{50\%}$  de 12mM (Tabela 2). As alterações morfológicas são semelhantes as descritas anteriormente para o tratamento com a Metformina (Figura 20 A-B)

Também foi avaliada a sensibilidade da célula tumoral ao tratamento com um quimioterápico tradicionalmente utilizado para esse grupo, o Mesilato de Imatinibe. Foi identificado um valor de  $IC_{50\%}$  de 0,06mM para o tratamento no período de 24h (Tabela 2). As alterações morfológicas são perda da agregação celular, aumento do volume intracelular e formação de *debris* no sobrenadante dose-dependente (Figura 21).

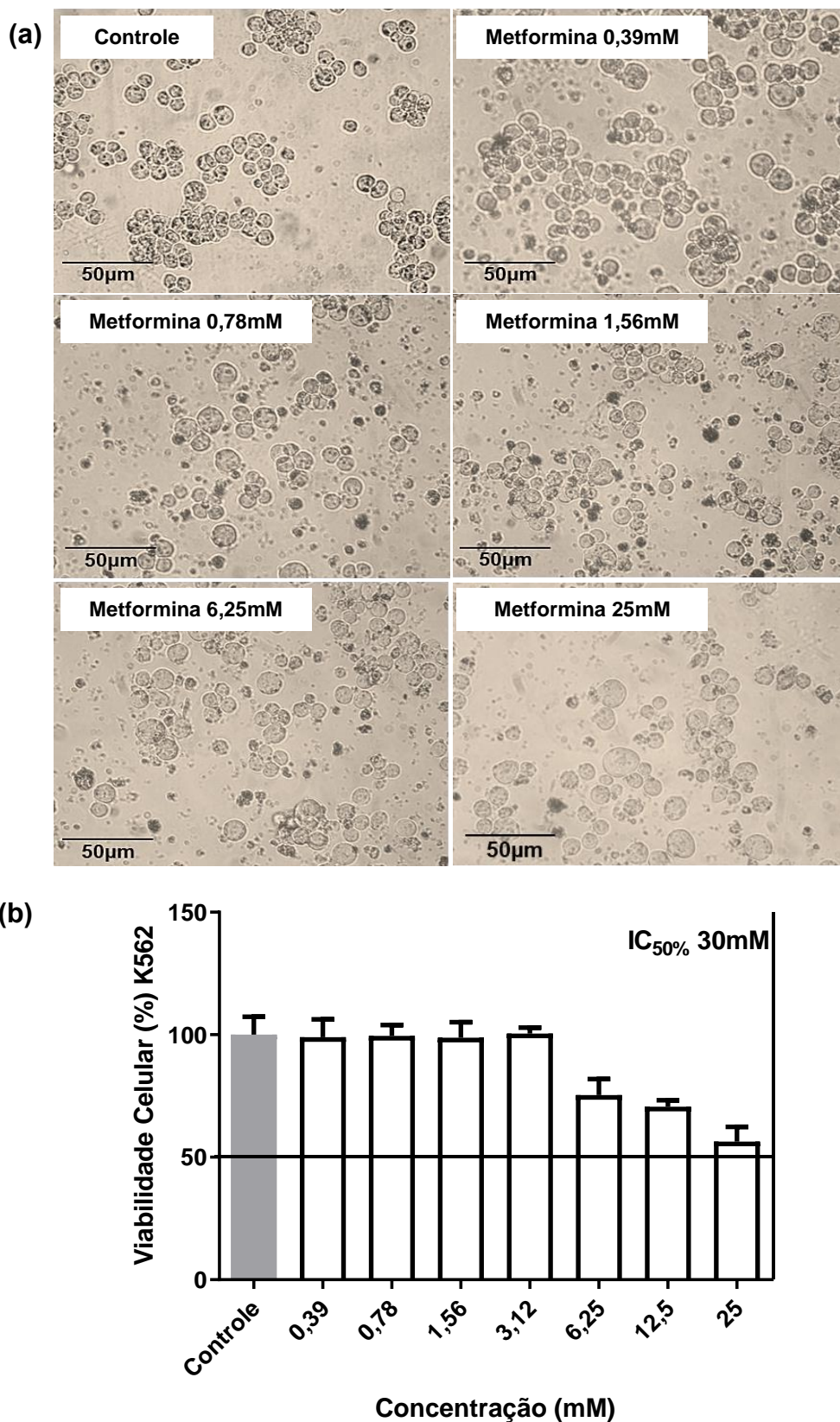


**Figura 17. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com diferentes concentrações com o Cloridrato de Meclizina no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

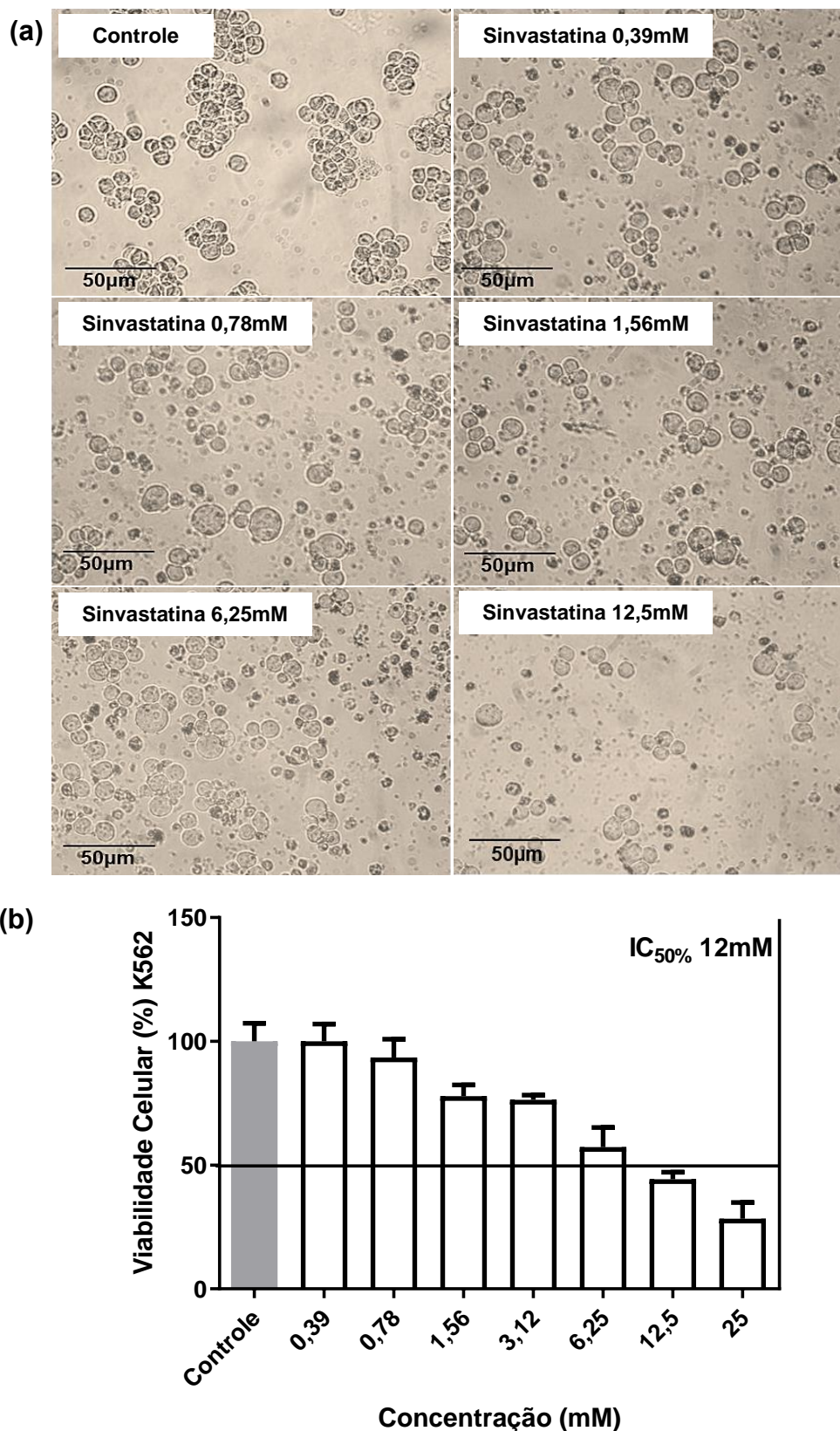


**Figura 18. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com diferentes concentrações com a Metil- $\beta$ -ciclodextrina no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes.

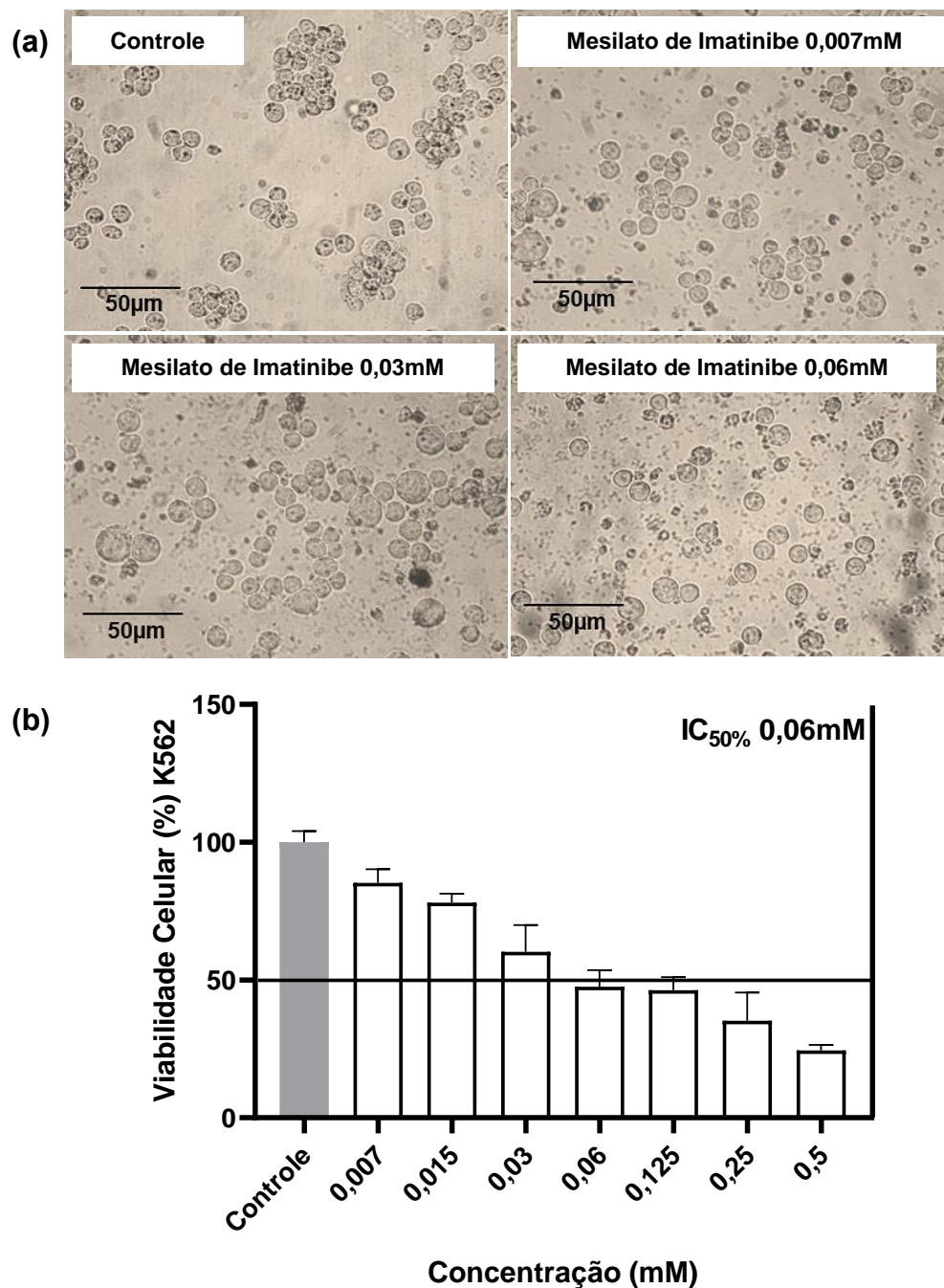




**Figura 19.** Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT. As células foram tratadas com diferentes concentrações com a Metformina no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes.



**Figura 20.** Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT. As células foram tratadas com diferentes concentrações com a Simvastatina no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.



**Figura 21. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com diferentes concentrações com o Mesilato de Imatinibe no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

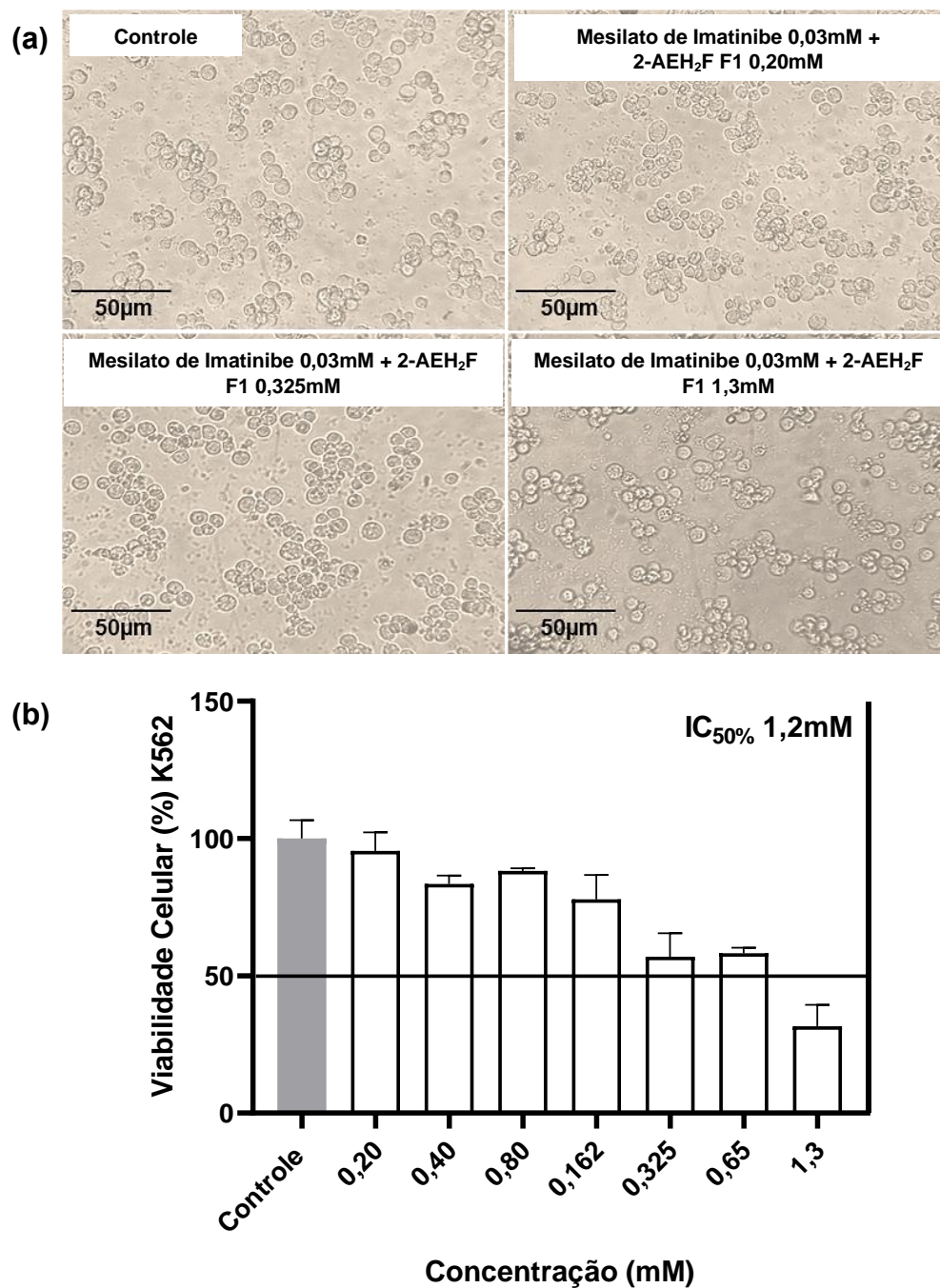
#### 4.3. Determinação da atividade citotóxica dos compostos associados ao Mesilato de Imatinibe pelo método colorimétrico MTT.

A célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 foi submetida a todos os tratamentos descritos na Tabela 1 do item 3.3. Foi observada alterações morfológicas, sendo possível observar células com aumento do volume citoplasmático, fragmentação celular e formação de estruturas semelhantes a corpos apoptóticos, para maioria dos tratamentos quando associados ao Mesilato de Imatinibe na metade do valor do IC<sub>50%</sub> obtido, levando em consideração que essa concentração isolada não acarreta nenhuma citotoxicidade ou alteração morfológica.

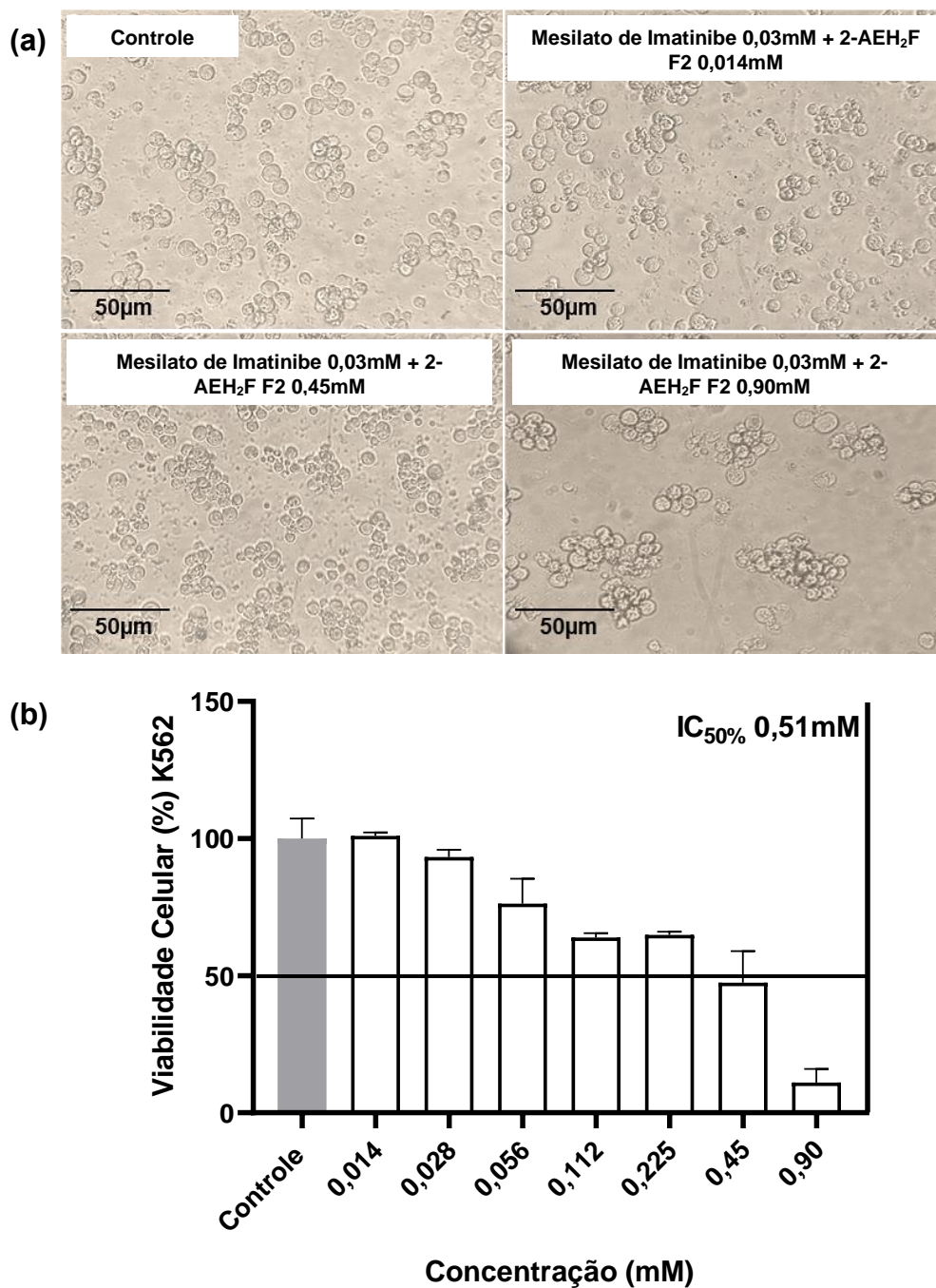
O tratamento associado do Mesilato de Imatinibe+2-AEH<sub>2</sub>F F1, promoveu redução do valor de IC<sub>50%</sub> de 2,6 mM do 2-AEH<sub>2</sub>F F1 para 1,2 mM, sendo 53,9% menor que concentração do composto isolado. Resultado foi semelhante para a associação do Mesilato de Imatinibe+2-AEH<sub>2</sub>F F2, onde o valor de IC<sub>50%</sub> do 2-AEH<sub>2</sub>F F2 de 1,9mM, quando associado, o valor de IC<sub>50%</sub> para 0,51mM, promovendo uma redução de 73,1% (Tabela 3). As alterações morfológicas observadas são retração citoplasmáticas sendo em algumas das concentrações utilizadas e formação de debri no sobrenadante, os tratamentos não promoveram desagregação celular (Figura 22 e 23 A-B).

**Tabela 3.** Valores de IC<sub>50%</sub> obtidos após os tratamentos com associação com Mesilato de Imatinibe na célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 por um período de 24h.

|  | TRATAMENTO                                      | IC <sub>50%</sub> |
|--|---|-------------------|
| <b>Célula de<br/>Leucemia Mieloide<br/>Crônica Humana -<br/>K562</b> | Mesilato de Imatinibe+2-AEH <sub>2</sub> F F1   | 1,2 mM            |
|  | Mesilato de Imatinibe+2-AEH <sub>2</sub> F F2   | 0,51 mM           |
|  | Mesilato de Imatinibe + Cloridrato de Meclizina | 0,9 mM            |
|  | Mesilato de Imatinibe + MβCD                    | SE                |
|  | Mesilato de Imatinibe + Metformina              | SE                |
|  | Mesilato de Imatinibe + Sinvastatina            | 5,1 mM            |



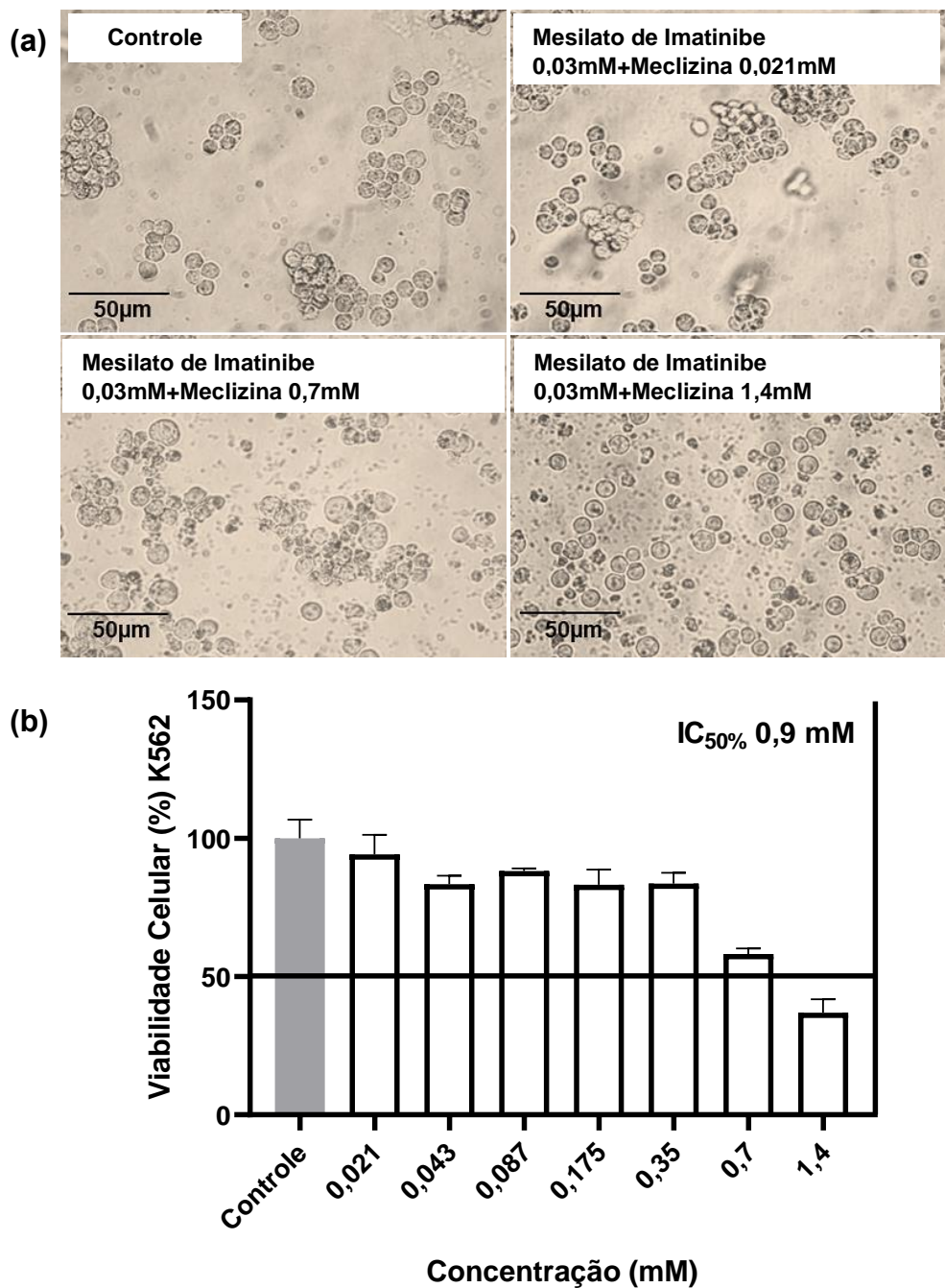
**Figura 22. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o Mesilato de Imatinibe na concentração de 0,03mM associado ao 2-AEH<sub>2</sub>F F1 em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.



**Figura 23. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o Mesilato de Imatinibe na concentração de 0,03mM associado ao 2-AEH<sub>2</sub>F F2 em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

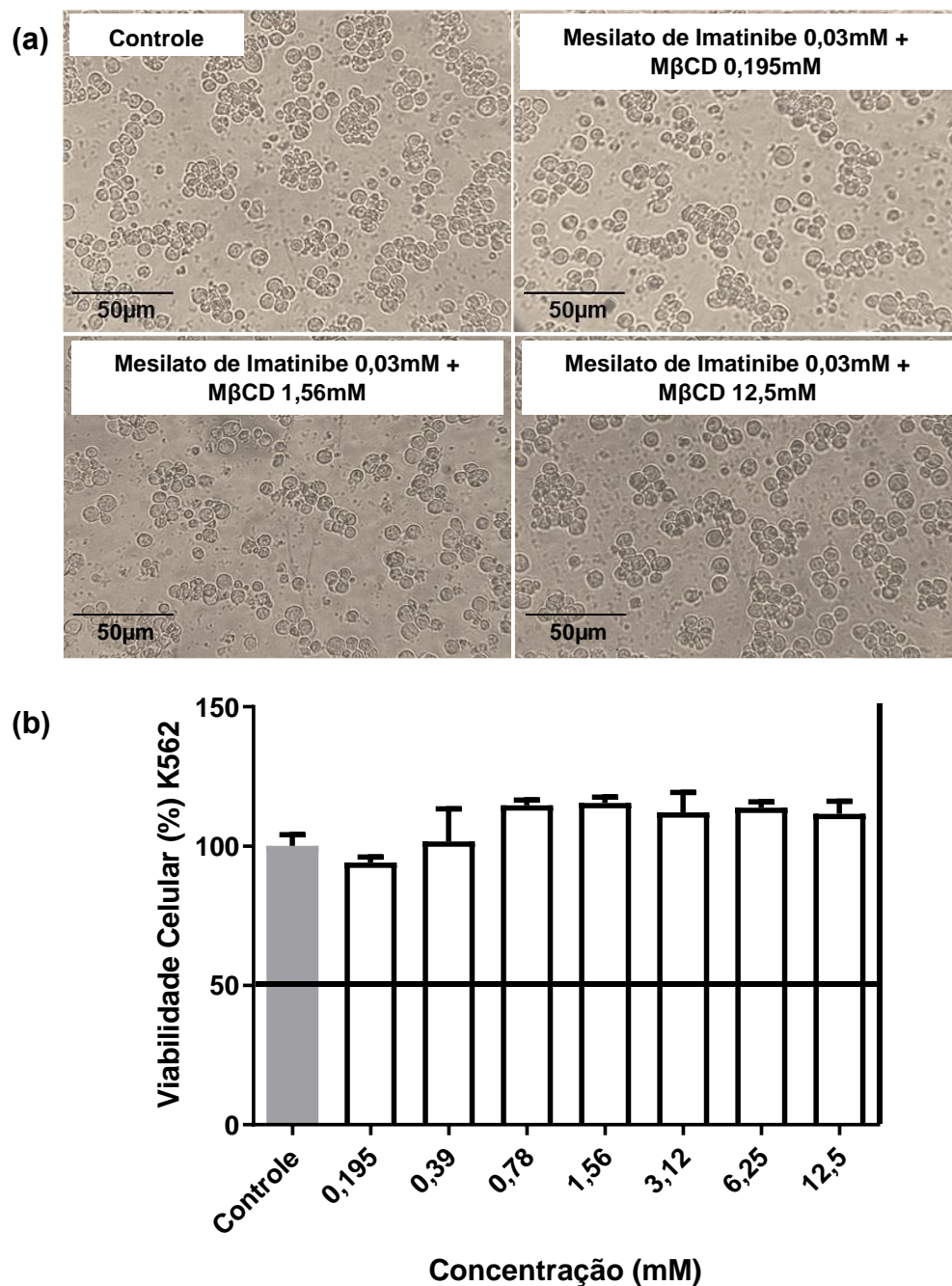
A associação do Mesilato de Imatinibe com o Cloridrato de Meclizina também foi eficiente na indução de toxicidade para a célula tumoral, o valor de  $IC_{50\%}$  obtido para o Cloridrato de Meclizina isolado foi de 2,8mM, quando associado, esse valor foi reduzido para 0,9mM, resultando em uma redução de 67,8% (Tabela 3). É possível observar desagregação celular, aumento do volume intracelular e debris celular no sobrenadante a partir da concentração de 0,7mM (Figura 24). Não foi observado efetividade na indução de citotoxicidade para o tratamento com a M $\beta$ CD isolado ou quando associado ao Mesilato de Imatinibe (Figura 25). Resultado semelhante foi observado para a associação do Mesilato de Imatinibe com a Metformina, não sendo observado toxicidade para a célula tumoral nas concentrações utilizadas (Figura 26).

A associação da Sinvastatina com Mesilato de Imatinibe também apresentou efetividade na redução da concentração do tratamento. Quando isolada, a Sinvastatina apresentou valor de  $IC_{50\%}$  de 12mM, associada ao Mesilato de Imatinibe, a concentração foi reduzido para 5,1mM, havendo uma redução de 57,5% (Tabela 3). É possível observar presença de debris celular no sobrenadante (Figura 27).

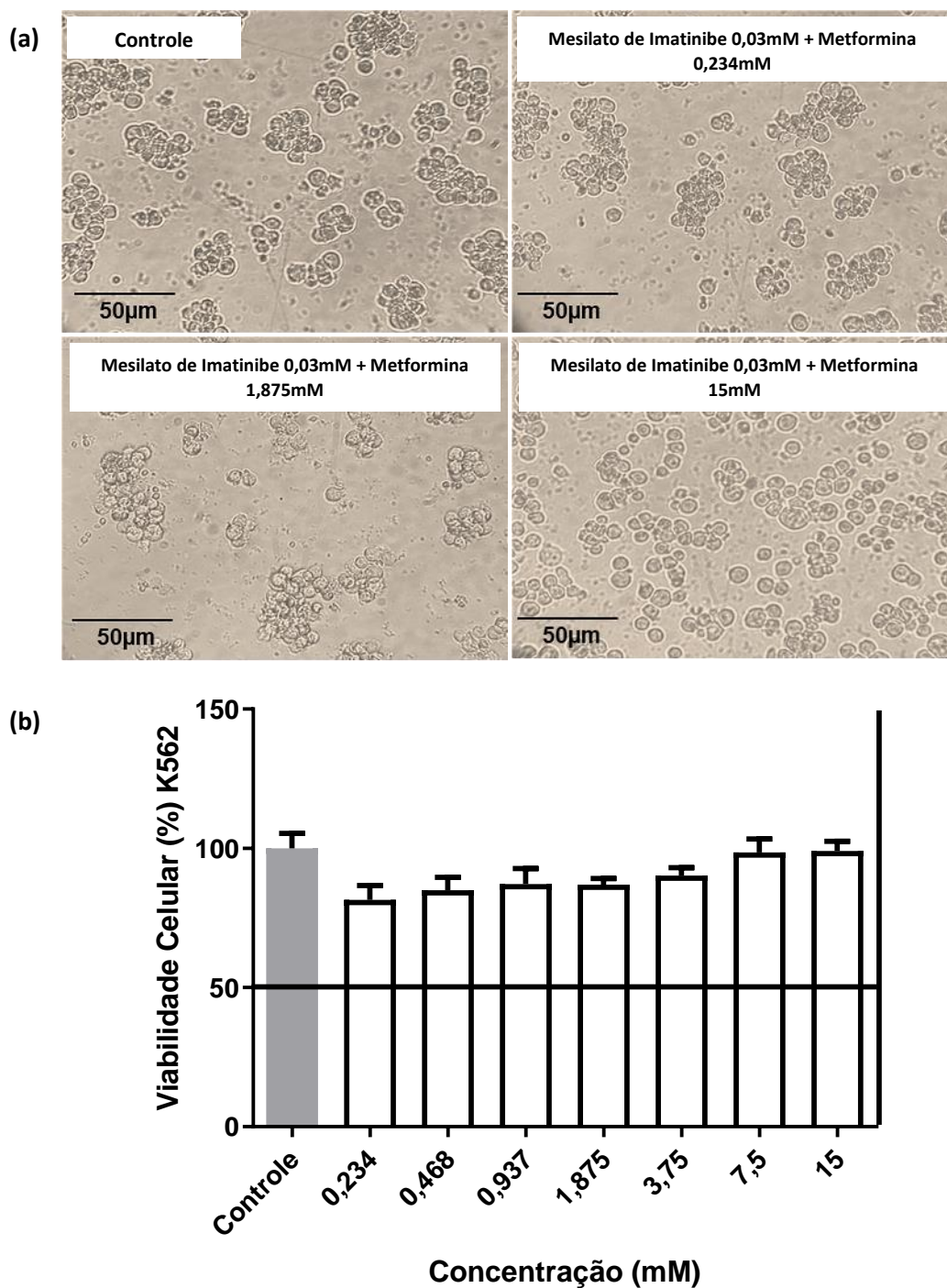


**Figura 24. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o Mesilato de Imatinibe na concentração de 0,03mM associado ao Cloridrato de Meclizina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

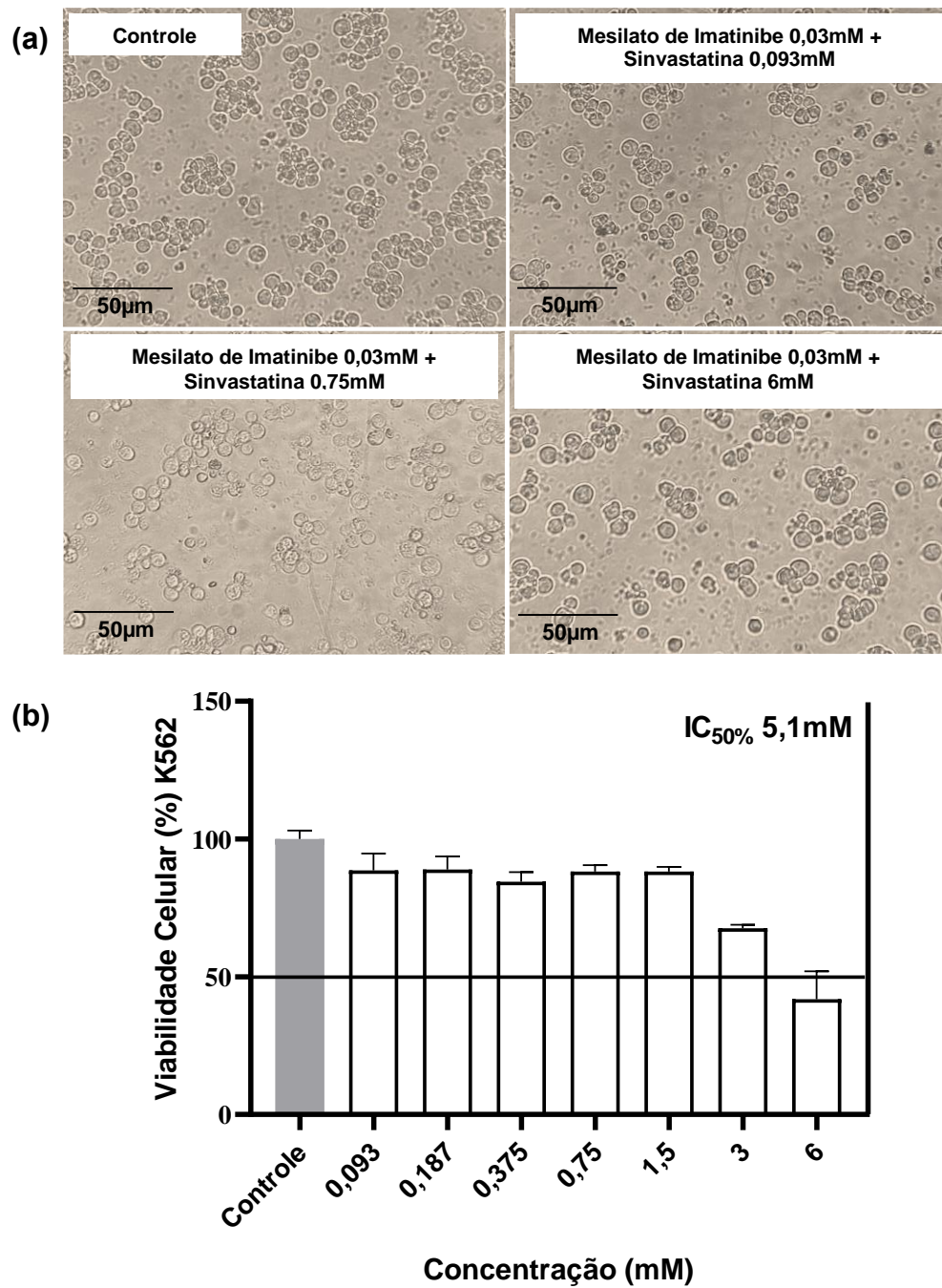




**Figura 25. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o Mesilato de Imatinibe na concentração de 0,03mM associado a Metil- $\beta$ -Ciclodextrina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes.



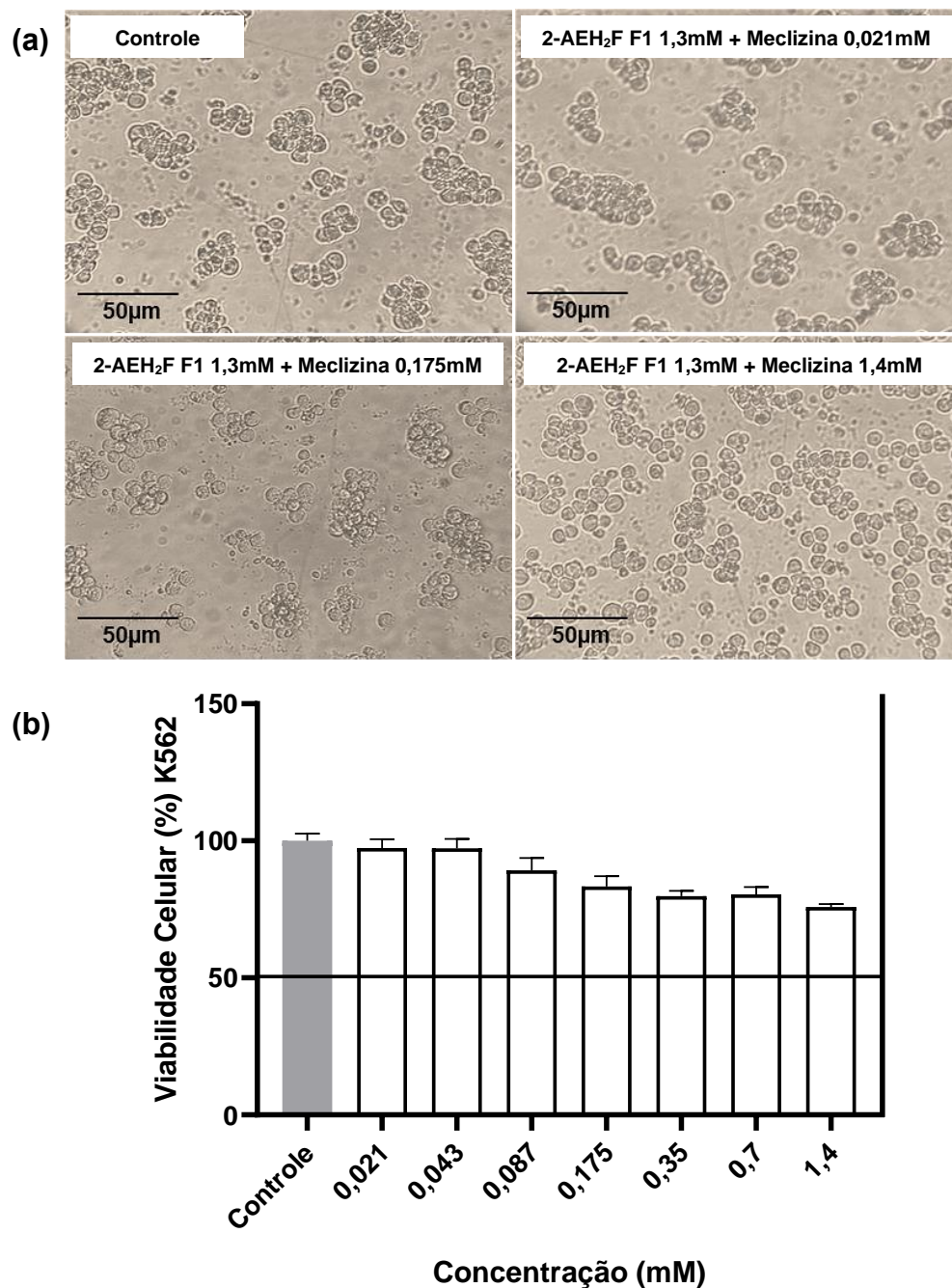
**Figura 26. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o Mesilato de Imatinibe na concentração de 0,03mM associado a Metformina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.



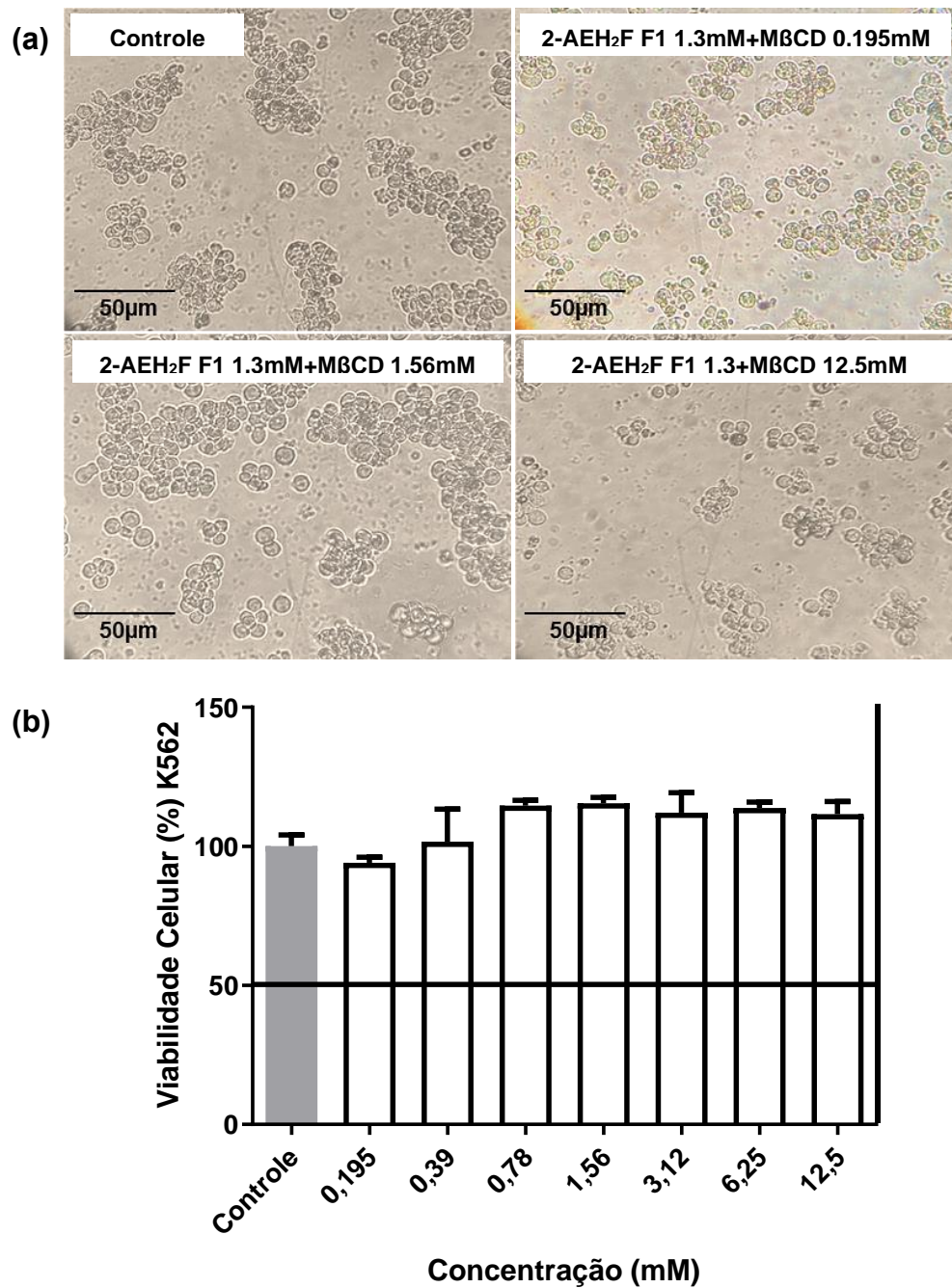
**Figura 27. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o Mesilato de Imatinibe na concentração de 0,03mM associado a Sinvastatina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes.

#### **4.4. Determinação da atividade citotóxica dos compostos associados ao 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e F2 pelo método colorimétrico MTT.**

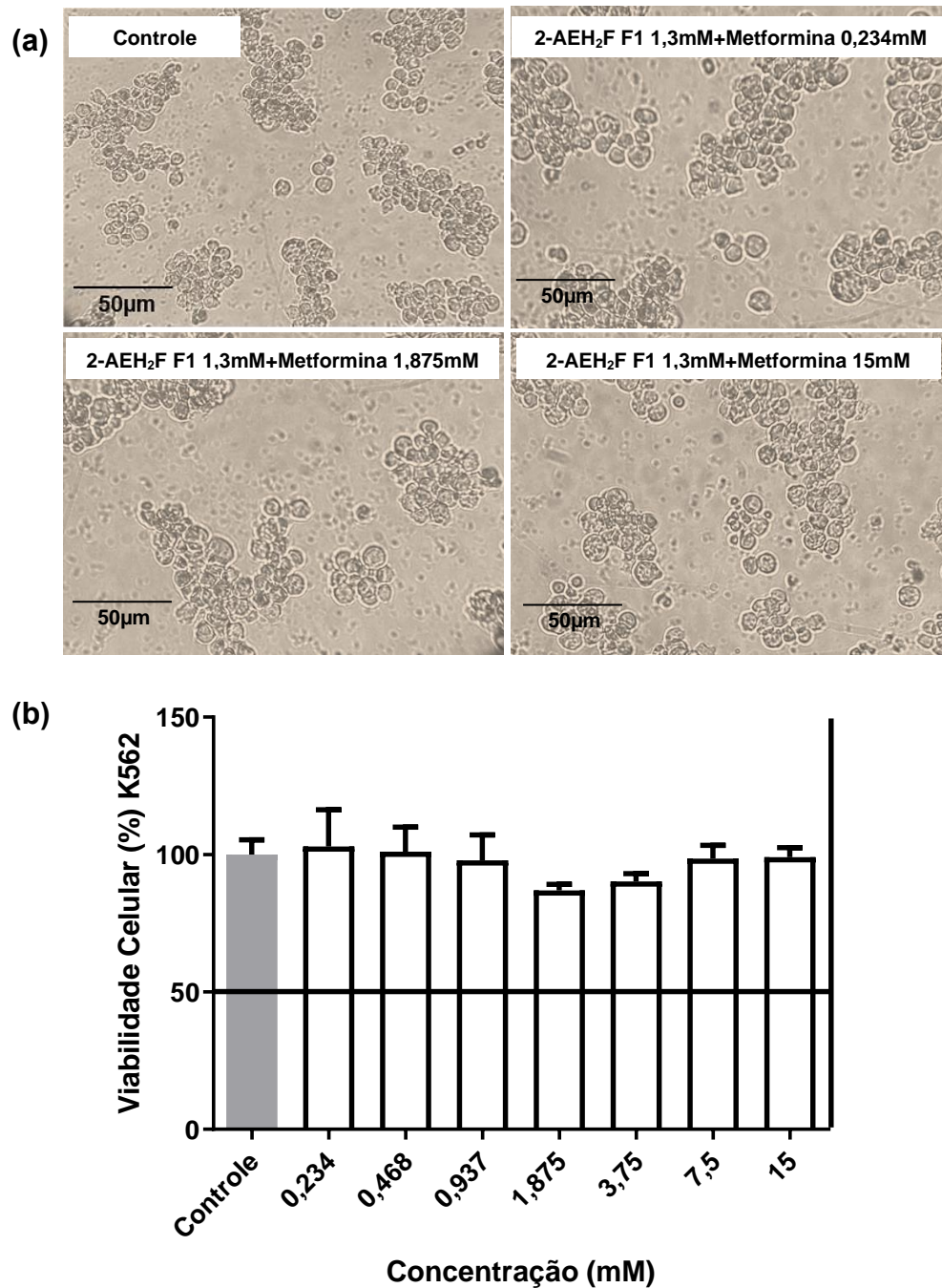
A célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 foi submetida a todos os tratamentos descritos na Tabela 1 do item 3.3. Não foram observadas alterações morfológicas para nenhum dos tratamentos quando associados aos compostos 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e 2-AEH<sub>2</sub>F F2, não foram citotóxicos na metade da concentração de IC<sub>50%</sub> obtido pelo método colorimétrico MTT (Figuras 28-35 A-B).



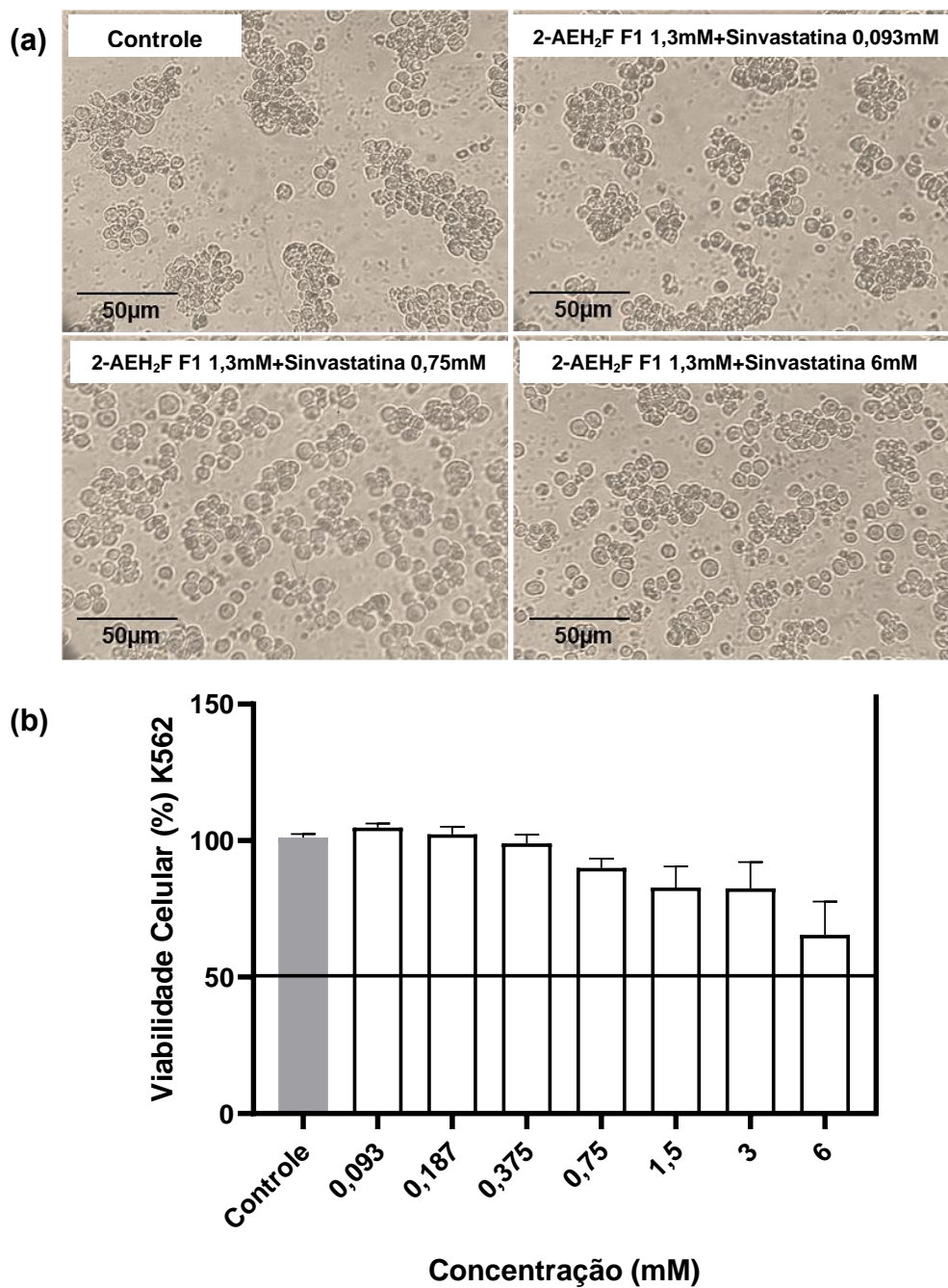
**Figura 28. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 na concentração de 1,3mM associado ao Cloridrato de Meclizina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.



**Figura 29. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 na concentração de 1,3mM associado a Metil-β-Ciclodextrina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

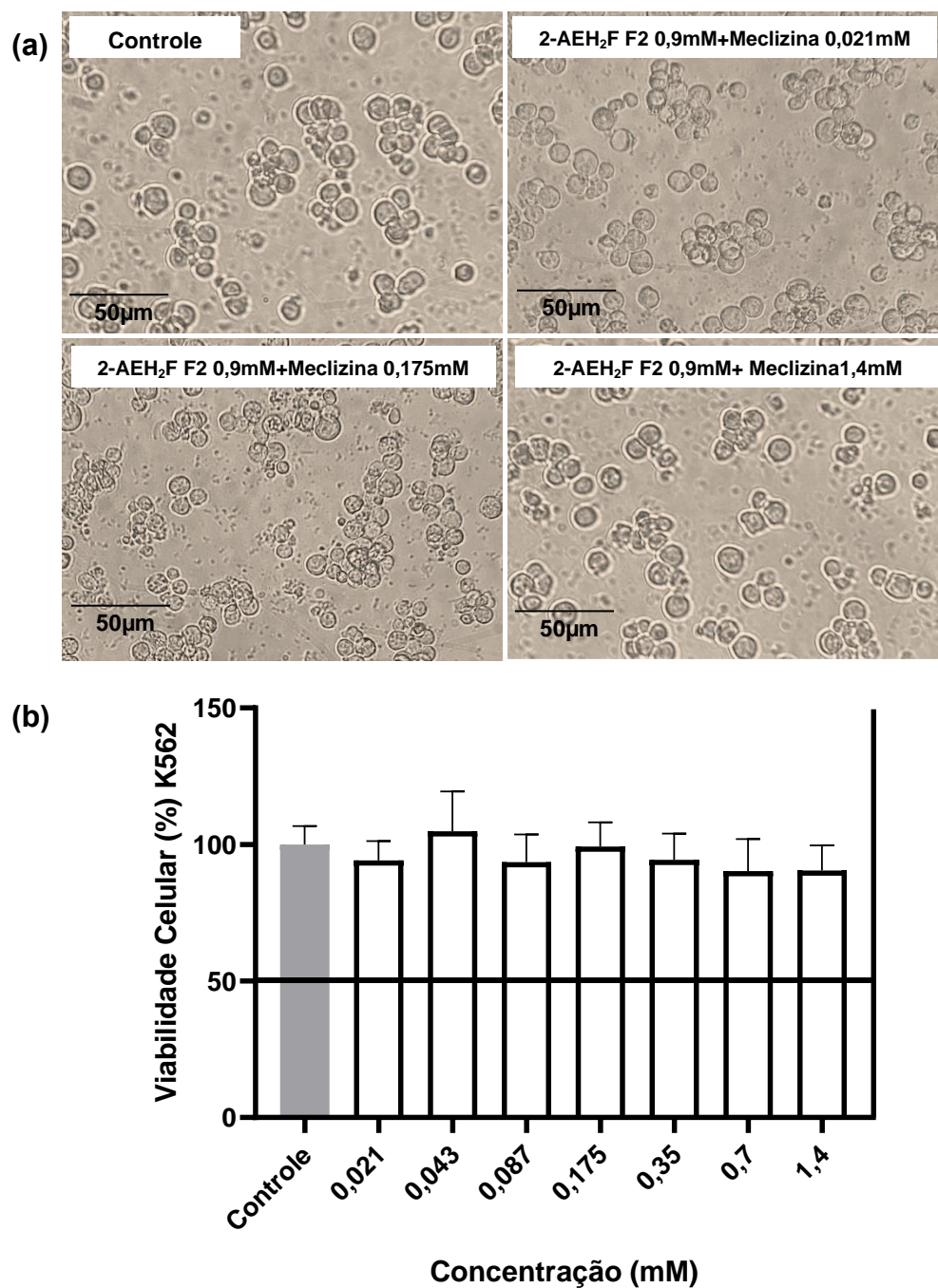


**Figura 30. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 na concentração de 1,3mM associado a Metformina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

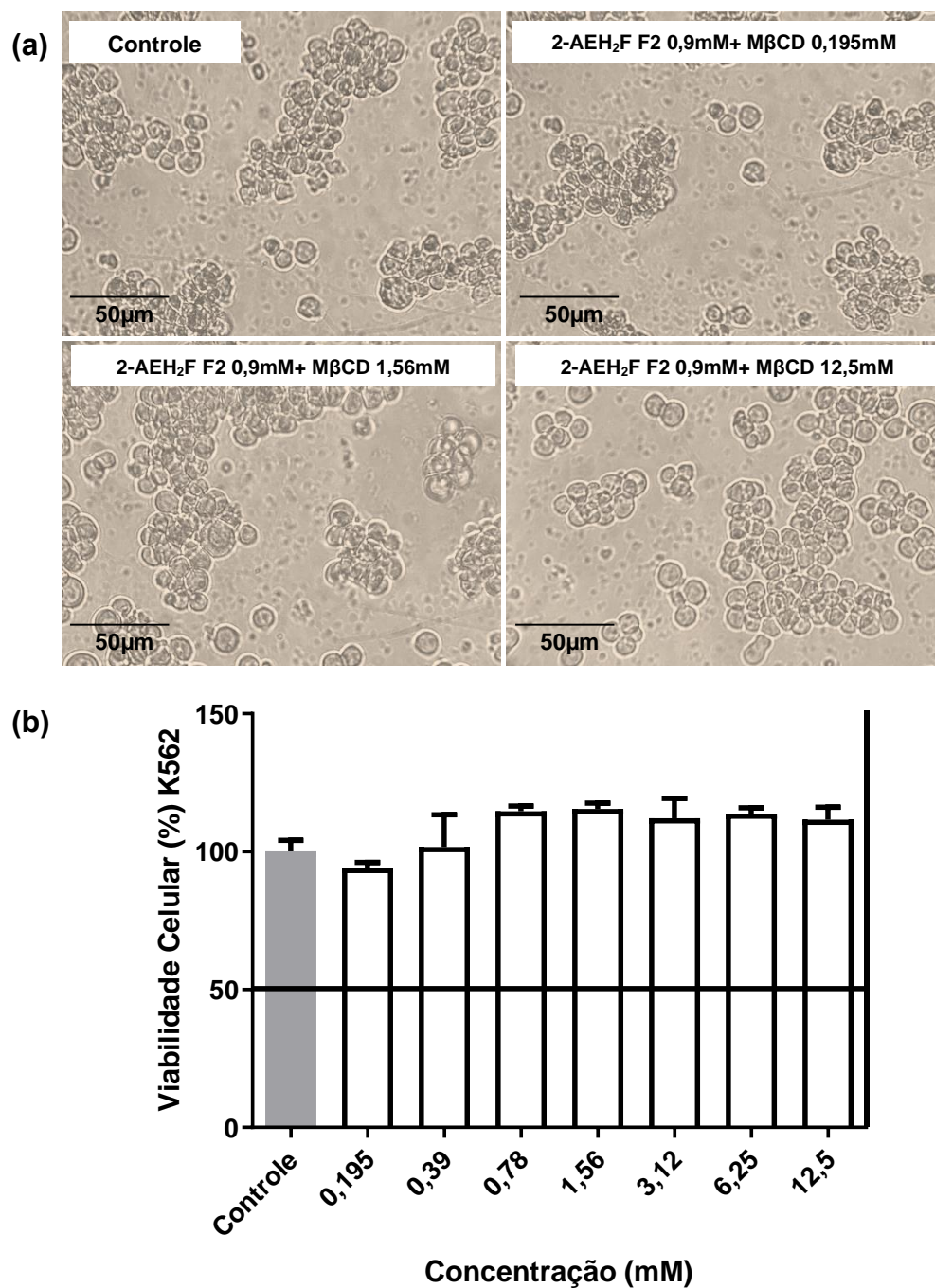


**Figura 31. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 na concentração de 1,3mM associado a Sinvastatina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

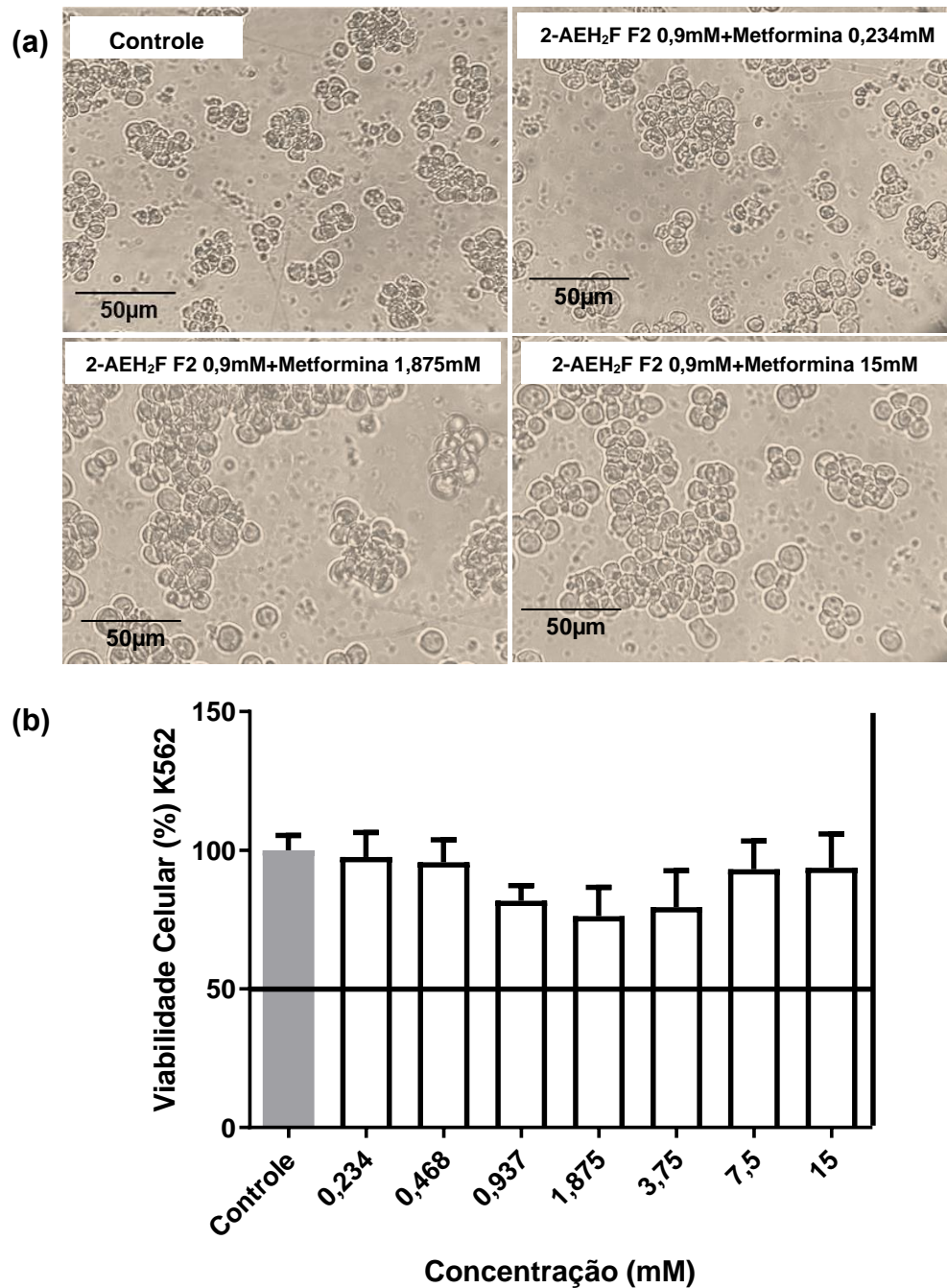




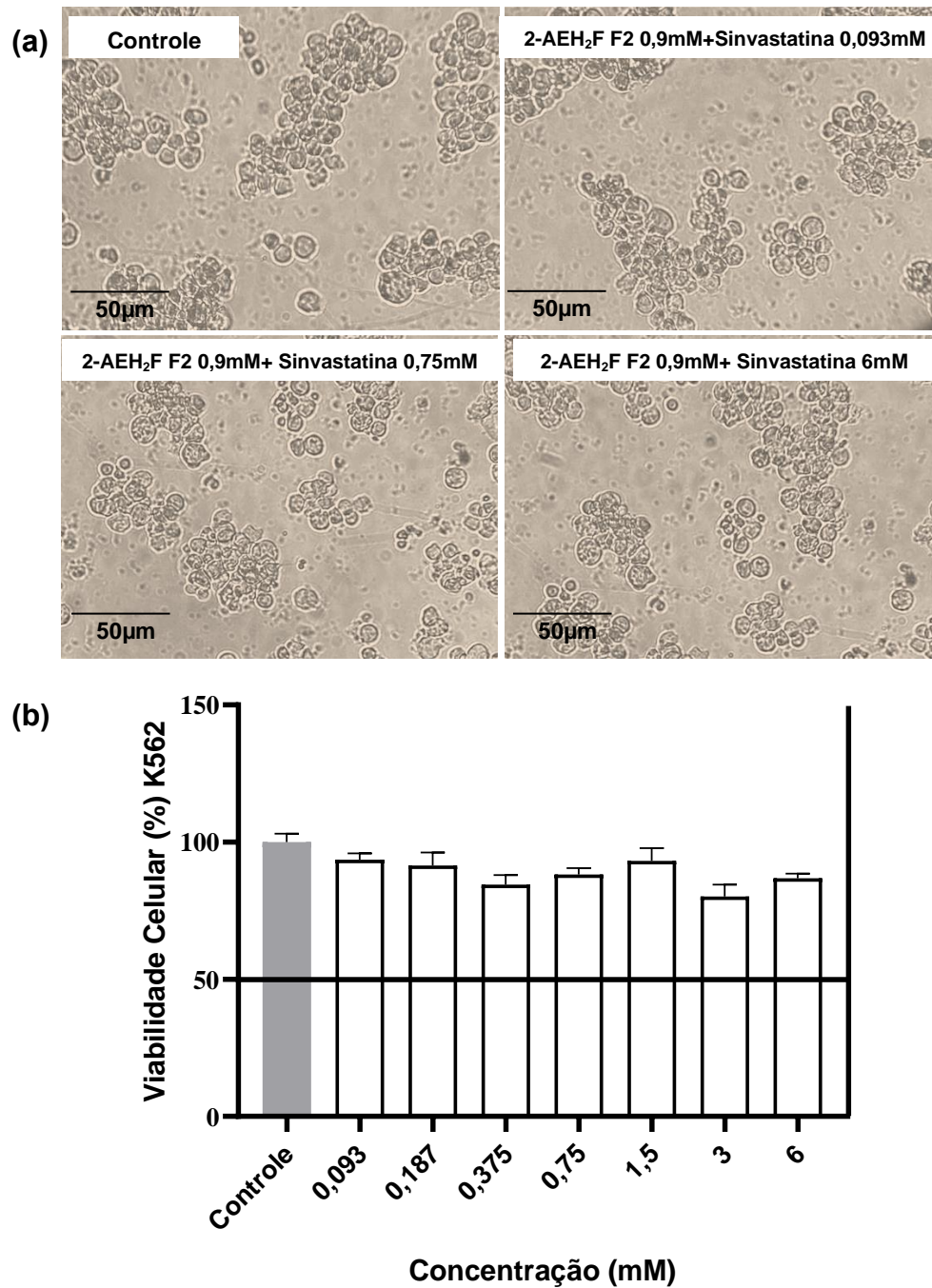
**Figura 32. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 na concentração de 0,9 mM associado ao Cloridrato de Meclizina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.



**Figura 33. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 na concentração de 0,9 mM associado a Metil-β-Ciclodextrina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.



**Figura 34. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 na concentração de 0,9 mM associado a Metformina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.



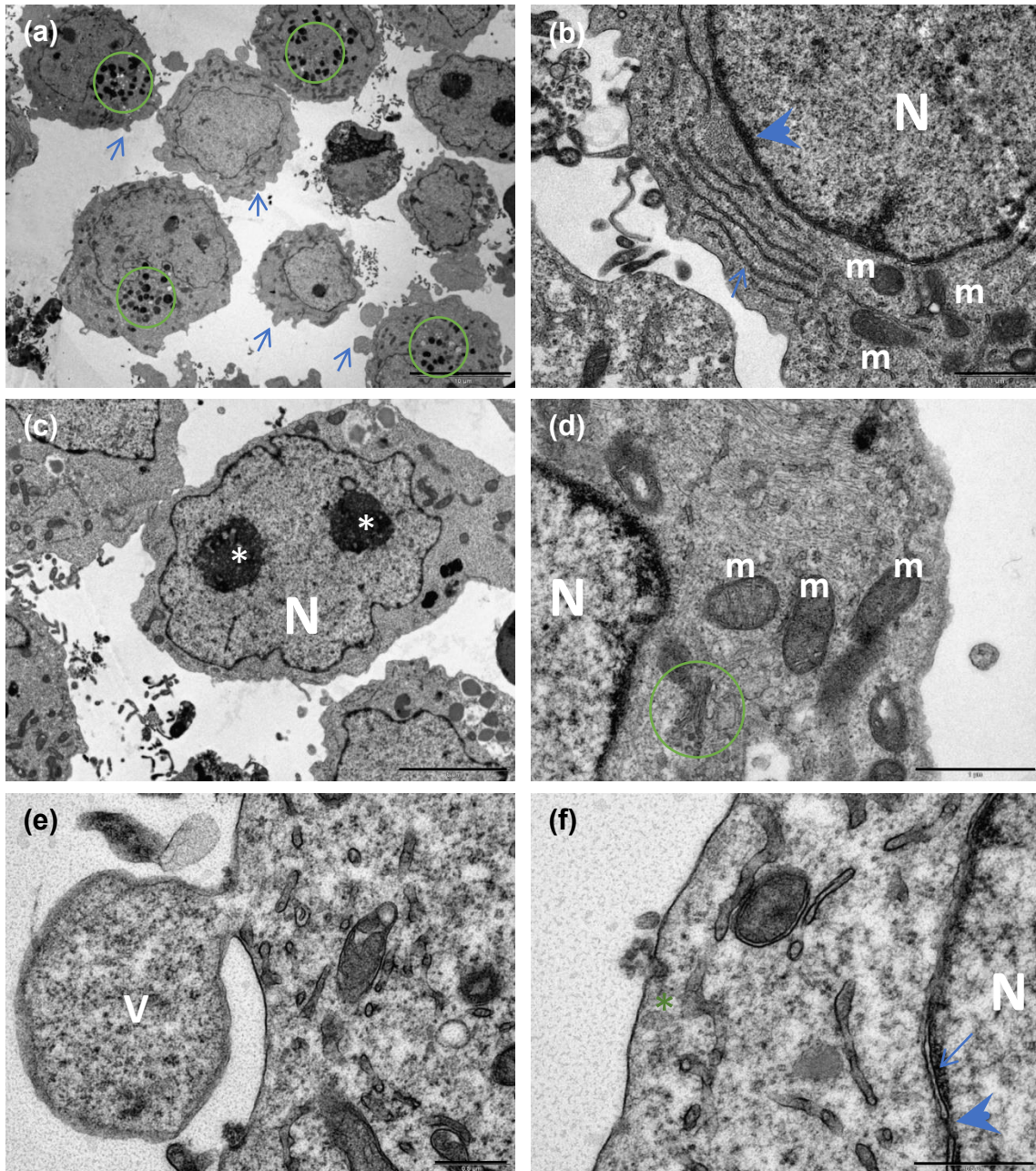
**Figura 35. Determinação da citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo método colorimétrico MTT.** As células foram tratadas com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 na concentração de 0,9 mM associado a Sinvastatina em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais K562; **(b)** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes.

#### **4.5. Avaliação das ultraestruturas das células tumorais K562 por microscopia eletrônica de transmissão.**

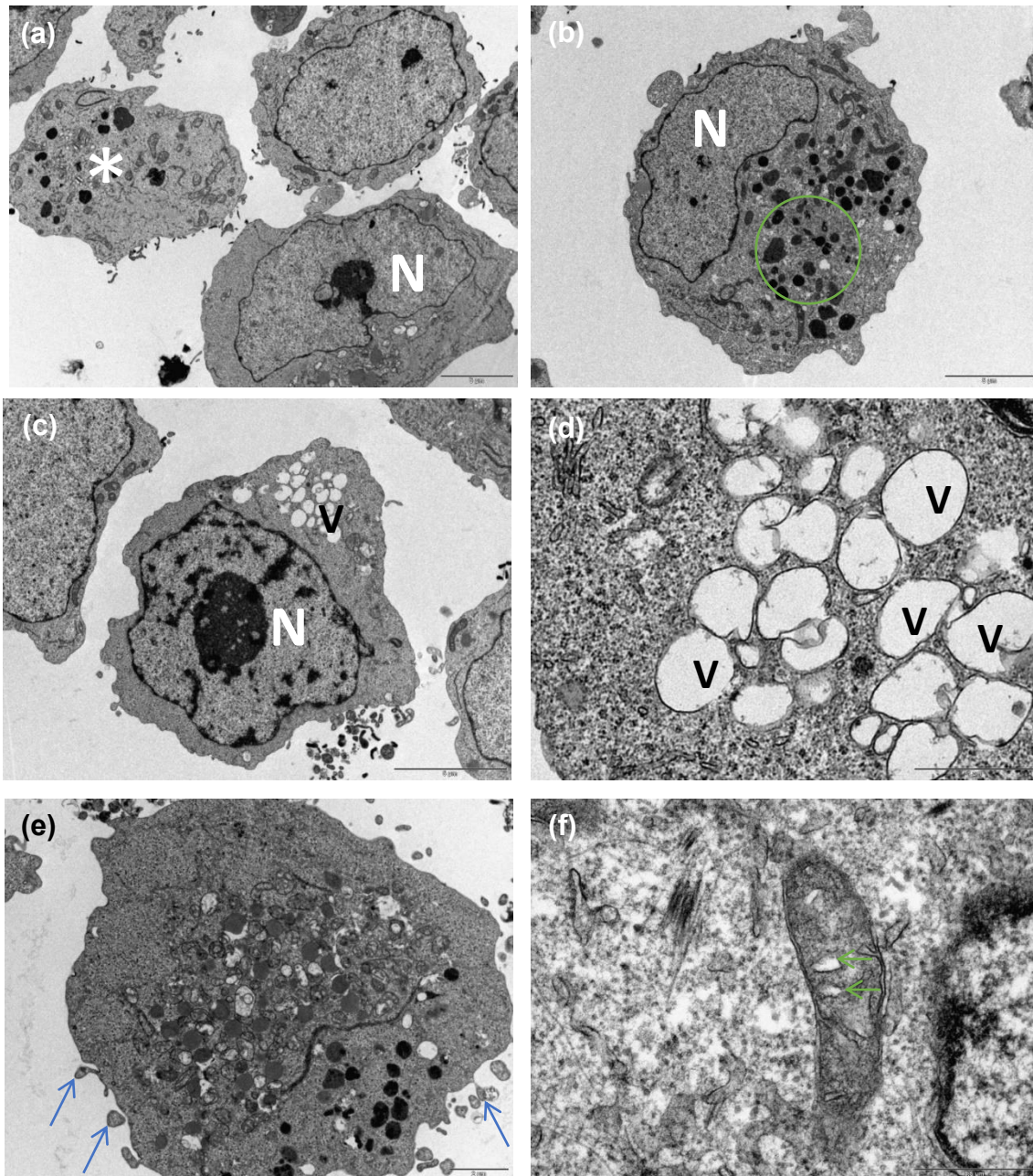
A célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 foi submetida ao tratamento com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e 2-AEH<sub>2</sub>F F2 no período de 12h. As células do grupo controle (sem tratamento) apresentaram características morfológicas variadas, algumas contendo vesículas endocíticas (círculos) e o plano de corte revelou diversas projeções digitiformes (Figura 36 A). Apresenta núcleo, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias, heterocromatina associada à lâmina nuclear, complexo de Golgi normais (Figura 36 B-D). É possível observar projeção da membrana plasmática em formação de vesícula conteúdo citoplasmático no interior da vesícula em formação (Figura 36 E). A dupla camada do envoltório nuclear apresenta espaçamento normal da cisterna, com cromatina associada à lâmina interna, poro nuclear e invaginação da membrana plasmática com a presença de conteúdo de eletron densidade diferenciada (Figura 36 F)

Quando tratadas com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 apresenta características que podem estar relacionadas com o processo de apoptose, como degradação da lâmina nuclear (Figura 37 A), vacuolização citoplasmática, projeções citoplasmáticas semelhantes a exossomas (Figura 37 B-E), mitocôndria apresentando alteração morfológica interna e formação de estruturas semelhantes a vacúolos (Figura 37 F).

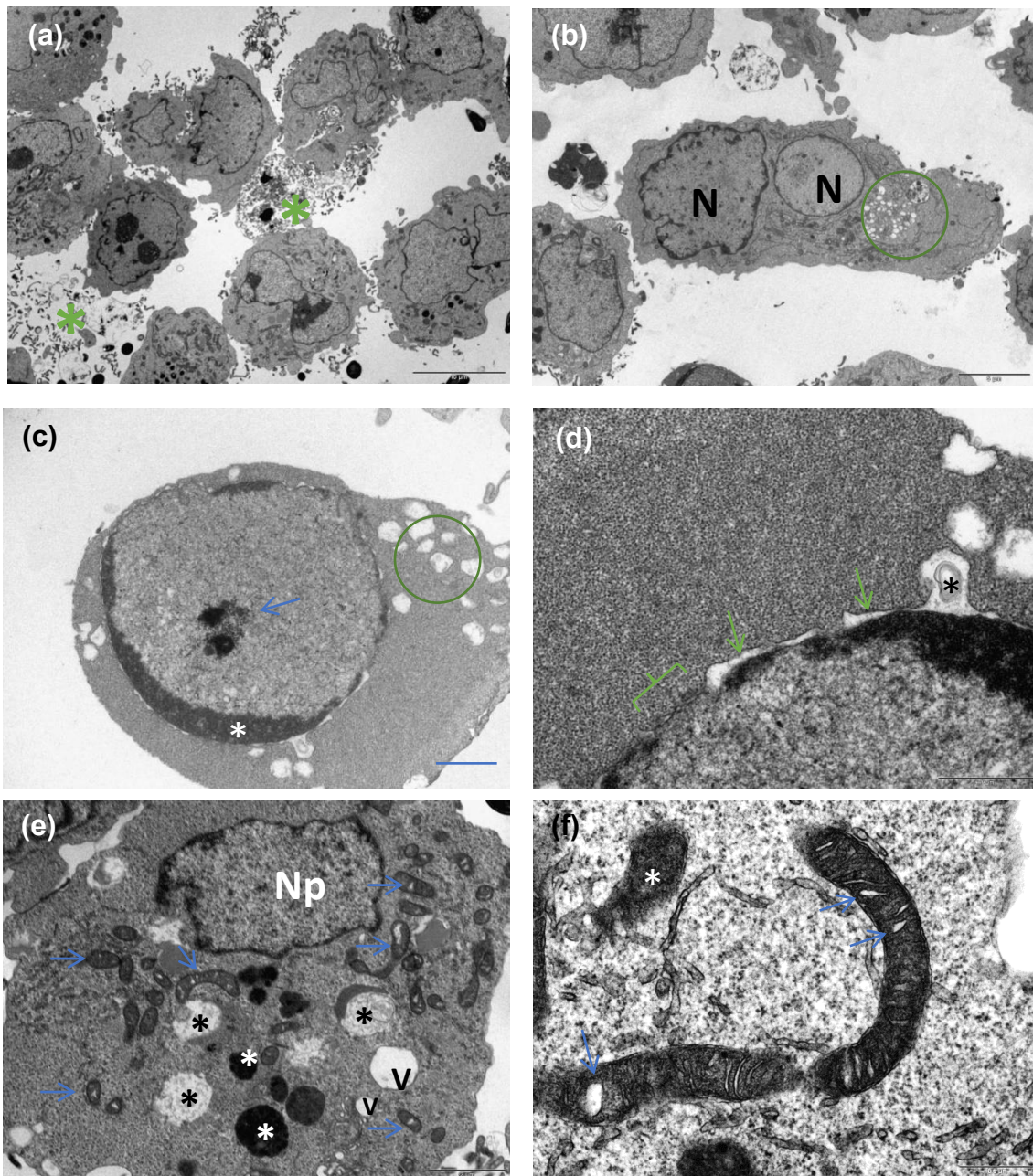
Após o tratamento com 2-AEH<sub>2</sub>F F2, observa-se formação de debris celulares provenientes de um provável processo de (Figura 38 A). Célula tumoral apresenta dois núcleos, vacúolos citoplasmáticos, morfologia alterada, sem definição de organelas citoplasmáticas, heterocromatina condensada e polarizada em uma região do núcleo, nucléolo apresentando alteração morfológica (Figura 38 B-C). Na Figura 38 D é possível observar detalhes dos vacúolos citoplasmáticos, bem como região de afastamento anormal do envoltório nuclear criando um aumento do espaço da cisterna perinuclear entre o nucleoplasma e o citoplasma, formando estrutura semelhante a uma vesícula. Houve alterações morfológicas nas mitocôndrias e formação de estruturas semelhantes a vacúolos no seu interior, algumas estão degradadas (Figura 38 E-F).



**Figura 36. Fotomicrografias eletrônicas representativas do grupo controle de célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** Obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Morgani modelo 268D. **(a)** Células tumorais apresentando características morfológicas variadas, algumas contendo vesículas endocíticas (círculos) e o plano de corte revelou diversas projeções digitiformes (setas), barra 10 $\mu$ m; **(b)** Núcleo (N), Retículo Endoplasmático Rugoso (seta), mitocôndrias (m), heterocromatina associada à lâmina nuclear (cabeça de seta), barra 1 $\mu$ m. **(c)** Célula tumoral apresentando dois nucléolos (asteriscos), Núcleo (N), barra 5 $\mu$ m. **(d)** Núcleo (N), mitocôndrias (m), Complexo de Golgi (círculo), barra 1 $\mu$ m. **(e)** Projeção da membrana plasmática em formação de vesícula (V), observa-se conteúdo citoplasmático no interior da vesícula em formação, barra 0,5 $\mu$ m. **(f)** Dupla camada do envoltório nuclear apresentando espaçamento normal da cisterna, com cromatina associada à lâmina interna (seta), poro nuclear (cabeça de seta), núcleo (N), invaginação da membrana plasmática com a presença de conteúdo de eletrondensidade diferenciada, barra 0,5 $\mu$ m.



**Figura 37. Fotomicrografias eletrônicas representativas do grupo tratado com 2-AEH<sub>2</sub>F F1 de célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** Obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Morgani modelo 268D. **(a)** Características gerais das células tumorais tratadas, célula em apoptose (asterisco), núcleo (N), barra 5µm; **(b)** Vesículas endocíticas (círculo), Núcleo (N), barra 5µm. **(c)** Célula tumoral apresentando vacuolização citoplasmática, núcleo (N), vacúolos (V), barra 5µm. **(d)** Detalhe dos vacúolos citoplasmáticos referente à figura “C”, barra 5µm. **(e)** Célula tumoral em processo apoptótico, produzindo projeções citoplasmáticas semelhantes a exossomas (setas), barra 5µm. **(f)** Detalhe de mitocôndria apresentando alteração morfológica interna e formação de estruturas semelhantes a vacúolos (setas), barra 0,5µm.



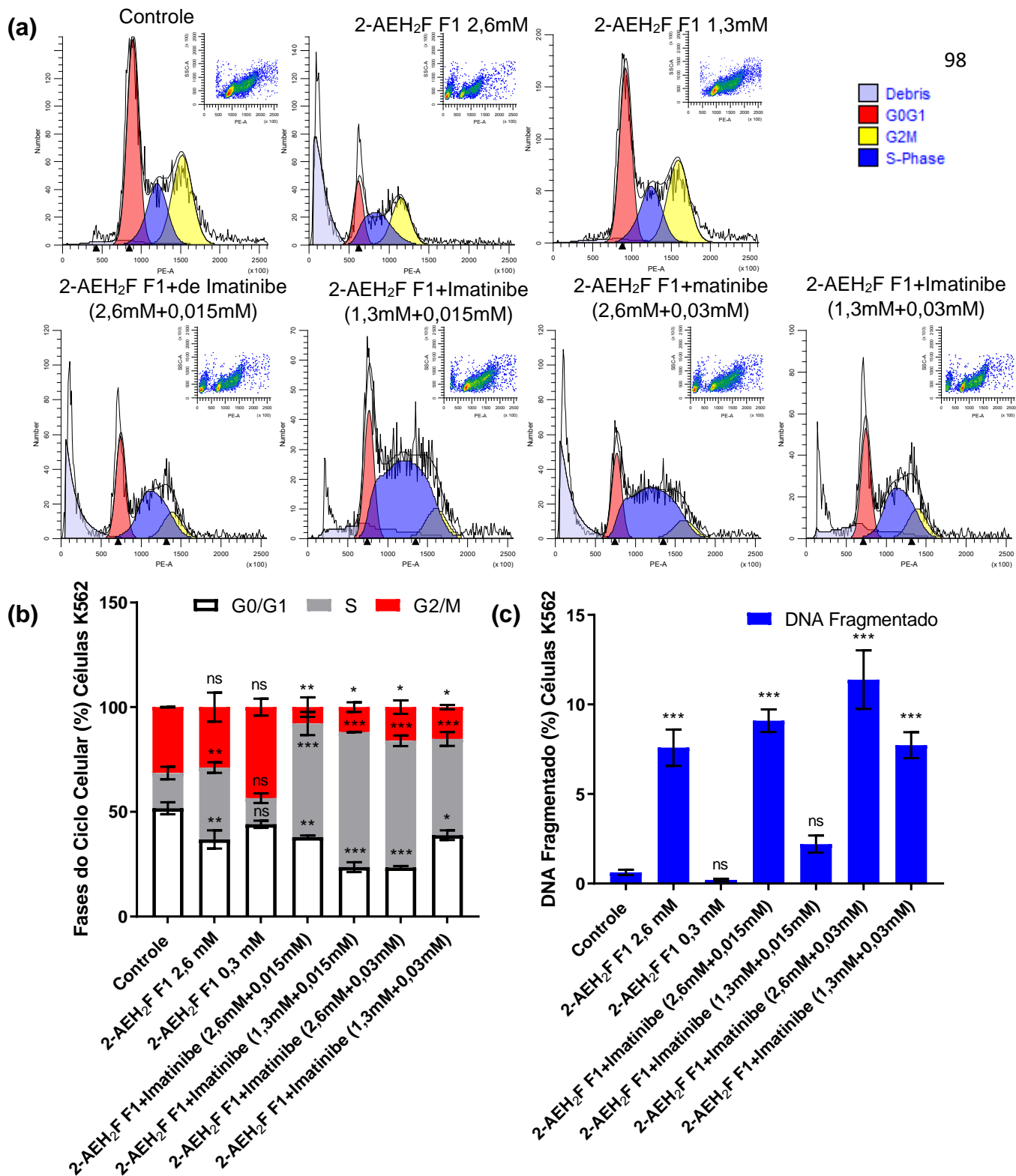
**Figura 38. Fotomicrografias eletrônicas representativas do grupo tratado com 2-AEH<sub>2</sub>F F2 de célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** Obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Morgani modelo 268D. **(a)** Características gerais das células tumorais tratadas, observa-se formação de debris celulares provenientes do processo de apoptose (asteriscos), barra 10µm; **(b)** Célula tumoral com dois núcleos apresentando padrão heterogêneo da cromatina (N), vacúolos citoplasmáticos (círculo), barra 5µm. **(c)** Célula tumoral apresentando morfologia alterada, sem definição de organelas citoplasmáticas, heterocromatina condensada e polarizada em uma região do núcleo (asterisco), nucléolo apresentando alteração morfológica (seta), vacúolos citoplasmáticos (círculo), barra 2µm. **(d)** Detalhe dos vacúolos citoplasmáticos referente à figura “C”, região íntegra do envoltório nuclear (chave), região de afastamento anormal do envoltório nuclear criando um aumento do espaço da cisterna perinuclear entre o nucleoplasma e o citoplasma (setas), formando estrutura semelhante a uma vesícula com conteúdo interno (asterisco), barra 5µm. **(e)** Vesículas endocíticas (asteriscos), Núcleo picnótico (Np), vacúolos citoplasmáticos (V), mitocôndrias apresentando vacúolos internos (setas), barra 5µm; **(f)** Detalhe das mitocôndrias apresentando alterações morfológicas e formação de estruturas semelhantes a vacúolos internos (setas), com degradação, barra 0,5µm.



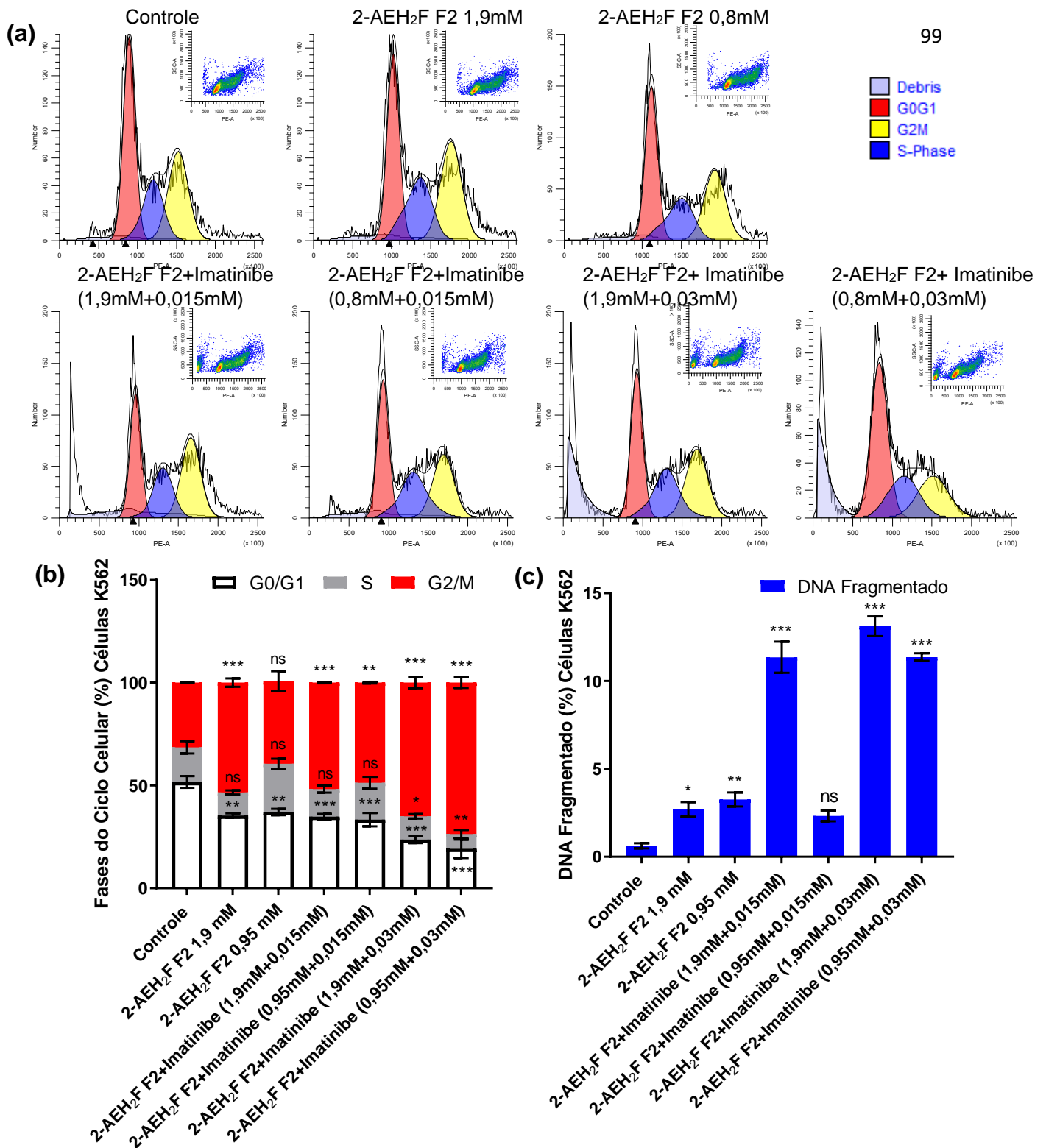
#### 4.6. Perfil de distribuição das células tumorais nas fases do ciclo celular

A célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 foi submetida aos tratamentos com os compostos isolados e associados ao Mesilato de Imatinibe como descritos na Tabela 1 do item 3.3. A análise da porcentagem de células tumorais nas diferentes fases do ciclo celular quando tratadas com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 na concentração do valor de IC<sub>50%</sub> demonstrou parada na fase S com aumento de 58,7±4,1%, e redução da população de células nas fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (37,1±6,7%) e G<sub>2</sub>/M (24,08±8,2%), resultados semelhante é observado para associação com o Mesilato de Imatinibe em todas as concentrações testadas. Quando tratado com 2-AEH<sub>2</sub>F F1+Mesilato de Imatinibe (1,3mM+0,015mM) houve parada na fase S com aumento de 77,2±1,1%, para o tratamento 2-AEH<sub>2</sub>F F1+Mesilato de Imatinibe (1,3mM+0,03mM) os valores percentuais da população celular parada na fase S foi de 69,6±5,4% (Figura 39). O tratamento do 2-AEH<sub>2</sub>F F1 isolado nas concentrações de 1,3mM não apresentou alterações. Houve aumento do DNA fragmentado para os tratamentos com 2-AEH<sub>2</sub>F F1 2,6mM (7,6±2,2%), 2-AEH<sub>2</sub>F F1+Mesilato de Imatinibe (1,3mM+0,015mM) (2,3±1,1%) e 2-AEH<sub>2</sub>F F1+Mesilato de Imatinibe (1,3mM+0,03mM) com aumento de 7,7±1,0% (Figura 39).

O tratamento com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 apresentou resultado diferente da formulação 1, ocorrendo parada na fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular para a célula tumoral. Quando tratada na concentração de IC<sub>50%</sub> ocorre aumento da população celular na fase G<sub>2</sub>/M em 40,5±3,1%, com redução na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> em 35,5±1,8% (Figura 40). Mesmo resultado é observado para a associação com Mesilato de Imatinibe em todas as concentrações testadas. Houve aumento de 35,4±0,8% para fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular para a células tumoral quando tratadas com 2-AEH<sub>2</sub>F F2+Mesilato de Imatinibe (0,95mM+0,015mM), quando tratadas com 2-AEH<sub>2</sub>F F2+Mesilato de Imatinibe (0,95mM+0,03mM) o aumento na fase G<sub>2</sub>/M foi de 58,0±4,1% (Figura 40). É possível observar aumento do DNA Fragmentado para o tratamento com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 na concentração de IC<sub>50%</sub> em 2,7±0,4% e para o 2-AEH<sub>2</sub>F F2+Mesilato de Imatinibe (0,95mM+0,03mM) em 11,3±0,9% (Figura 40).



**Figura 39. Análise das fases do ciclo celular nas células de leucemia mieloide crônica da linhagem K562.** As células foram tratadas em diferentes concentrações com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 isolado e associado ao Mesilato de Imatinibe no período de 24h. **(a)** Histogramas e Densty Plots representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular. **(b)** Distribuição das fases do ciclo celular; **(c)** DNA fragmentado. Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média ± DP de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

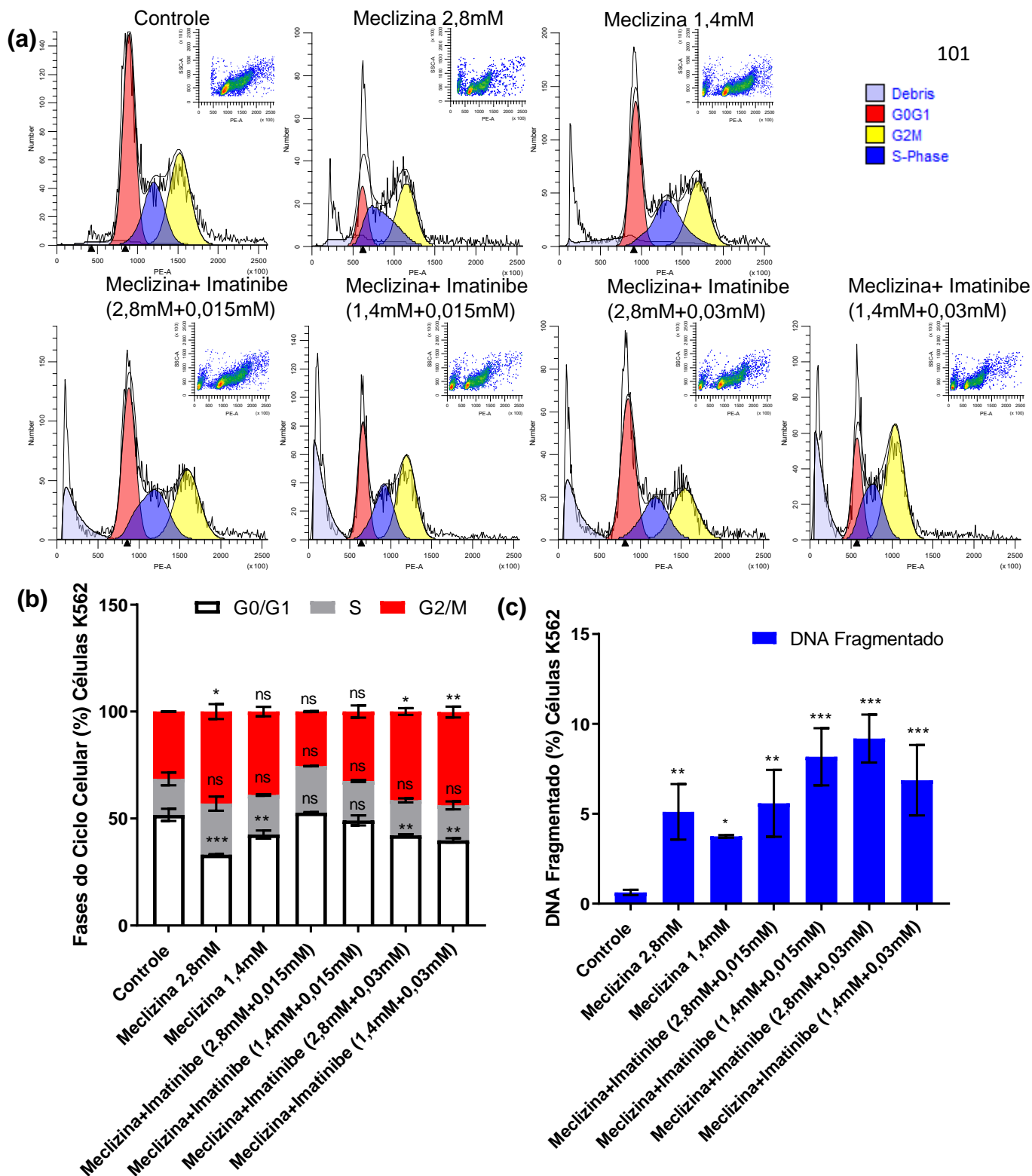


**Figura 40. Análise das fases do ciclo celular nas células de leucemia mieloide crônica da linhagem K562.** As células foram tratadas em diferentes concentrações com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 isolado e associado ao Mesilato de Imatinibe no período de 24h. **(a)** Histogramas e Densty Plots representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular. **(b)** Distribuição das fases do ciclo celular; **(c)** DNA fragmentado. Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média ± DP de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

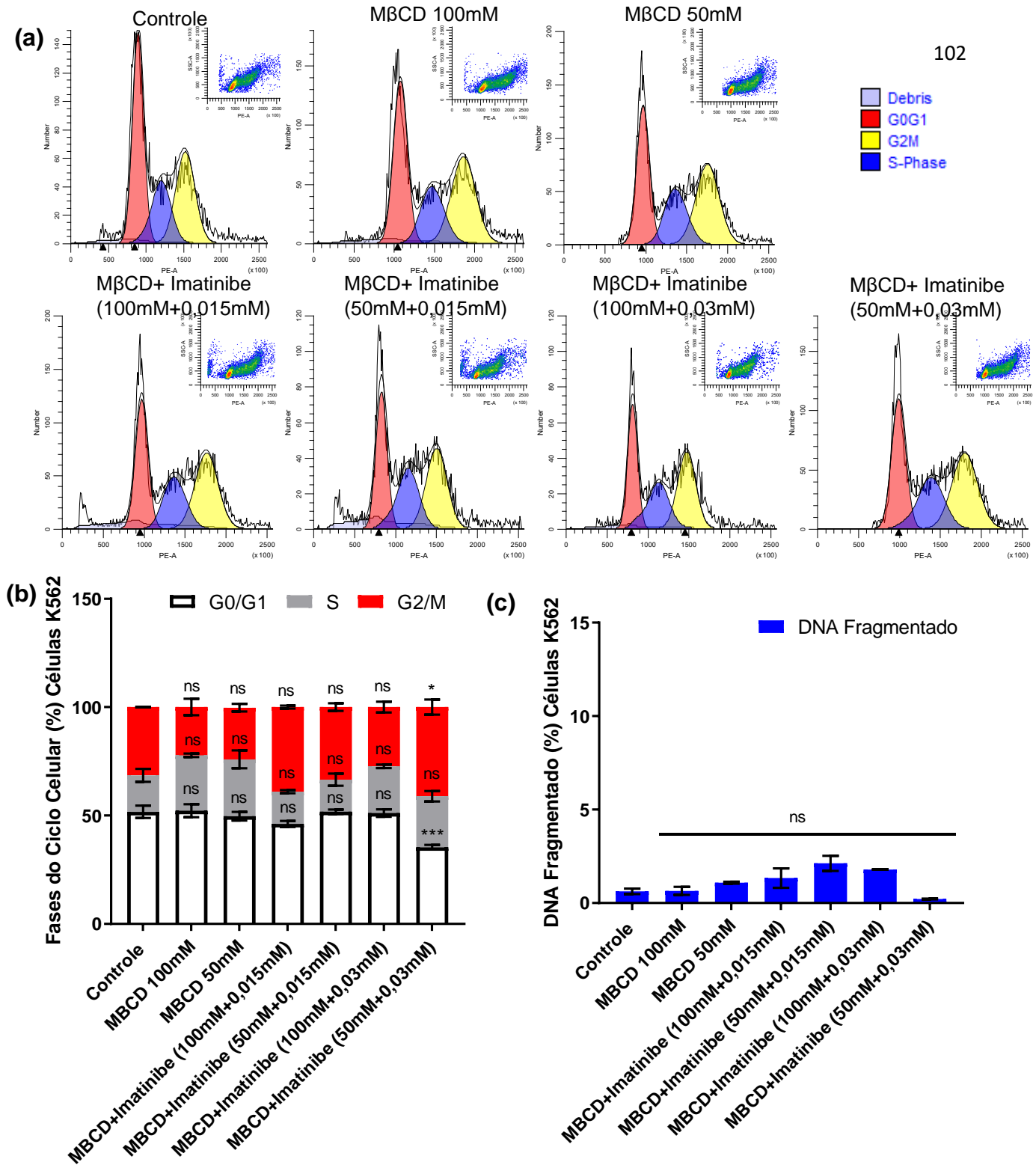
O tratamento com o Cloridrato de Meclizina apresentou diferença significativa promovendo redução da população de células na fase G0/G1 do ciclo celular e aumento da fase G2/M para a célula tumoral, em tanto no tratamento isolado, quando associado ao Mesilato de Imatinibe. Para o tratamento com o Cloridrato de Meclizina na concentração do valor de  $IC_{50\%}$  houve aumento da fase G2/M de  $30,5\pm 4,9\%$  e redução da fase G0/G1 em  $38,6\pm 1,2\%$  (Figura 41). Quando associado ao Mesilato de Imatinibe (Meclizina 1,4mM + Mesilato de Imatinibe 0,03mM) foi observado um resultado semelhante ao Cloridrato de Meclizina isolado com aumento percentual de  $30,7\pm 4,1\%$  da fase G2/M e redução de  $27,2\pm 0,8\%$  (Figura 41). Em comparação ao grupo controle, todos os tratamentos promoveram aumento de DNA fragmentado, Cloridrato de meclizina (2.8mM) promoveu aumento de  $5,1\pm 1,7\%$ , Cloridrato de meclizina+Mesilato de Imatinibe (1,4mM+0,015mM) em  $8,1\pm 0,2\%$ , e Cloridrato de Meclizina+Mesilato de Imatinibe (1,4mM+0,03mM) em  $6,8\pm 2,4\%$ . (Figura 41).

Quando tratada com a metil- $\beta$ -ciclodextrina, o único tratamento que promoveu alteração na distribuição da população de células nas fases do ciclo celular foi a associação MBCD+Mesilato de Imatinibe (50mM+0,03mM), com redução na fase G0/G1 em  $35,5\pm 2,1\%$  e para na fase G2/M com aumento de  $18,2\pm 5,4\%$  (Figura 42). Não houve aumento do DNA fragmentado para nenhum tratamento.

Foi observado que o tratamento com a Metformina só promoveu alteração na distribuição das células nas fases do ciclo celular quando associada com o Mesilato de Imatinibe. Houve redução na fase G0/G1 em igual proporção para os tratamentos com Metformina+Mesilato de Imatinibe (30mM+0,015mM), Metformina+Mesilato de Imatinibe (15mM+0,015M) e Metformina+Mesilato de Imatinibe (30mM+0,03mM) em  $33,6\pm 2,2\%$  (Figura 43). O único tratamento que houve aumento de DNA fragmentado foi a Metformina isolada na concentração de  $IC_{50\%}$ , com aumento de  $4,5\pm 2,3\%$  (Figura 43).



**Figura 41. Análise das fases do ciclo celular nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** As células foram tratadas em diferentes concentrações com o Cloridrato de Meclizina isolado e associado ao Mesilato de Imatinibe no período de 24h. **(a)** Histogramas e Densty Plots representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular. **(b)** Distribuição das fases do ciclo celular; **(c)** DNA fragmentado. Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . ns=não significativo.

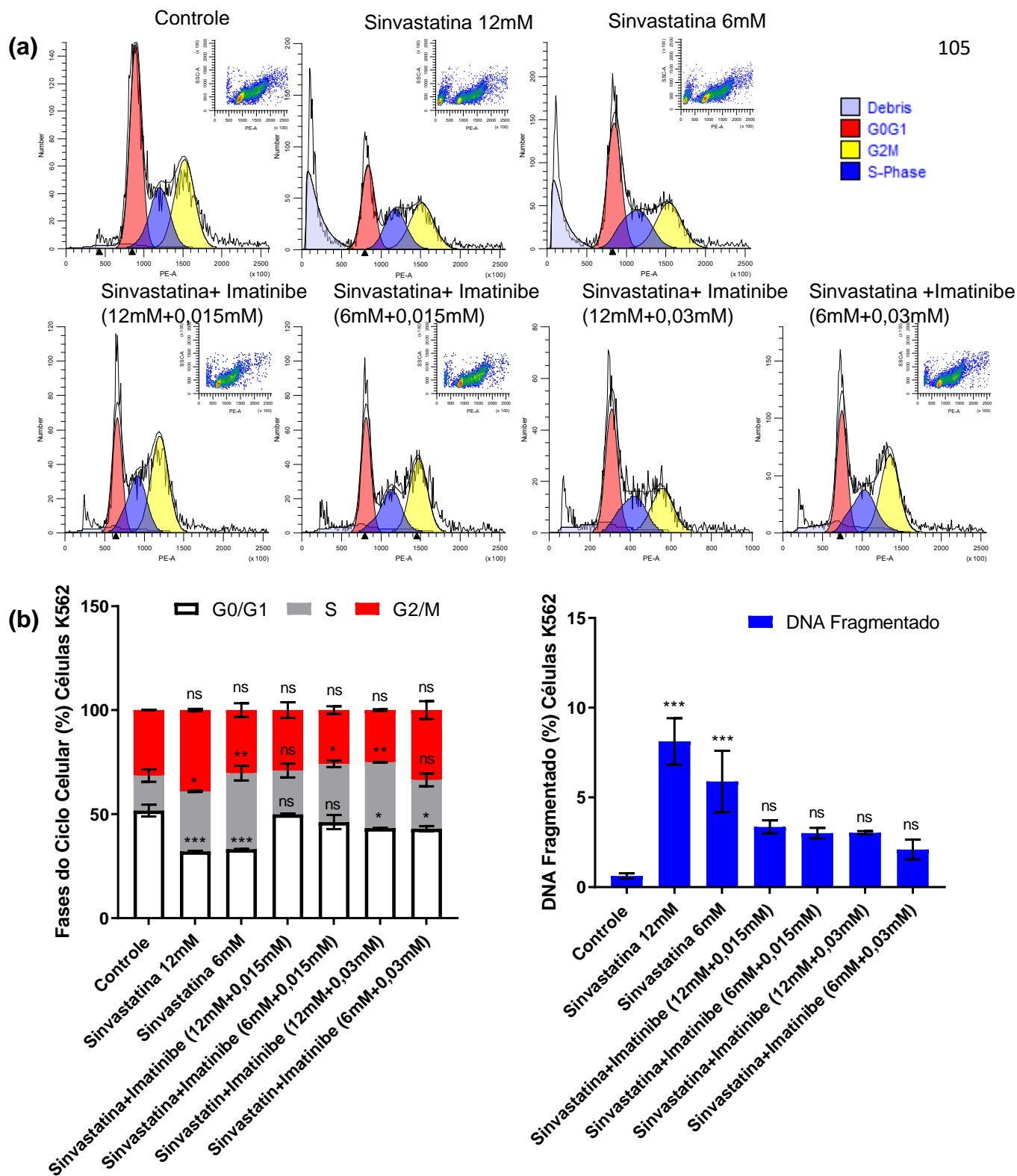


**Figura 42.** Análise das fases do ciclo celular nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562. As células foram tratadas em diferentes concentrações com a MβCD isolada e associada ao Mesilato de Imatinibe no período de 24h. **(a)** Histogramas e Densty Plots representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular. **(b)** Distribuição das fases do ciclo celular; **(c)** DNA fragmentado. Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . ns=não significativo.



A célula tumoral quando tratada com a sinvastatina, apresentou alteração na distribuição da população nas fases do ciclo celular, com redução de G0/G1 e para na fase S. O tratamento com a sinvastatina na concentração de IC<sub>50%</sub> promoveu redução de 40,6±1,5% na fase G0/G1 e aumento de 28,8±0,8% na fase S (Figura 44). O tratamento com a Sinvastatina na concentração de 6mM promoveu resultado semelhante, mas com aumento de 49,5±0,5% na fase S (Figura 44). Quando associado ao Mesilato de Imatinibe, é possível observar redução de 19,3±0,2% para fase G0/G1 e aumento de 53,8±0,2% para fase S na concentração de Sinvastatina+Mesilato de Imatinibe (12mM+0,03mM) (Figura 44). O aumento de DNA fragmentado só foi observado no tratamento com a Sinvastatina isolada, sendo de 8,1±2,0% para a concentração de 12mM e 5,8±2,9% para a concentração de 6mM (Figura 44).





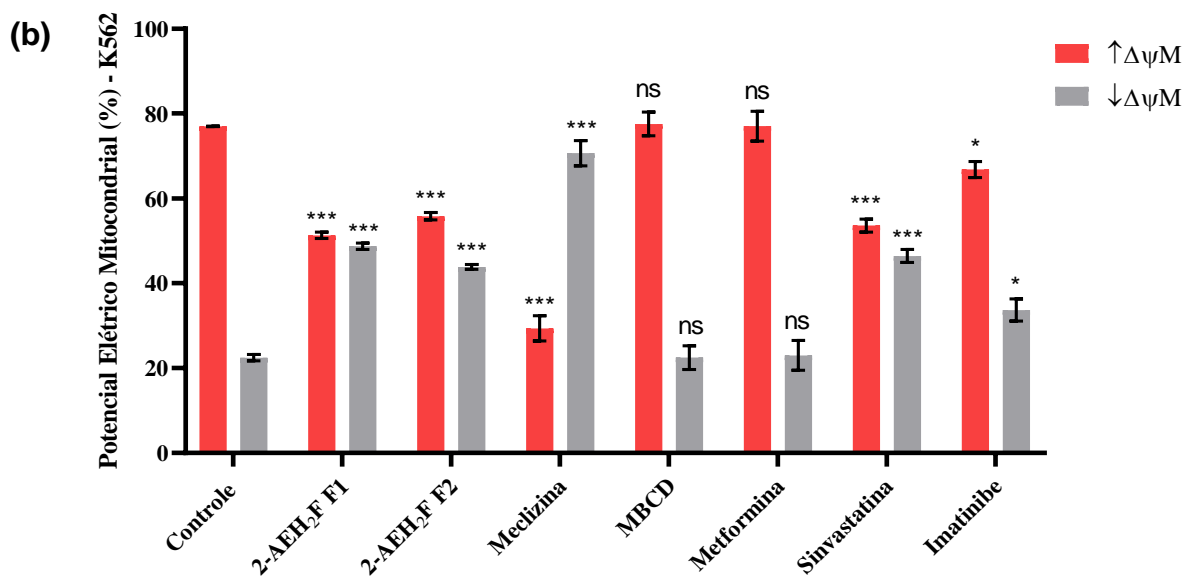
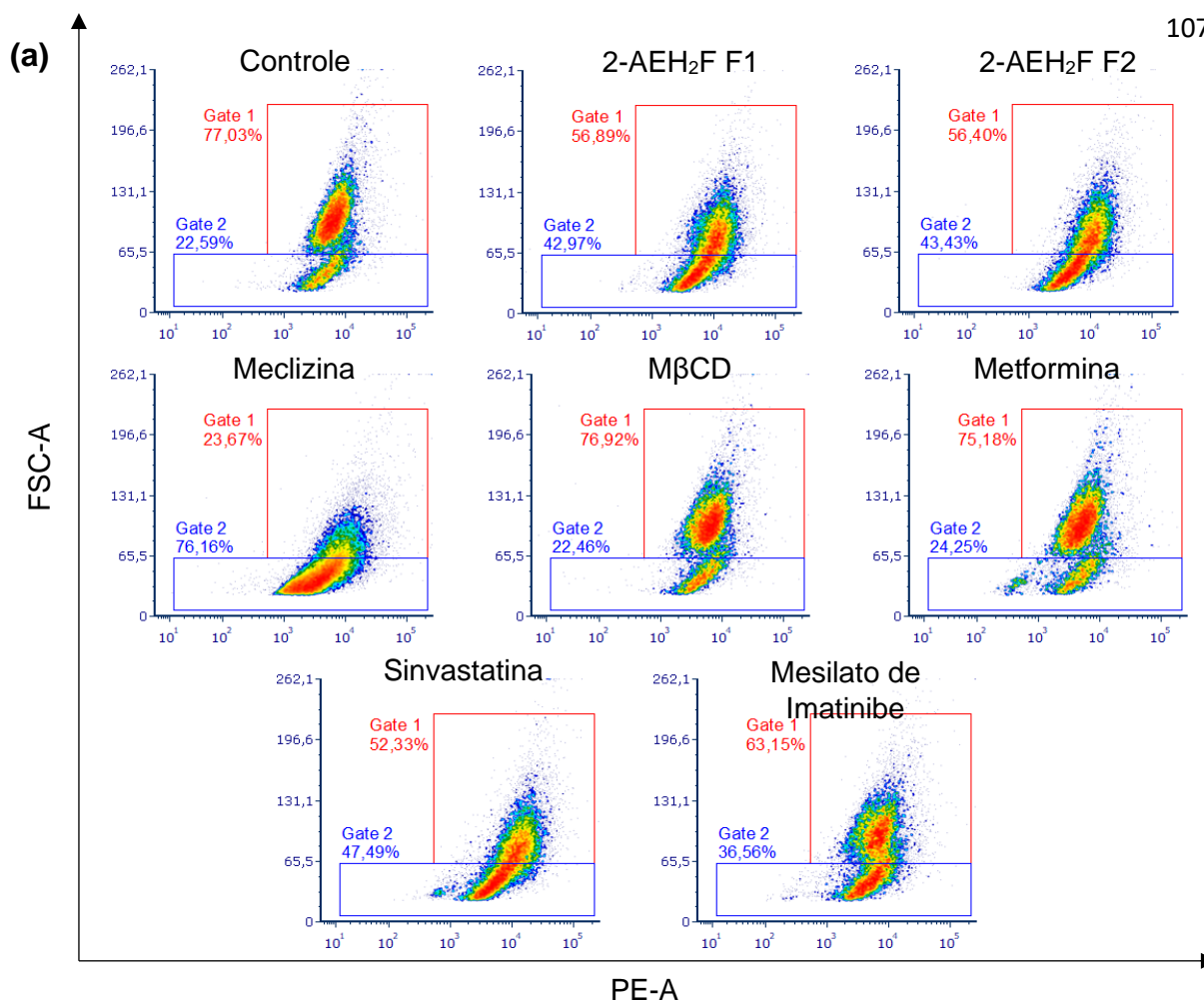
**Figura 44. Análise das fases do ciclo celular nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562. As células foram tratadas em diferentes concentrações com a Sinvastatina isolada e associada ao Mesilato de Imatinibe no período de 24h. (a) Histogramas e Densty Plots representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular. (b) Distribuição das fases do ciclo celular; (c) DNA fragmentado. Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média ± DP de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001. ns=não significativo.**

#### 4.7. Determinação do potencial elétrico da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) por citometria de fluxo

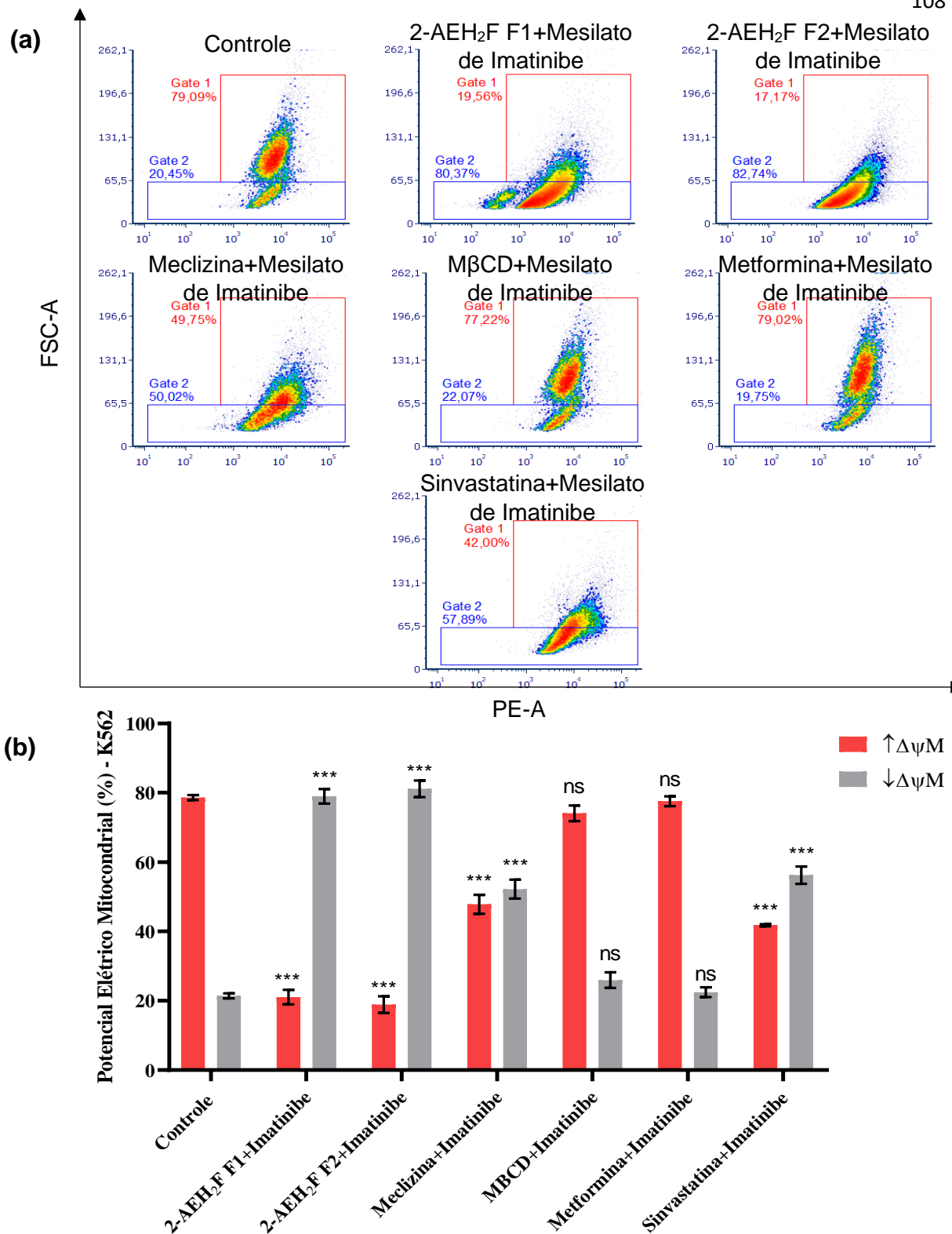
Os experimentos para a avaliação do potencial elétrico mitocondrial foram realizados análises em citômetro de fluxo após marcação pela sonda fluorescente Rodamina 123 (MitoRed), após 24h de tratamento.

Houve redução do  $\Delta\Psi_m$  em quase todos os tratamentos com os compostos isolados, com exceção do M $\beta$ CD e da Metformina, não apresentou modulação desse potencial. As células quando tratadas com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 observa-se uma redução do  $\Delta\Psi_m$  em 27,5 $\pm$ 2,1% e 33,3 $\pm$ 1,9% respectivamente (Figura 45). O tratamento com o Cloridrato de Meclizina foi que promoveu redução do  $\Delta\Psi_m$  em 61,8 $\pm$ 5,3% (Figura 45). O tratamento com a Sinvastatina a redução foi de 30,4 $\pm$ 3,5%, redução semelhante a observada para o 2-AEH<sub>2</sub>F (Figura 45). O Mesilato de Imatinibe foi eficiente na redução  $\Delta\Psi_m$ , mas teve menor porcentagem, quando comparado aos tratamentos que apresentaram eficiência, sendo 13,1 $\pm$ 2,4% (Figura 45).

Foi possível observar maior redução do  $\Delta\Psi_m$  para o tratamento com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e o 2-AEH<sub>2</sub>F F2, quando associado ao Mesilato de Imatinibe, correspondendo a 75,9 $\pm$ 4,1% e 73,21 $\pm$ 3,9% respectivamente (Figura 46). O tratamento com o Cloridrato de Meclizina associada ao Mesilato de Imatinibe, também houve redução do  $\Delta\Psi_m$  em 39,15 $\pm$ 4,7%, há uma maior redução do  $\Delta\Psi_m$  para o Cloridrato de Meclizina quando isolado (Figura 46). Os tratamentos com M $\beta$ CD e Metformina associados ao Mesilato de Imatinibe não apresentaram efeito na modulação do  $\Delta\Psi_m$  da célula tumoral, mesmo resultado observado para os compostos isolados (Figura 46). A Sinvastatina associada ao Mesilato de Imatinibe promoveu redução de 47,2 $\pm$ 1,1% do  $\Delta\Psi_m$ , evidenciado maior eficiência quando associada (Figura 46).



**Figura 45. Análise do potencial elétrico mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) na célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 por citometria de fluxo. As células foram tratadas com os compostos isolados nos valores de  $IC_{50}$  por um período de 24h. (a) DensityPlots representativos da distribuição de acordo com  $\Delta\psi_m$ . (b) Gráfico de barras mostrando o  $\Delta\psi_m$  expresso como média $\pm$ DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . ns=não significativo.**

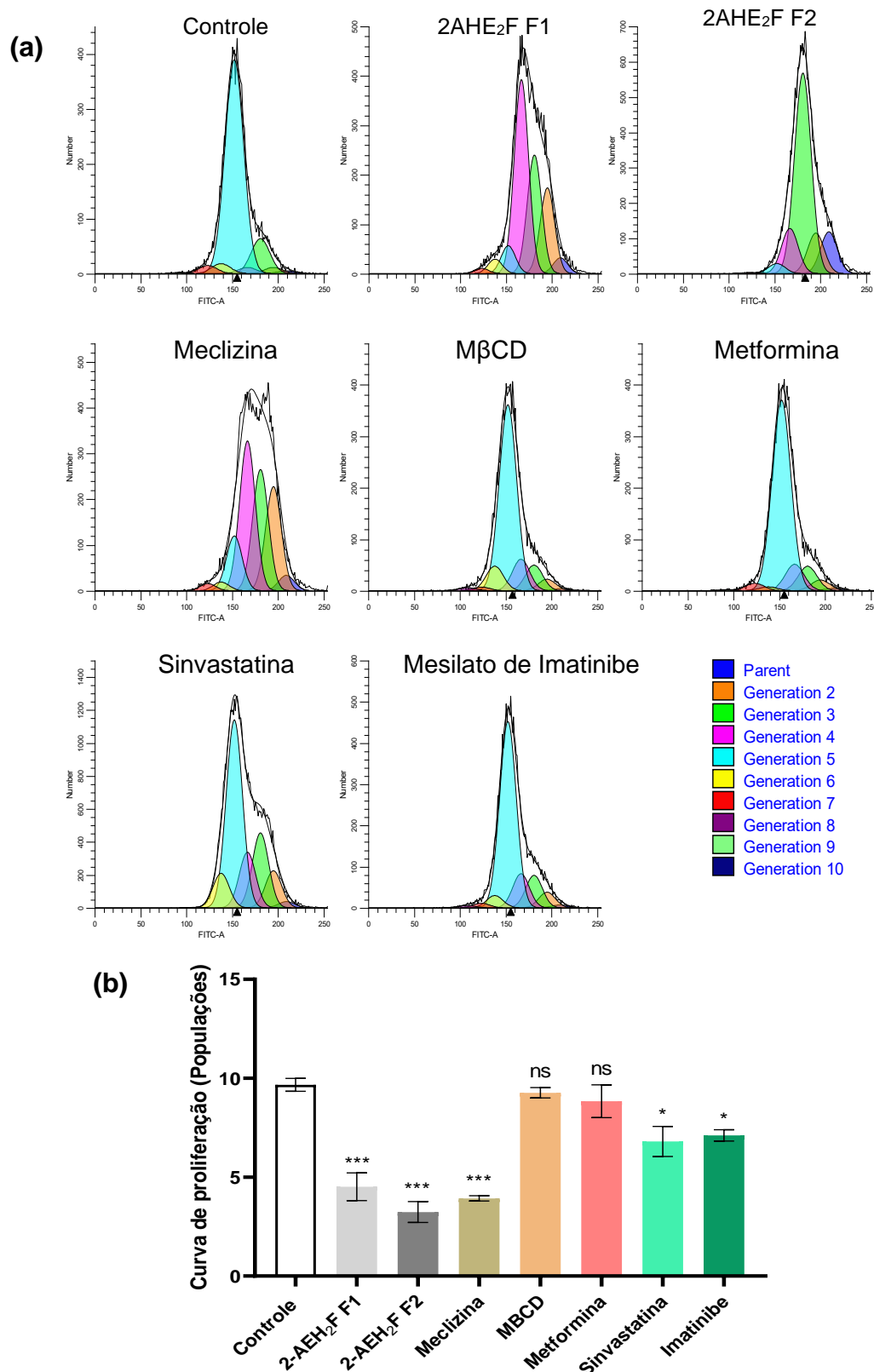


**Figura 46.** Análise do potencial elétrico mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) na célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 por citometria de fluxo. As células foram tratadas com os compostos associados ao Mesilato de Imatinibe nos valores de  $IC_{50}$  obtidos anteriormente por um período de 24h. Gráfico de barras mostrando o  $\Delta\psi_m$  expresso como média $\pm$ DP de três experimentos independentes. DensityPlots representativos da distribuição de acordo com  $\Delta\psi_m$ . As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . ns=não significativo.

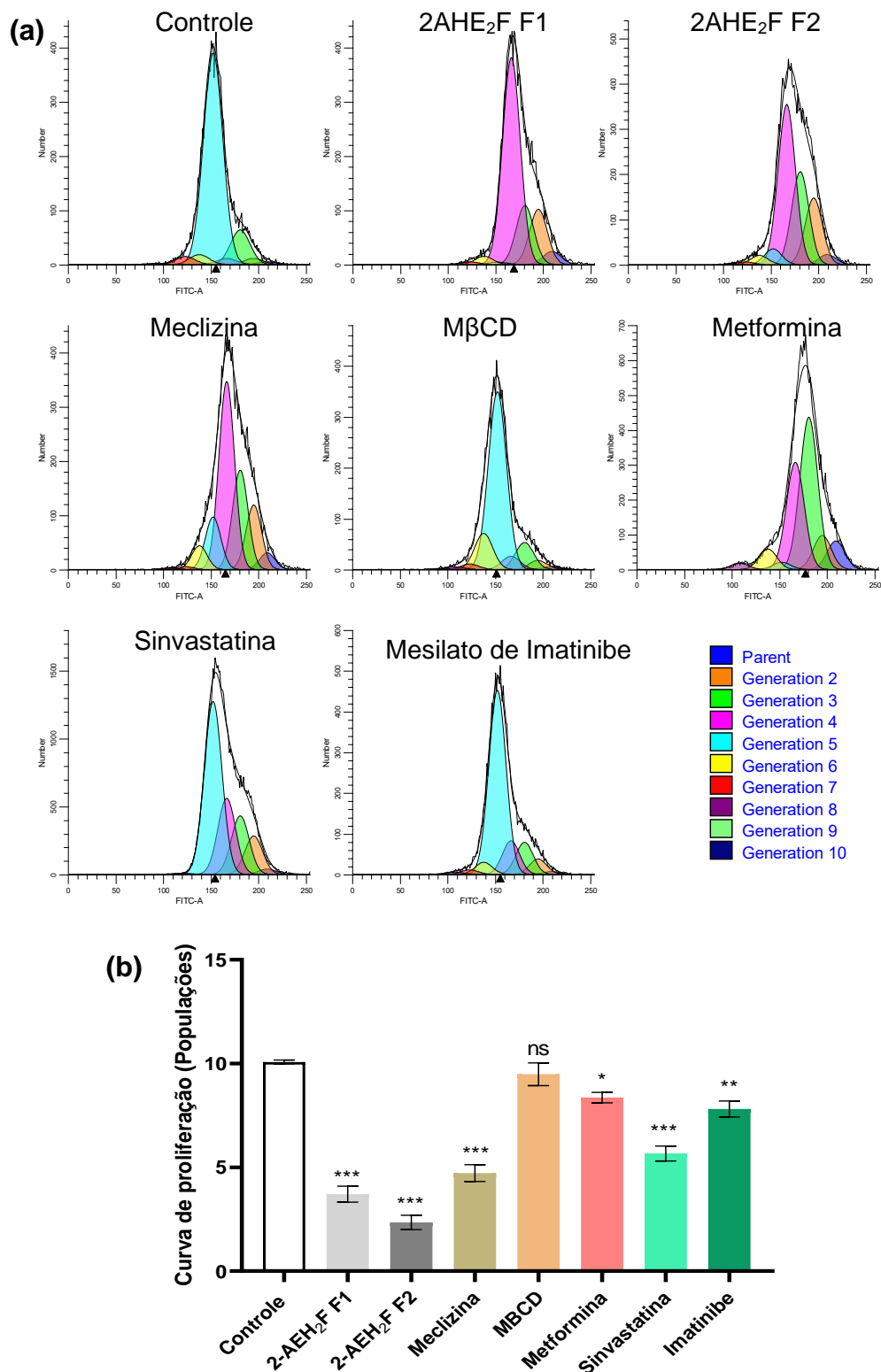
#### **4.8. Determinação da atividade proliferativa da célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 pelo teste CSFE-DA.**

É possível observar que os compostos isolados com exceção da M $\beta$ CD e Metformina promoveram redução do índice proliferativo. Os tratamentos com os compostos 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e 2-AEH<sub>2</sub>F F2 alteraram a capacidade proliferativa da célula tumoral, reduzindo em 66,5 $\pm$ 2,3% e 53,3 $\pm$ 2,9% respectivamente (Figura 47). O Cloridrato de Meclizina promoveu redução de 59,4 $\pm$ 0,8% da capacidade proliferativa (Figura 47). Os compostos Sinvastatina e Mesilato de Imatinibe também promoveram redução da capacidade proliferativa, quando comprando com os demais tratamentos, sendo 29,6 $\pm$ 3,5% e 26,4 $\pm$ 1,1% respectivamente.

Após 48h de tratamento, os tratamentos com os compostos 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e 2-AEH<sub>2</sub>F F2 reduzem significativamente o índice proliferativo em 76,7 $\pm$ 1,8% e 63,2 $\pm$ 1,9% respectivamente (Figura 48). Quando tratadas com o Cloridrato de Meclizina, há redução de 53,1 $\pm$ 2,0% da capacidade proliferativa, não tendo alteração tão significativa entre tempos de tratamento (Figura 48). A M $\beta$ CD não apresenta efetividade no período de 48h de tratamento, mas a Metformina promove redução da capacidade proliferativa (17,0 $\pm$ 1,2%). O tratamento com Sinvastatina gerou redução de 43,7 $\pm$ 2%, sendo mais efetiva na modulação da capacidade proliferativa, após 48h de tratamento (Figura 48). Não houve alteração significativa na capacidade proliferativa para o tratamento com o Mesilato de Imatinibe, quando comprando com o período de 24h, atingindo 22,4 $\pm$ 1,9% de redução em 48h (Figura 48).



**Figura 47. Avaliação do índice proliferativo da célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 por citometria de fluxo.** As células foram tratadas com os compostos isolados nos valores de IC<sub>50</sub>% por um período de 24h. **(a)** Histogramas representativos do índice proliferativo obtido através do Software WinMDI 5.0. **(b)** Gráficos de barras expresso em média±DP de três experimentos independentes do índice proliferativo da célula tumoral. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001. ns=não significativo

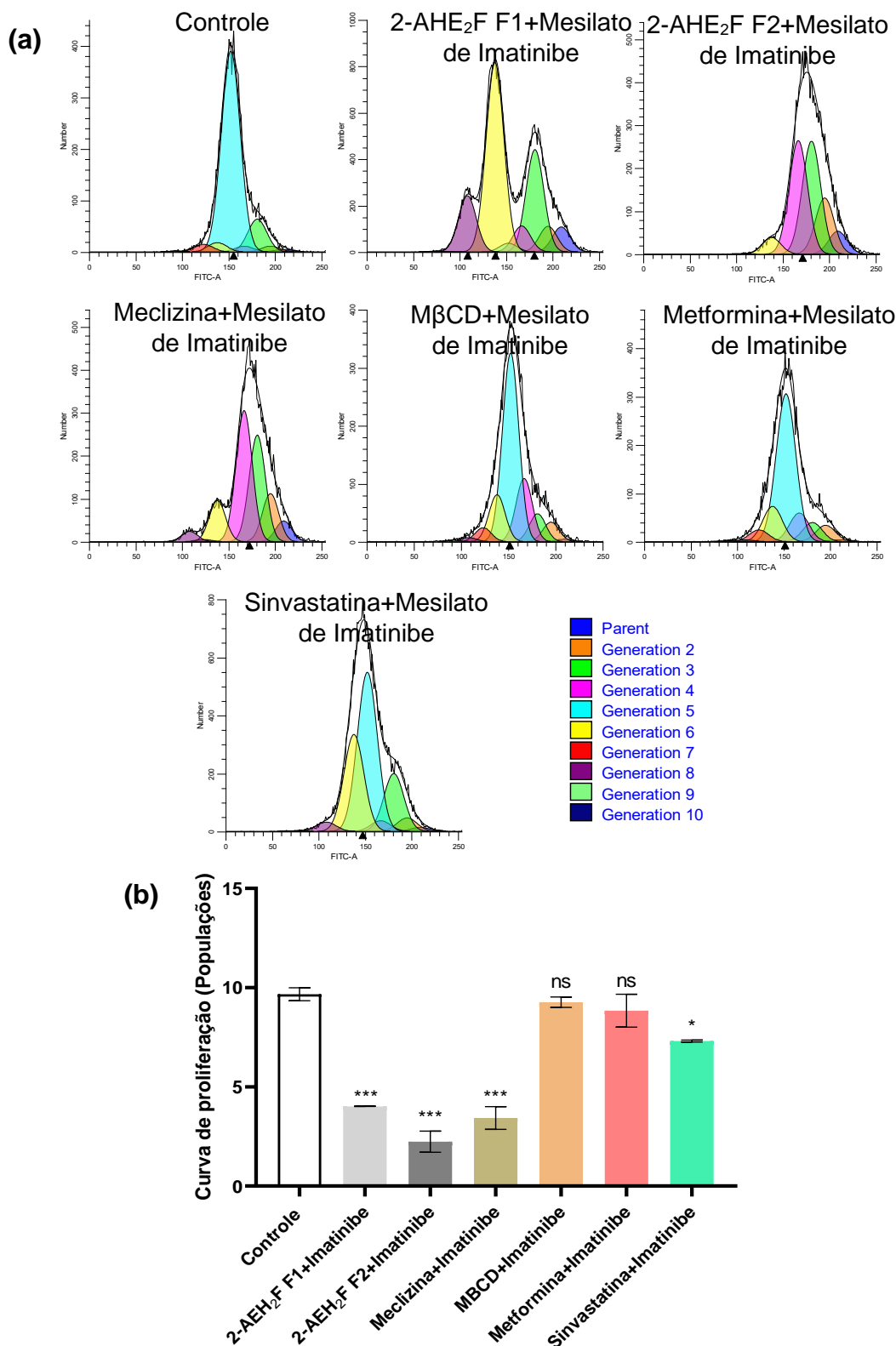


**Figura 48. Avaliação do índice proliferativo da célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 por citometria de fluxo.** As células foram tratadas com os compostos isolados nos valores de  $IC_{50\%}$  por um período de 48h. **(a)** Histogramas representativos do índice proliferativo obtido através do Software WinMDI 5.0. **(b)** Gráficos de barras expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes do índice proliferativo da célula tumoral. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . ns=não significativo

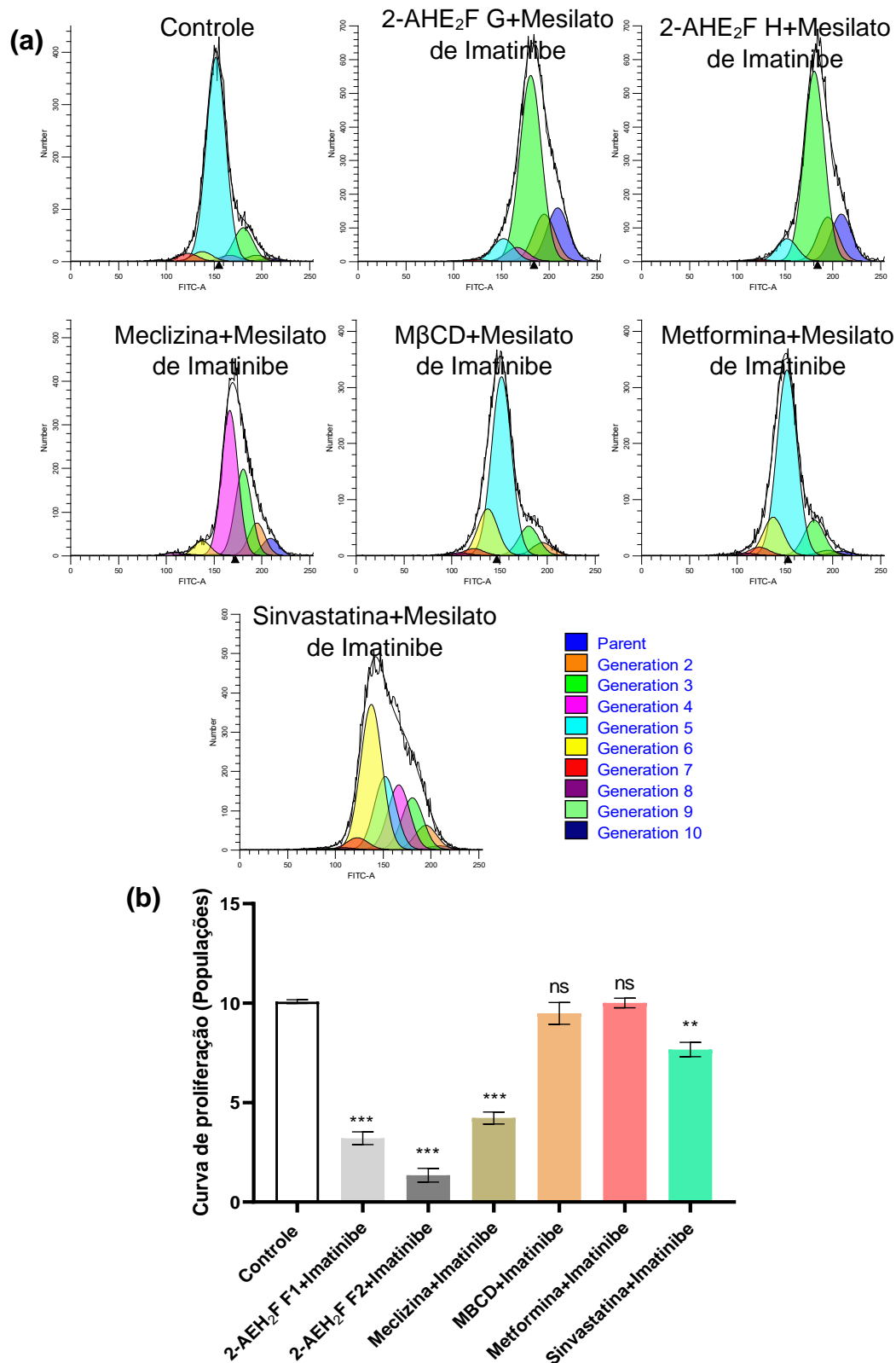
Foi observado efetividade da redução do índice proliferativo para célula tumoral quando associado o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e 2-AEH<sub>2</sub>F F2 ao Mesilato de Imatinibe no período de 24h, com valores de redução de 76,8±3,1% e 58,4±0,3% respectivamente (Figura 49). O Cloridrato de Meclizina associado ao Mesilato de Imatinibe também promoveu redução de 64,5±3,2% do índice proliferativo (Figura 49). Não foi observado redução significativa para os tratamentos com a MβCD e Metformina quando associados (Figura 49). Já a associação do Mesilato de Imatinibe com a Sinvastatina promoveu redução da capacidade proliferativa em 24,4±0,8%, resultado semelhante para o obtido para a Sinvastatina quando isolada no período de 24h (Figura 49).

Após 48h de tratamento, foi possível observar que a capacidade proliferativa se mantém reduzida para a associação do Mesilato de Imatinibe com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 (86,6±2,4%) e 2-AEH<sub>2</sub>F F2 (68,1±2,1%) (Figura 50). Resultado também observado para o tratamento da associação do Mesilato de Imatinibe com o Cloridrato de Meclizina, com redução de 58,0±2,0% da capacidade proliferativa da célula tumoral (Figura 50). Não foi observado alteração na capacidade proliferativa para os tratamentos com a MβCD e Metformina associados ao Mesilato de Imatinibe (Figura 50). A Sinvastatina associada ao Mesilato de Imatinibe apresenta redução de 23,9±2,0% da capacidade proliferativa, não diferindo em relação ao tratamento no período de 24h (Figura 50).





**Figura 49. Avaliação do índice proliferativo da célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 por citometria de fluxo.** As células foram tratadas com os compostos associados ao Mesilato de Imatinibe nos valores de  $IC_{50\%}$  obtidos anteriormente por um período de 24h. **(a)** Histogramas representativos do índice proliferativo obtido através do Software WinMDI 5.0. **(b)** Gráficos de barras expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes do índice proliferativo da célula tumoral. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . ns=não significativo



**Figura 50. Avaliação do índice proliferativo da célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 por citometria de fluxo.** As células foram tratadas com os compostos associados ao Mesilato de Imatinibe nos valores de IC<sub>50</sub>% obtidos anteriormente por um período de 24h. **(a)** Histogramas representativos do índice proliferativo obtido através do Software WinMDI 5.0. **(b)** Gráficos de barras expresso em média±DP de três experimentos independentes do índice proliferativo da célula tumoral. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001. ns=não significativo.

#### **4.9. Expressão de proteínas envolvidas no mecanismo de morte celular e proliferação nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 por citometria de fluxo.**

A célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 foi tratada por um período de 12h com os tratamentos que apresentaram maior efetividade de acordo com os experimentos realizados anteriormente. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo após marcação com os anticorpos específicos.

Foi possível observar aumento do número de células tumorais expressando a proteína p53 após o tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1 (76,8±3,3%) e 2-AEH<sub>2</sub>F F2 (79,6±6,1%) (Figura 51). Não houve alteração para expressão nos tratamentos com o Cloridrato de Meclizina e Metformina (Figura 51). O tratamento com Sinvastatina e com o Mesilato de Imatinibe também promoveram aumento em 75,1±5,9% e 73,3±3,1% da população de células expressando p53 (Figura 51). Quando associados ao Mesilato de Imatinibe, também é possível observar aumento considerável na expressão para o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 (71,7±6,4%), 2-AEH<sub>2</sub>F F2 (74,4±4,8%), Cloridrato de Meclizina (72,3±4,7%) e Sinvastatina (77,9±4,5%) (Figura 51).

Aumento significativo também foi observado para a proteína Bad quando tratada com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 (84,2±5,1%) e 2-AEH<sub>2</sub>F F2 (85,1±3,9%) (Figura 52). Não foi observado alteração no número de células tumorais expressando Bad para os tratamentos com o Cloridrato de Meclizina e com a Metformina (Figura 52). Os tratamentos com a Sinvastatina e com o Mesilato de Imatinibe apresentaram eficiência em promover aumento da expressão em 84,0±6,2% e 82,8±4,8% respectivamente (Figura 52). Todas as associações com o Mesilato de Imatinibe promoveram modulação das populações celulares, aumentando expressão de Bad, 2-AEH<sub>2</sub>F F1 (84,2±5,5%), 2-AEH<sub>2</sub>F F2 (83,0±2,1%), Cloridrato de Meclizina (84,3±4,7%) e Sinvastatina (84,9±4,3%) (Figura 52).

Em concordância com os resultados anteriores, foi observado aumento da proteína pro-apoptótica Bax na população de células analisadas para o tratamento com 2-AEH<sub>2</sub>F F1 (82,7±4,2%) e 2-AEH<sub>2</sub>F F2 (81,2±3,7%) (Figura 53). Os tratamentos com o Cloridrato de Meclizina e com a Metformina não promoveram alterações significativo (Figura 53). Houve aumento significativo para os tratamentos com a Sinvastatina (83,3±3,9%) e Mesilato de Imatinibe

(76,8±3,1%) (Figura 53). As associações com o Mesilato de Imatinibe promoveram aumentando expressão de Bax para os tratamentos com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 (81,4±3,5%), 2-AEH<sub>2</sub>F F2 (82,0±4,1%), Meclizina (77,7±4,2%) e Sinvastatina (77,4±3,8%) (Figura 53).

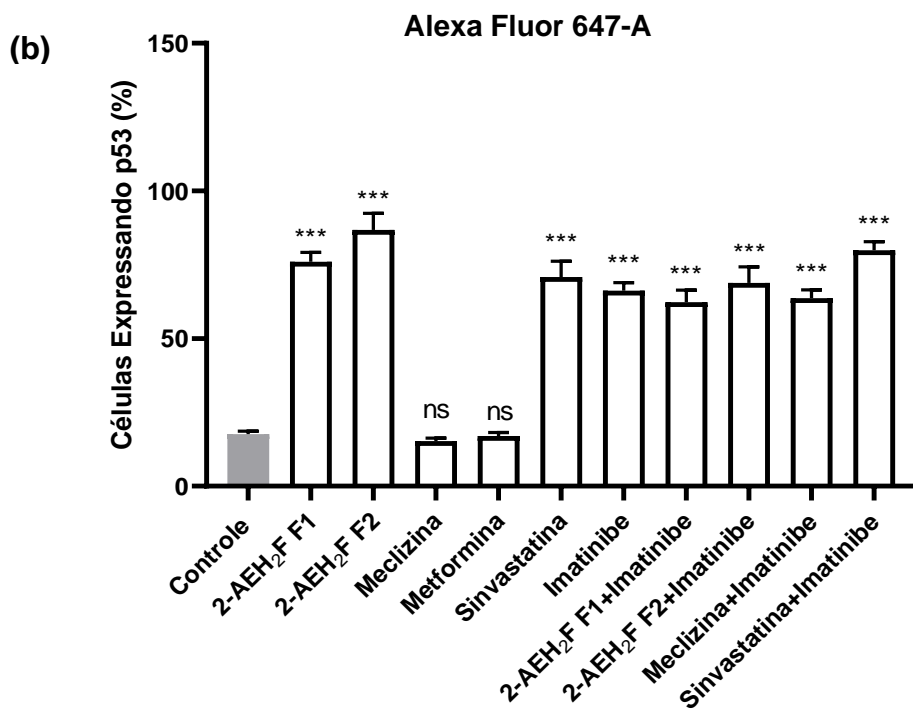
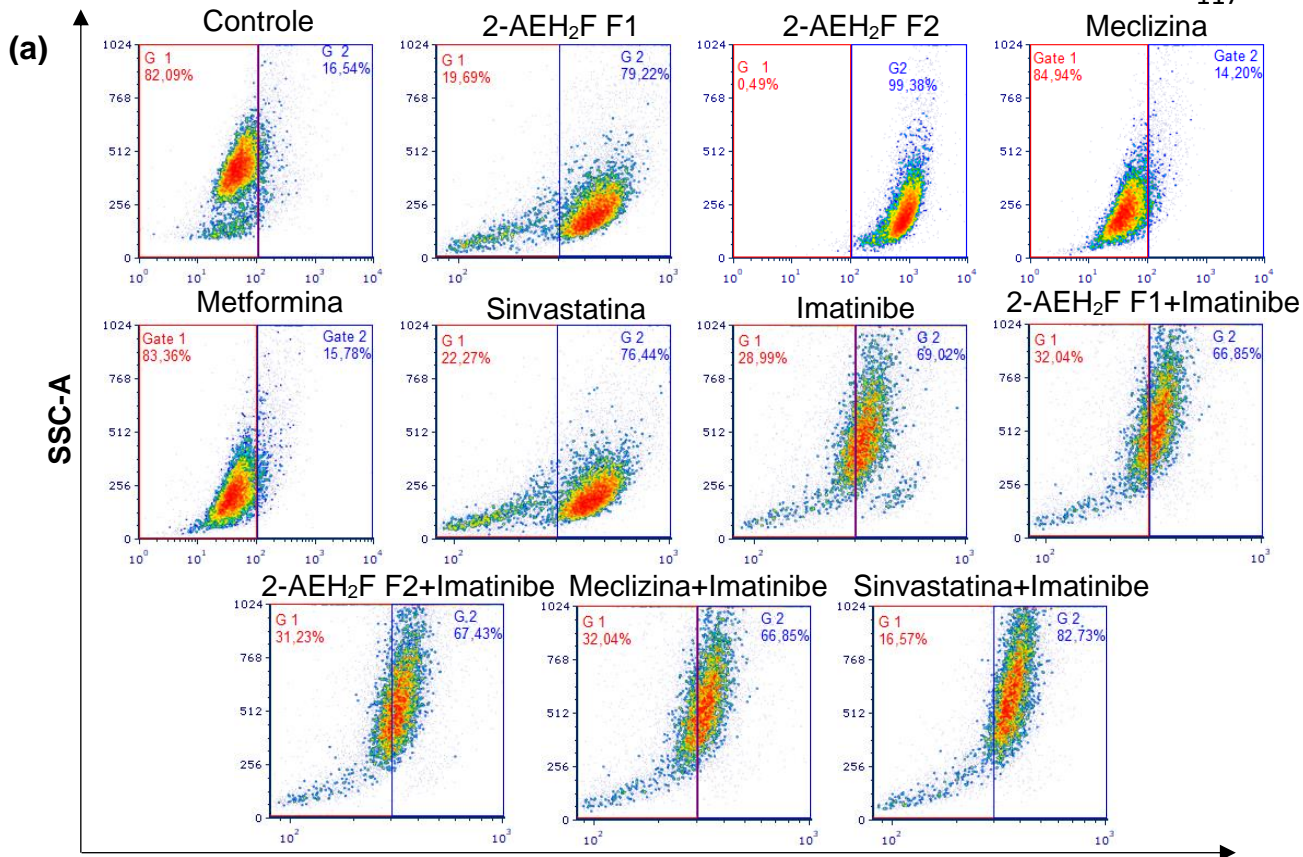
**Tabela 4.** Análise da expressão dos marcadores nas célula de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 após os tratamentos.

| Tratamentos                       | Marcadores |     |     |       |       |       |     |      |
|-----------------------------------|------------|-----|-----|-------|-------|-------|-----|------|
|                                   | p53        | Bad | Bax | Bcl-2 | CitoC | Casp3 | DR4 | PCNA |
| 2-AEH <sub>2</sub> F F1           | ↑          | ↑   | ↑   | ↓     | ↑     | ↑     | ns  | ↓    |
| 2-AEH <sub>2</sub> F F2           | ↑          | ↑   | ↑   | ↓     | ↑     | ↑     | ns  | ↓    |
| Meclizina                         | ns         | ns  | ns  | ns    | ns    | ns    | ↑   | ↓    |
| Metformina                        | ns         | ns  | ns  | ns    | ns    | ns    | ↑   | ns   |
| Sinvastatina                      | ↑          | ↑   | ↑   | ↓     | ↑     | ↑     | ns  | ns   |
| Mesilato de Imatinibe             | ↑          | ↑   | ↑   | ↓     | ↑     | ↑     | ↑   | ↓    |
| 2-AEH <sub>2</sub> F F1+Imatinibe | ↑          | ↑   | ↑   | ↓     | ↑     | ↑     | ↑   | ↓    |
| 2-AEH <sub>2</sub> F F2+Imatinibe | ↑          | ↑   | ↑   | ↓     | ↑     | ↑     | ↑   | ↓    |
| Meclizina+Imatinibe               | ↑          | ↑   | ↑   | ns    | ↑     | ↑     | ↑   | ↓    |
| Sinvastatina+Imatinibe            | ↑          | ↑   | ↑   | ns    | ↑     | ↑     | ↑   | ↓    |

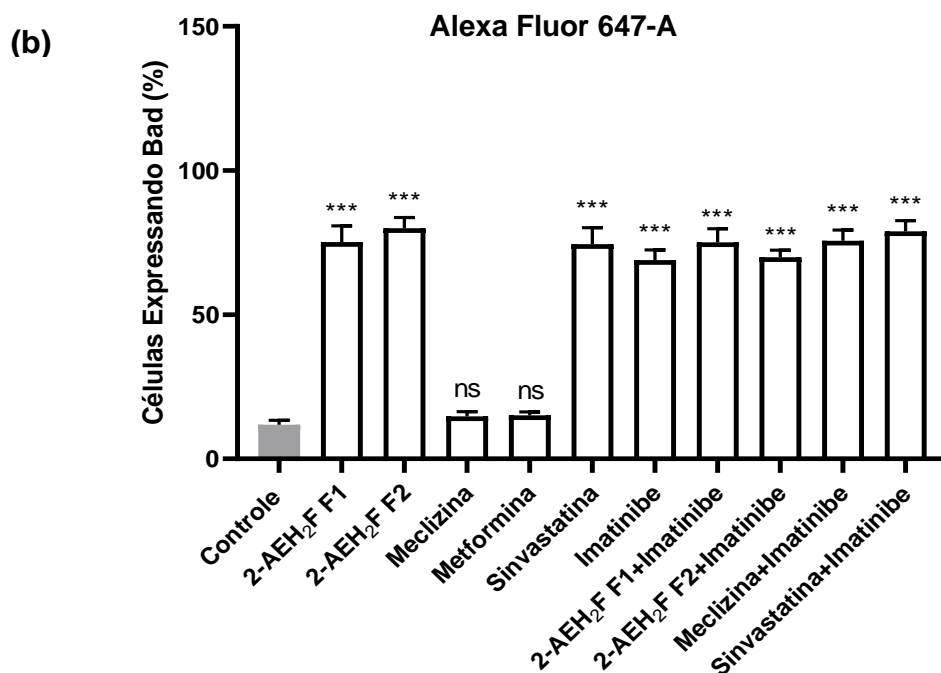
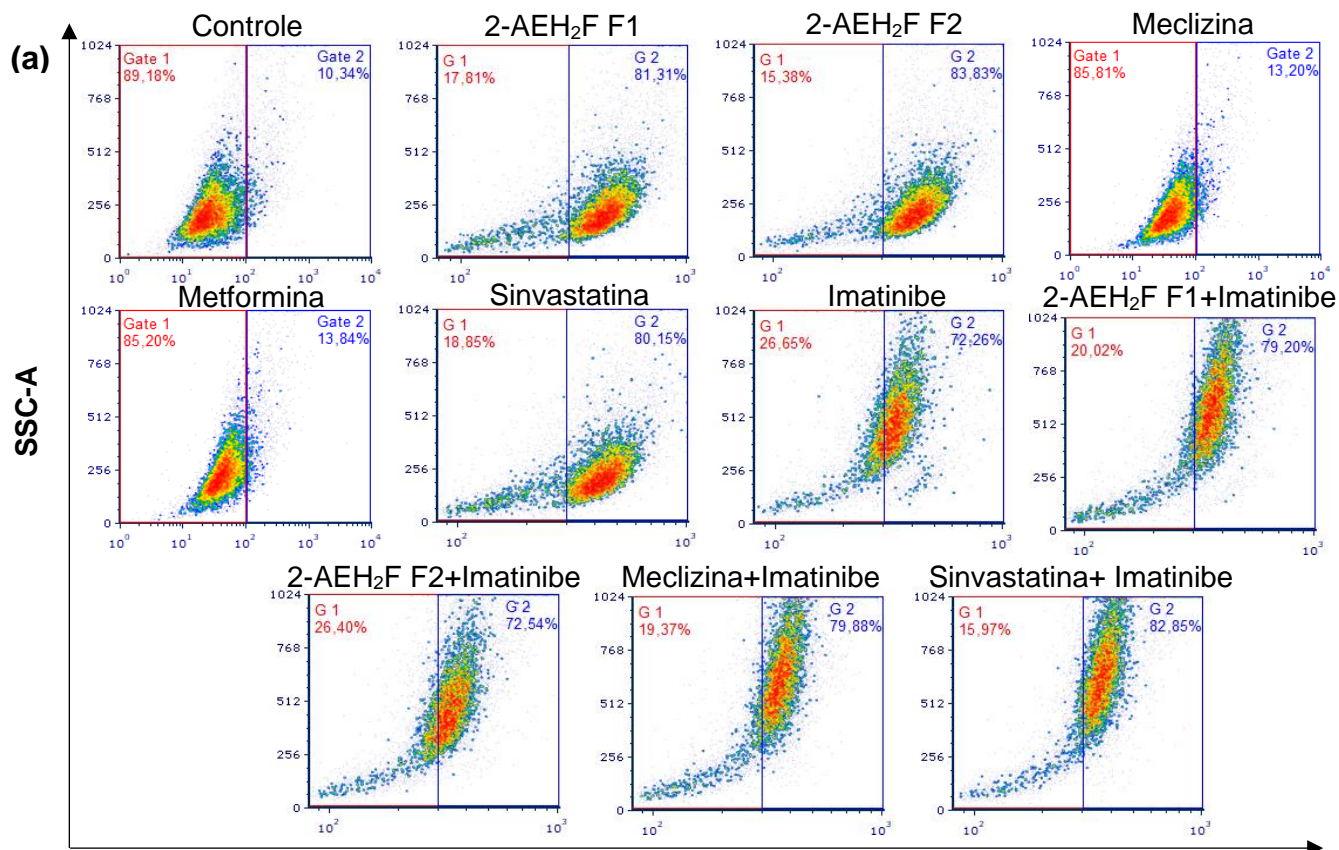
↑ = aumento de expressão/liberação;

↓ = redução de expressão/liberação;

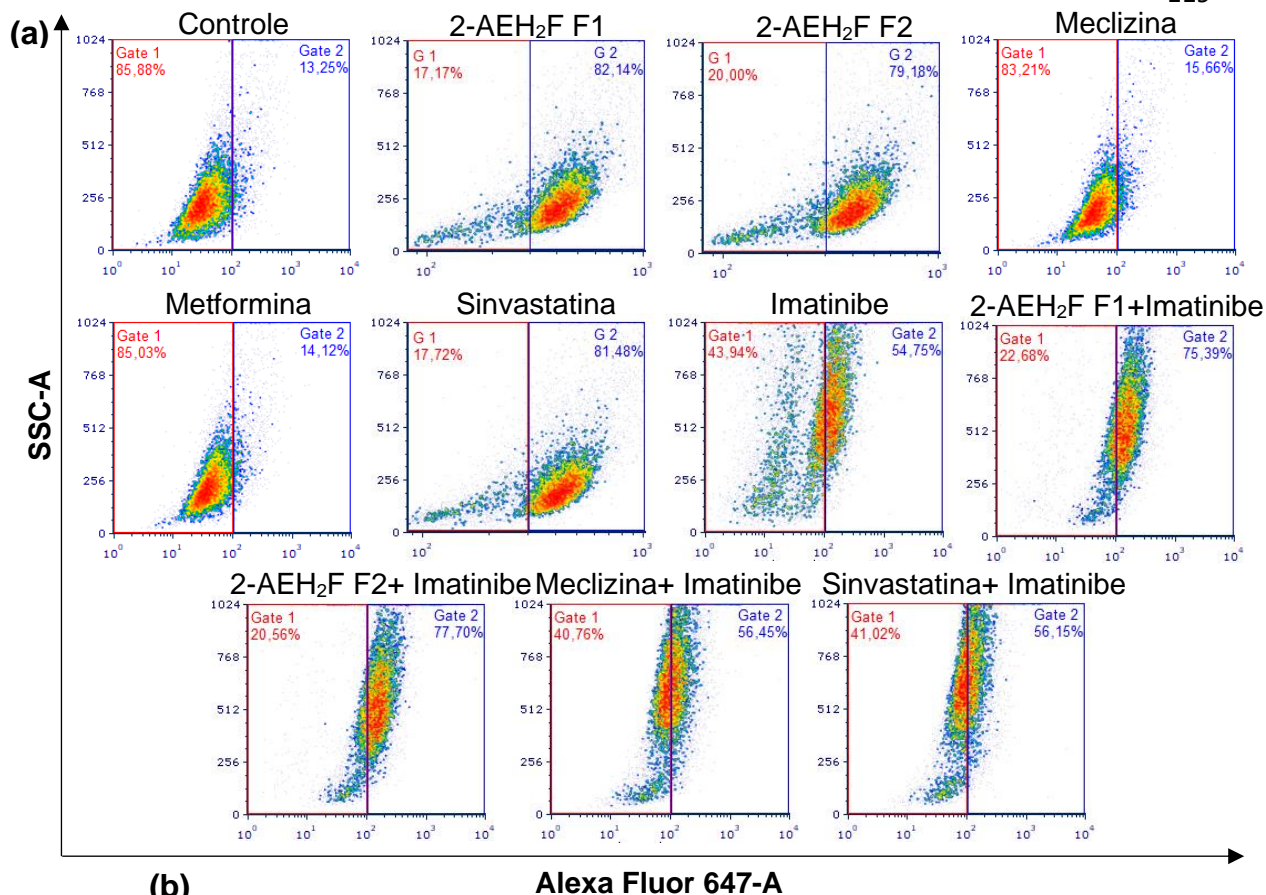
n/s= Não significativo



**Figura 51. Análise da expressão de p53 em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** A expressão foi quantificada por citometria de fluxo, após 12h de tratamento nos valores de IC<sub>50</sub>%. **(a)** DensityPlots representativos das células expressando a proteína p53 obtido através do Software FCS Express. **(b)** Gráficos de barra expressos como média ± DP de três experimentos independentes da porcentagem de células K562 expressando a proteína p53. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001. ns=não significativo.



**Figura 52. Análise da expressão de Bad em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** A expressão foi quantificada por citometria de fluxo, após 12h de tratamento nos valores de IC<sub>50</sub>%. **(a)** DensityPlots representativos das células expressando a proteína Bad obtido através do Software FCS Express. **(b)** Gráficos de barra expressos como média  $\pm$  DP de três experimentos independentes da porcentagem de células K562 expressando a proteína Bad. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . ns=não significativo.



**Figura 53. Análise da expressão de Bax em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** A expressão foi quantificada por citometria de fluxo, após 12h de tratamento nos valores de IC<sub>50</sub>%. **(a)** DensityPlots representativos das células expressando a proteína Bax obtido através do Software FCS Express. **(b)** Gráficos de barra expressos como média ± DP de três experimentos independentes da porcentagem de células K562 expressando a proteína Bax. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001. ns=não significativo.

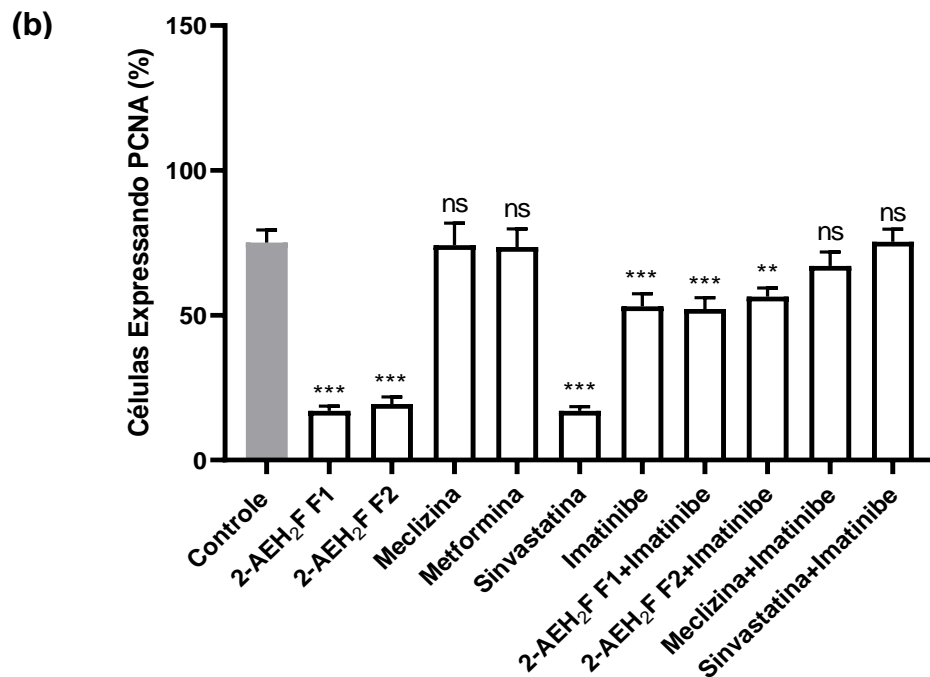
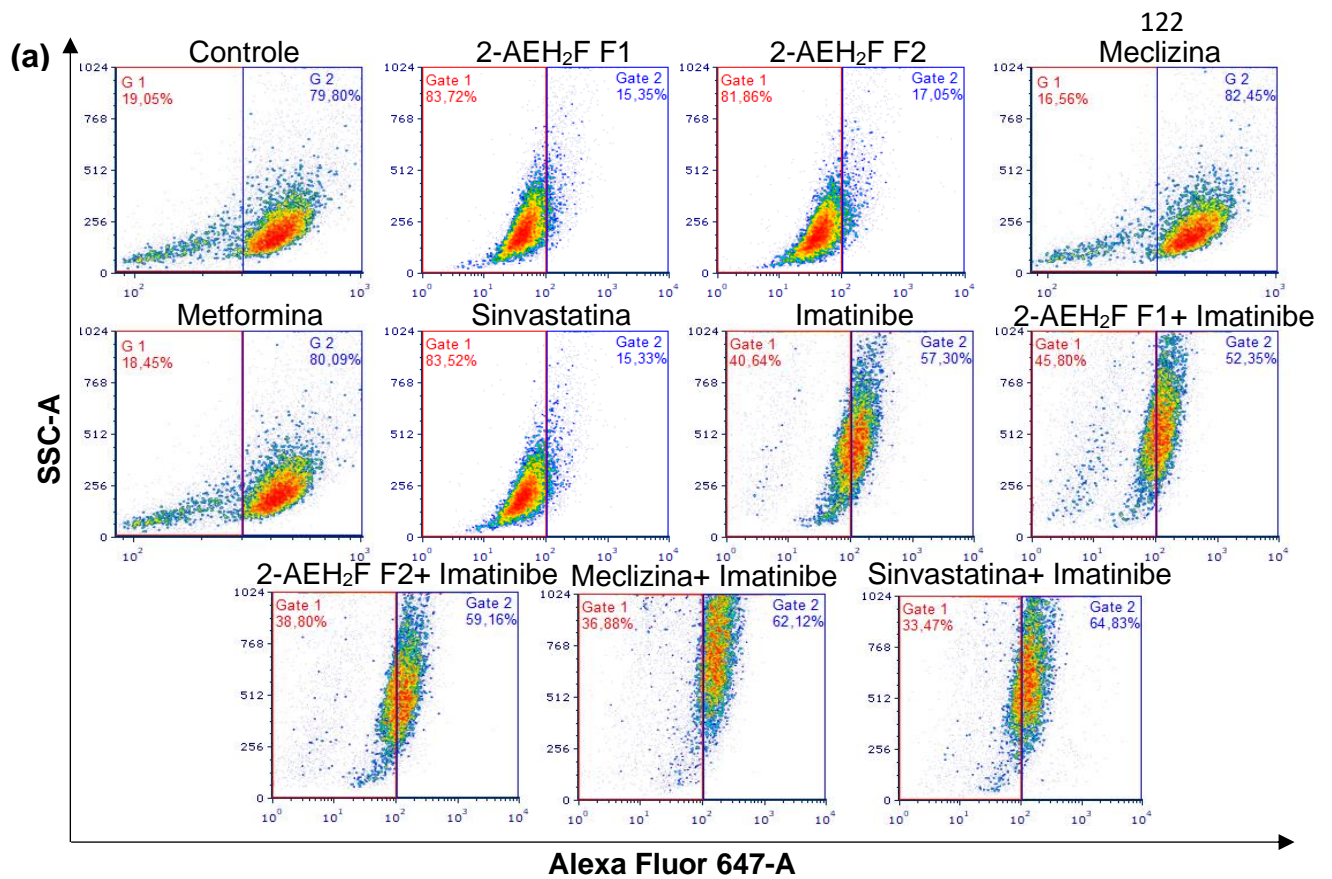
A análise das células expressando a proteína anti-apoptótica Bcl-2 demonstrou que os tratamentos com os compostos 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e 2-AEH<sub>2</sub>F F2 apresentaram eficiência pró-apoptótica reduzindo a expressão desse marcador nessa população, com valores percentuais de 77,3±1,8% e 74,2±2,0% respectivamente (Figura 54). Não foi observado efetividade para os tratamentos com o Cloridrato de Meclizina e a Metformina (Figura 54). O tratamento com Sinvastatina e com o Mesilato de Imatinibe também demonstraram reduzir a população de células expressando a proteína Bcl-2 em 77,4±1,7% e 29,3±5,1% respectivamente (Figura 54). As associações do Mesilato de Imatinibe com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e 2-AEH<sub>2</sub>F F2 apresentaram eficiência menor que os compostos isolados na redução de populações expressando Bcl-2, com valores de 30,5±4,5% e 24,8±4,2% (Figura 54). Foi observado pequena alteração na distribuição da população celular expressando Bcl-2 para os tratamentos associados do Mesilato de Imatinibe com o Cloridrato de Meclizina e Sinvastatina, com percentual de 10,7±5,4% e 10,8±4,7% (Figura 54).

A avaliação da liberação de citocromo C, evidencia que os tratamentos com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e 2-AEH<sub>2</sub>F F2 promoveram liberação de 80,1±5,4% e 80,7±6,3% de Citocromo C (Figura 55). Não foi observado alteração para os tratamentos com o Cloridrato de Meclizina e a Metformina (Figura 55). Para o tratamento com a Sinvastatina e com o Mesilato de Imatinibe, foi visto significativa liberação de Citocromo C, com valores percentuais de 79,3±6,1% e 82,9±4,7% (Figura 55). A associação do Mesilato de Imatinibe com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1, 2-AEH<sub>2</sub>F F2 e Cloridrato de Meclizina, apresentaram menor percentual de liberação quando comparado com os tratamentos isolados, com valores de 66,7±1,8%, 68,0±2,1% e 66,2±2,6% (Figura 55). Quando associado com a Sinvastatina, apresentou alta liberação de citocromo C no citoplasma, 81,7±5,8% (Figura 55).

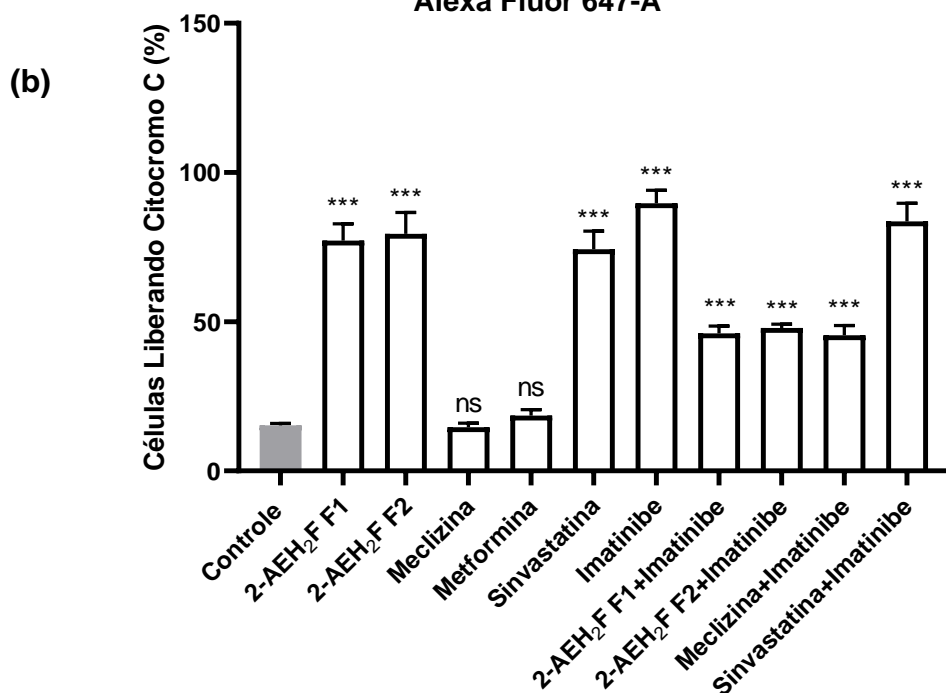
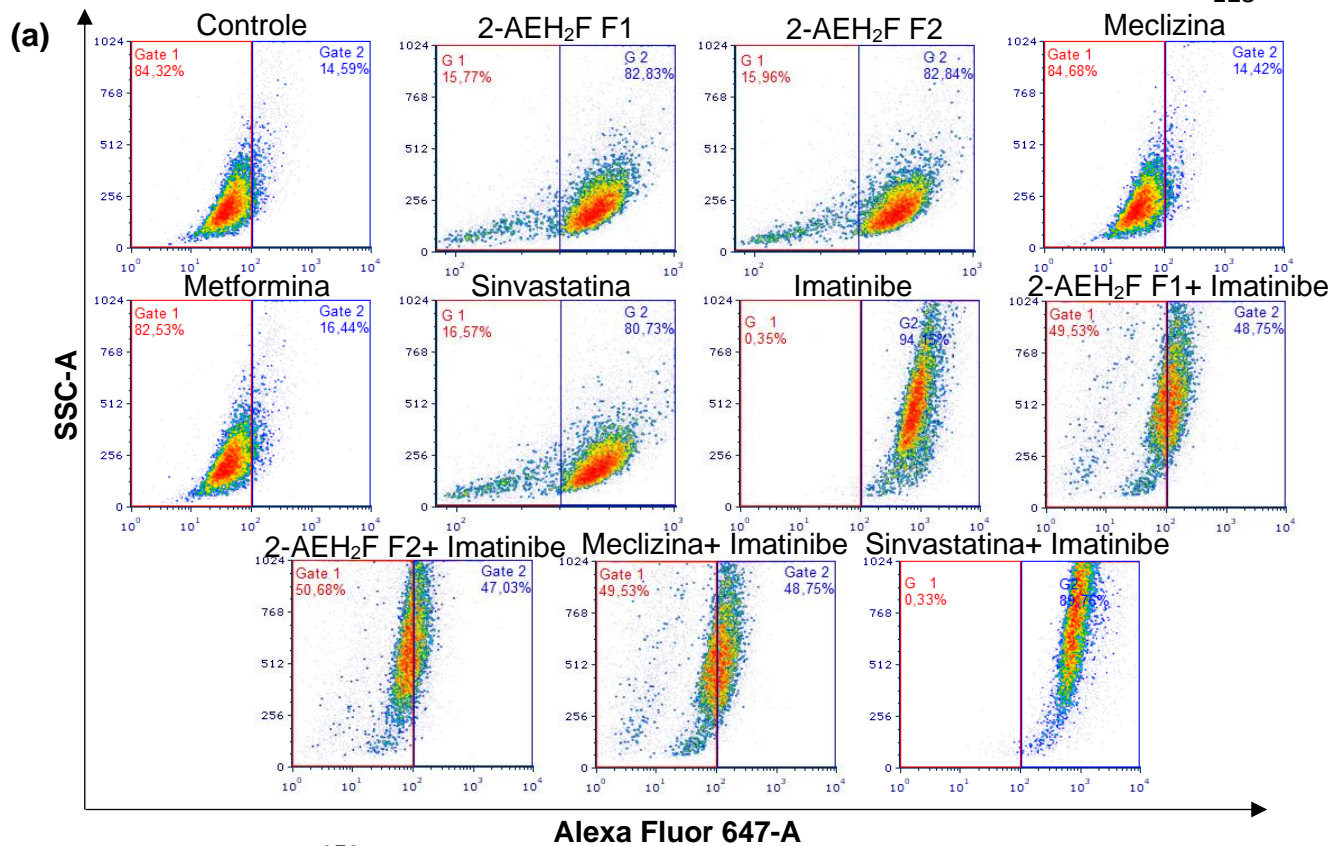
A modulação da expressão de caspase 3, sugere a capacidade de ativação da via de morte celular regulada por via intrínseca para os tratamentos com 2-AEH<sub>2</sub>F F1 (84,6±9,9%), 2-AEH<sub>2</sub>F F2 (85,8±4%), Sinvastatina (81,5±5,3%) e Mesilato de Imatinibe (78,1±5,0%) (Figura 56). Não houve alteração para os tratamentos com o Cloridrato de Meclizina e Metformina (Figura 56). A associação do Mesilato de Imatinibe com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 (70,4±4,1%), 2-AEH<sub>2</sub>F F2 (76,52±4,8%), Cloridrato de Meclizina (77,4±5,3%) e Sinvastatina



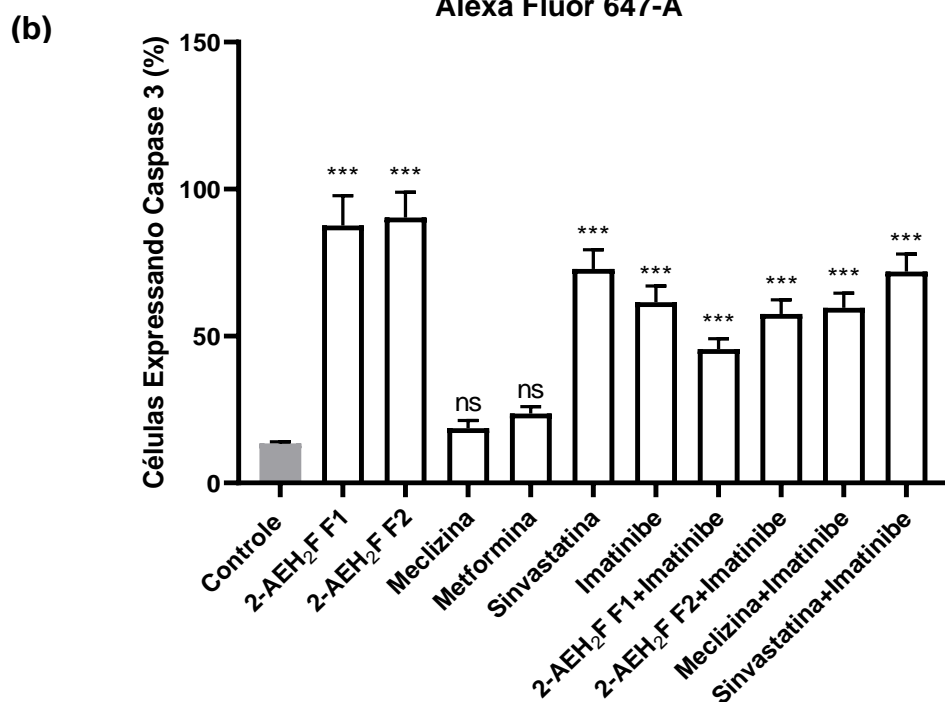
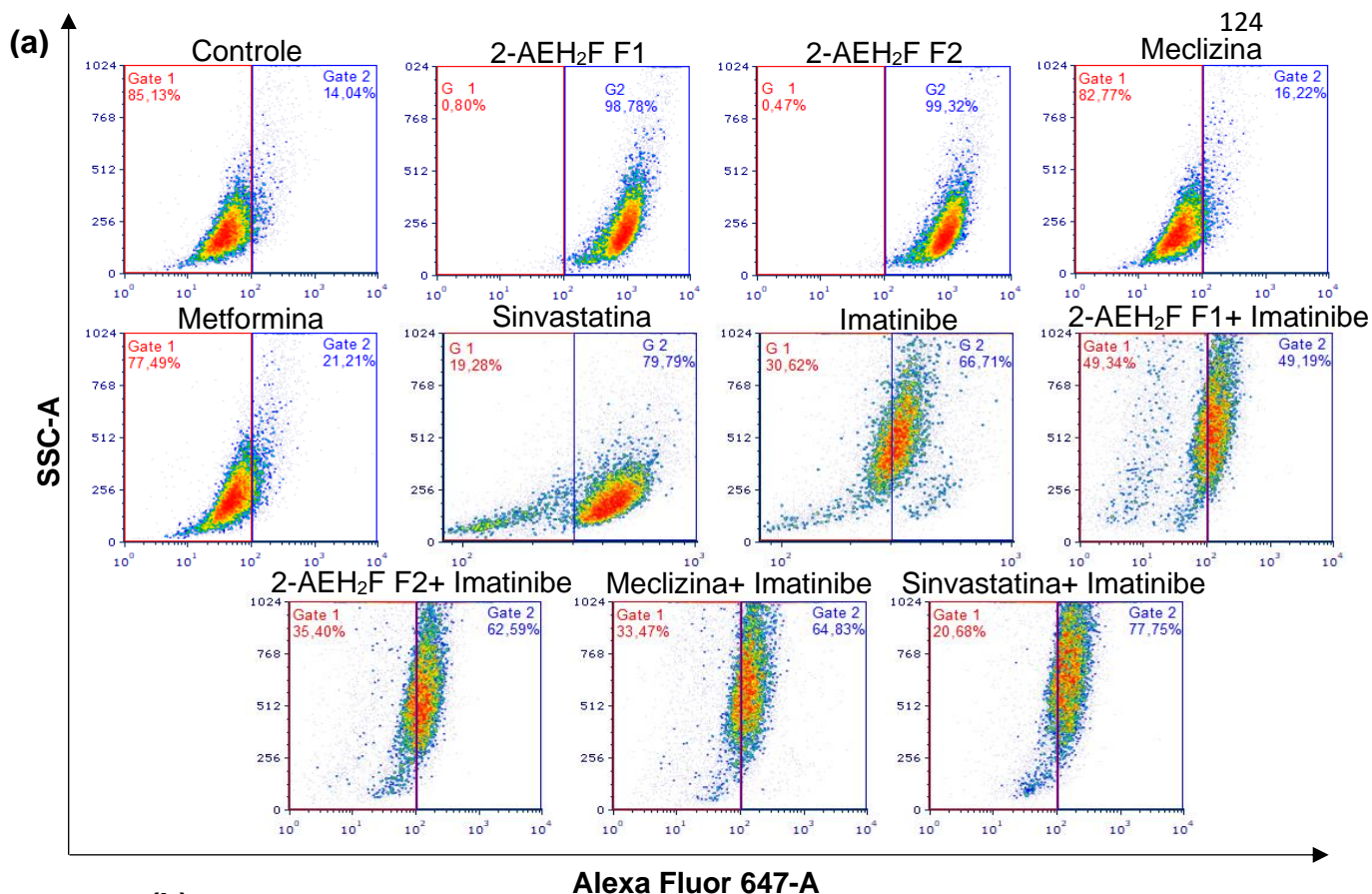
(81,2±5,5%) também apresentaram eficiência na modulação da população de células tumorais expressando a proteína pró-apoptótica caspase 3 (Figura 56).



**Figura 54. Análise da expressão de Bcl-2 em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** A expressão foi quantificada por citometria de fluxo, após 12h de tratamento nos valores de IC<sub>50</sub>%. **(a)** DensityPlots representativos das células expressando a proteína Bcl-2 obtido através do Software FCS Express. **(b)** Gráficos de barra expressos como média ± DP de três experimentos independentes da porcentagem de células K562 expressando a proteína Bcl-2. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001. ns=não significativo.



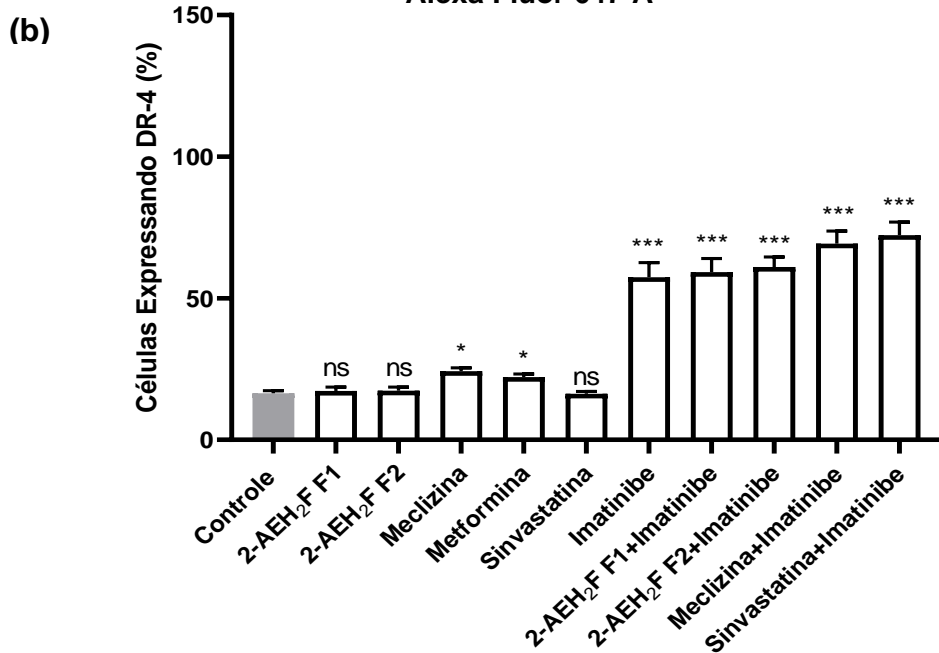
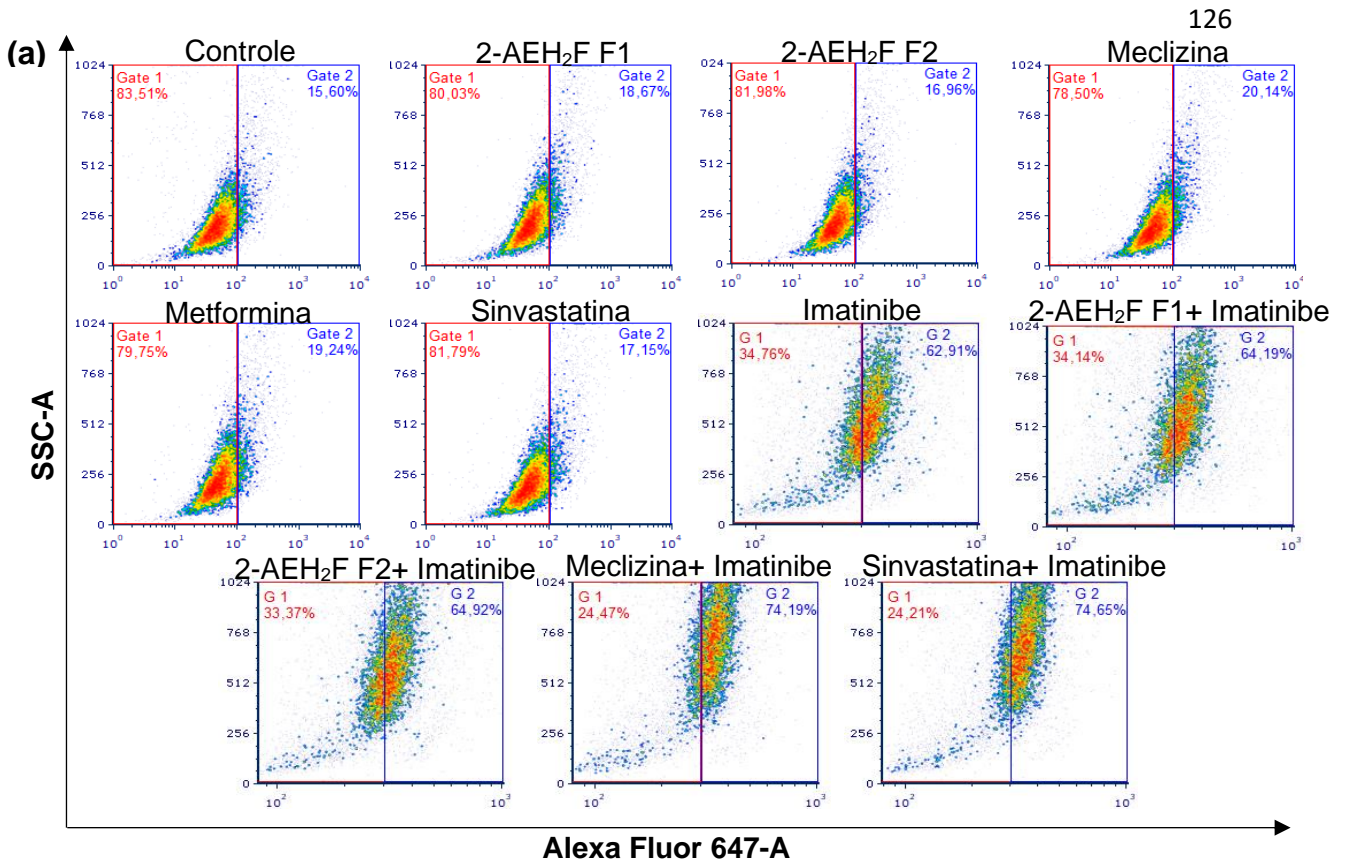
**Figura 55. Análise da liberação de Citocromo C em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** A expressão foi quantificada por citometria de fluxo, após 12h de tratamento nos valores de IC<sub>50</sub>. **(a)** DensityPlots representativos das células liberando Citocromo C obtido através do Software FCS Express. **(b)** Gráficos de barra expressos como média ± DP de três experimentos independentes da porcentagem de células K562 liberando Citocromo C. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001. ns=não significativo.



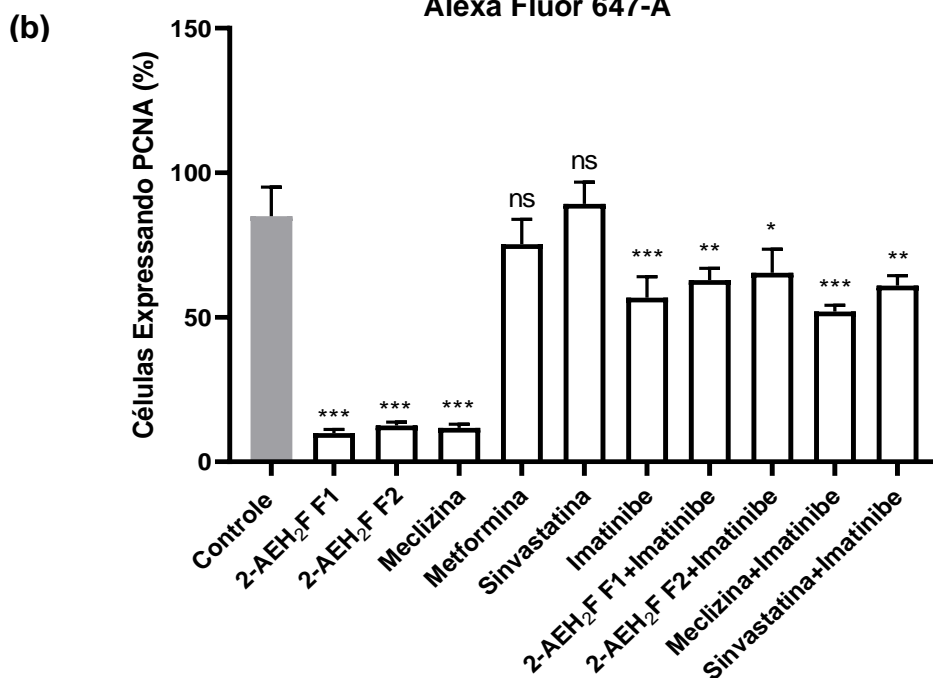
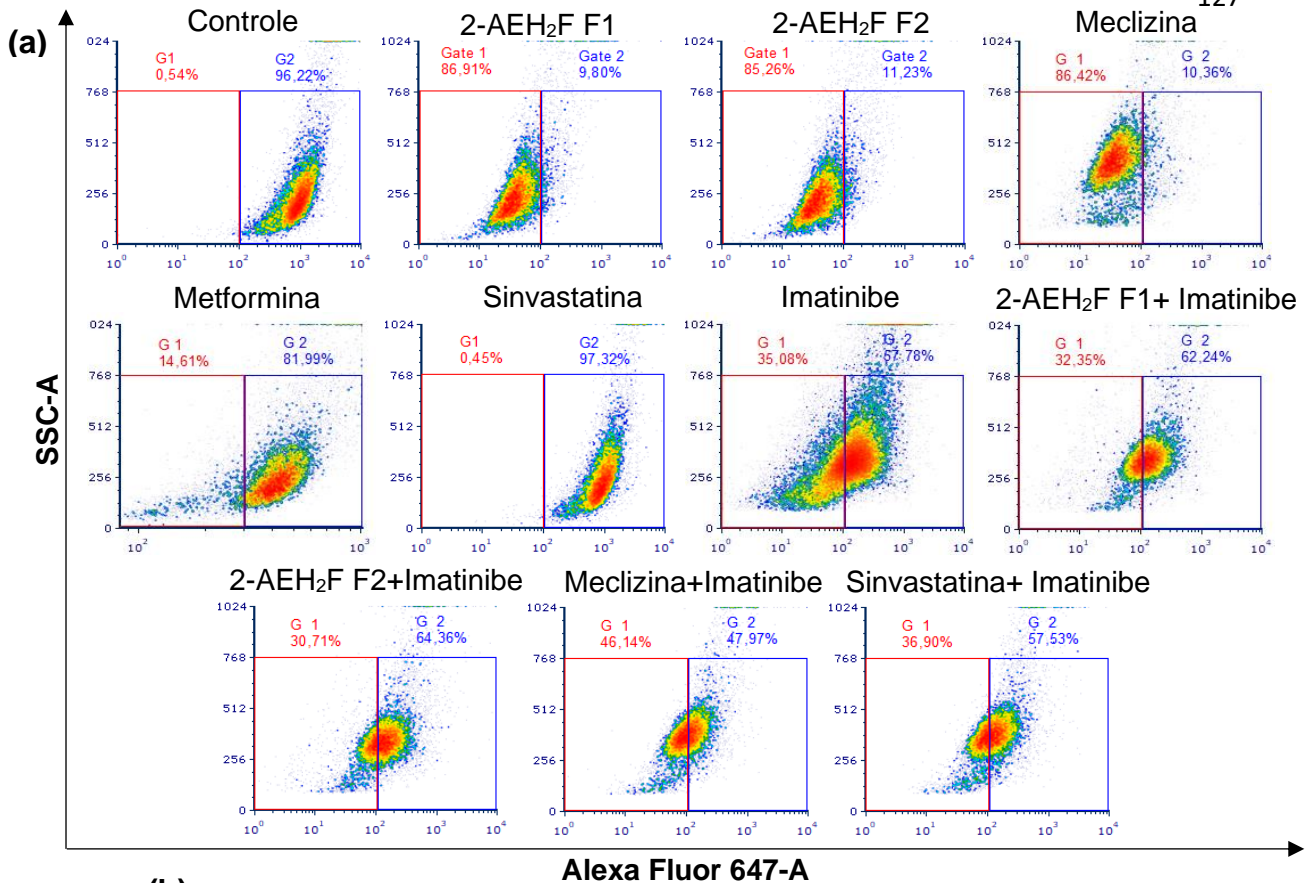
**Figura 56.** Análise da expressão de Caspase 3 em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562. A expressão foi quantificada por citometria de fluxo, após 12h de tratamento nos valores de IC<sub>50</sub>%. **(a)** DensityPlots representativos das células expressando Caspase 3 obtido através do Software FCS Express. **(b)** Gráficos de barra expressos como média ± DP de três experimentos independentes da porcentagem de células K562 expressando Caspase 3. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001. ns=não significativo.

Foi avaliado a expressão do receptor de morte dependente de TNF, Trail-DR4, foi observado que não houve alterações consideráveis para as populações tratadas com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1, 2-AEH<sub>2</sub>F F2 e Sinvastatina (Figura 57). Para o tratamento com o Cloridrato de Meclizina e Metformina, foi observado aumento da expressão do receptor DR4, com valores percentuais de  $32,3 \pm 1,8\%$  e  $25,7 \pm 1,6\%$  (Figura 57). Para o Mesilato de Imatinibe também é observado aumento de células expressando o receptor, com valor percentual de  $71,3 \pm 4,0\%$  (Figura 57). Quando em associação com o Mesilato de Imatinibe, foi possível observar aumento do receptor de morte Trail-DR4 para todos os tratamentos, o que leva a supor que o aumento é decorrente da presença do Mesilato de Imatinibe. Quando associado como o 2-AEH<sub>2</sub>F F1, 2-AEH<sub>2</sub>F F2, Cloridrato de Meclizina e Sinvastatina os valores foram de  $72,2 \pm 3,6\%$ ,  $73,1 \pm 3,4\%$ ,  $76,2 \pm 3,6\%$  e  $77,2 \pm 3,8\%$  respectivamente (Figura 57).

Além da avaliação de proliferação celular foi realizada a porcentagem de PCNA em cada tratamento. Os tratamentos com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e 2-AEH<sub>2</sub>F F2 apresentaram redução considerável do PCNA, com valores de  $88,2 \pm 1,7\%$  e  $85,2 \pm 1,9\%$  respectivamente (Figura 58). Não foi observado alteração da população de células tumorais expressando PCNA para os tratamentos com o Sinvastatina e Metformina (Figura 58). Redução semelhante ao ocorrido no 2-AEH<sub>2</sub>F é observado para o tratamento com o Cloridrato de Meclizina, obtendo valor de  $86,2 \pm 1,4\%$  (Figura 58). Quando tratadas com o Mesilato de Imatinibe, a redução foi de  $33,1 \pm 5,9\%$  (Figura 58). As associações com o Mesilato de Imatinibe promoveram redução da população celular expressando o PCNA, sendo menos significativa que para os compostos isolados. Quando associado com 2-AEH<sub>2</sub>F F1, 2-AEH<sub>2</sub>F F2, Cloridrato de Meclizina e Sinvastatina os valores foram de  $23,1 \pm 3,8\%$ ,  $22,9 \pm 5,6\%$ ,  $38,8 \pm 2,5\%$  e  $28,2 \pm 2,9\%$  respectivamente (Figura 58).



**Figura 57. Análise da expressão do receptor Trail-DR4 em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** A expressão foi quantificada por citometria de fluxo, após 12h de tratamento nos valores de IC<sub>50</sub>%. **(a)** DensityPlots representativos das células expressando receptor de morte celular Trail-DR4 obtido através do Software FCS Express. **(b)** Gráficos de barra expressos como média ± DP de três experimentos independentes da porcentagem de células K562 expressando o receptor de morte celular Trail-DR4. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001. ns=não significativo.



**Figura 58. Análise da expressão do PCNA em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.** A expressão foi quantificada por citometria de fluxo, após 12h de tratamento nos valores de IC<sub>50</sub>%. **(a)** DensityPlots representativos das células expressando o PCNA obtido através do Software FCS Express. **(b)** Gráficos de barra expressos como média ± DP de três experimentos independentes da porcentagem de células K562 expressando o PCNA. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001. ns=não significativo.

#### 4.10. Avaliação dos compostos 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e 2-AEH<sub>2</sub>F F2 na ativação de leucócitos polimorfonucleares

O sangue de 6 indivíduos foi devidamente coletado, processado e em seguida tratados por um período de 3h com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 em diversas concentrações para avaliação da ativação dos neutrófilos presentes. A amostra 1 (DCR) após o tratamento com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 apresentou aumento da população de neutrófilos da concentração de 0,625mM a 15mM em 76,3±3,1%, não apresentando alteração nas maiores concentrações (Figura 59). Quando tratado com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2, o resultado foi bem semelhante, sendo observado aumento considerável dos neutrófilos até a concentração 15mM em 65,8±4,0%, maior aumento percentual entre as concentrações de 0,625mM a 10mM com 81,8±3,5% (Figura 60).

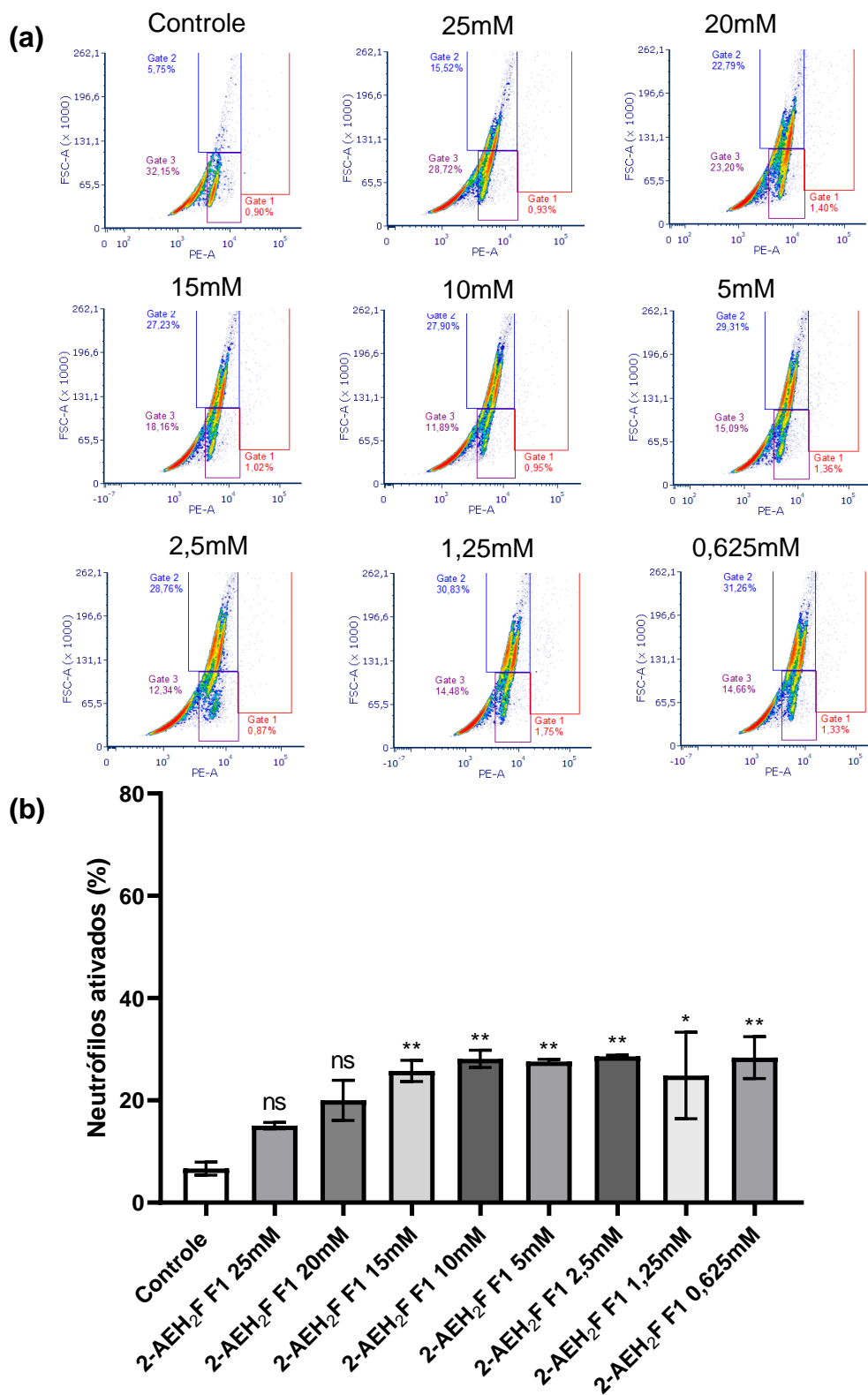
Após tratamento com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 para a amostra 2 (MRH), houve aumento dos neutrófilos ativados nas concentrações de 0,625mM a 10mM, com média de 91,1±5,7% (Figura 61), em contrapartida não houve alteração significativa quando tratado com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 (Figura 62). Quando analisando o tratamento da amostra 3 (SMC), é possível observar aumento do neutrófilo ativados em todas as concentrações, 0,625mM a 25mM, com 94,2±5,8% para o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 (Figura 63). O tratamento com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 promoveu maior aumento nas concentrações de 0,625mM a 10mM, sendo 95,4±6,9%, nas concentrações de 15mM a 20mM é possível observar aumento de 86,4±2,1% (Figura 64).

Resultado semelhante ao anterior foi observado para o tratamento da amostra 4 (MGA) para o 2-AEH<sub>2</sub>F F1, houve aumento dos neutrófilos em todas as concentrações, sendo mais significativo de 0,625mM 20mM, com aumento de 93,8±5,4%, e 76,6±1,8% para a concentração de 25mM (Figura 65). O tratamento com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 apresentou efetividade nas concentrações de 0,625mM a 15mM, com aumento médio percentual de 93,2±4,7% (Figura 66).

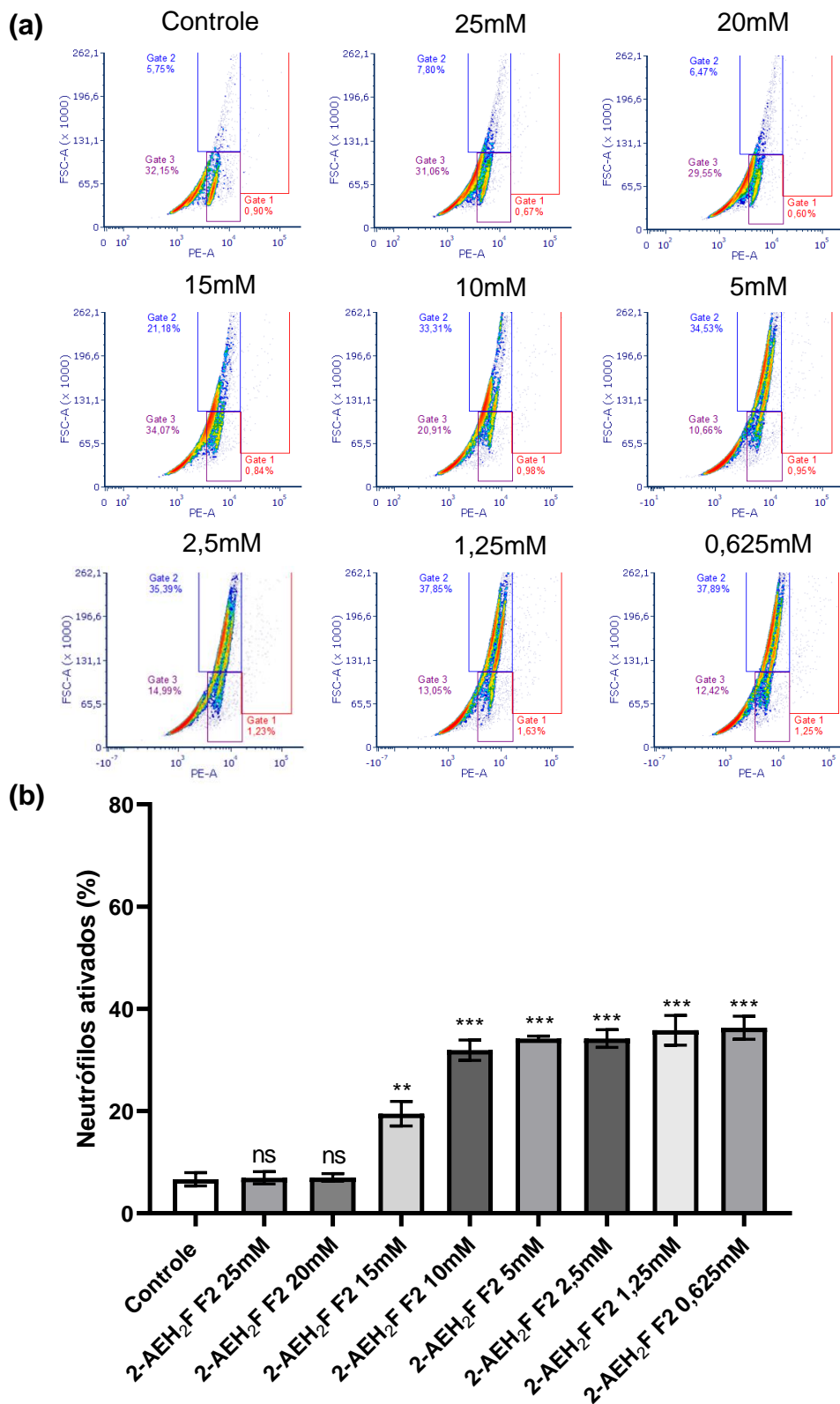


**Tabela 5.** Identificação das amostras

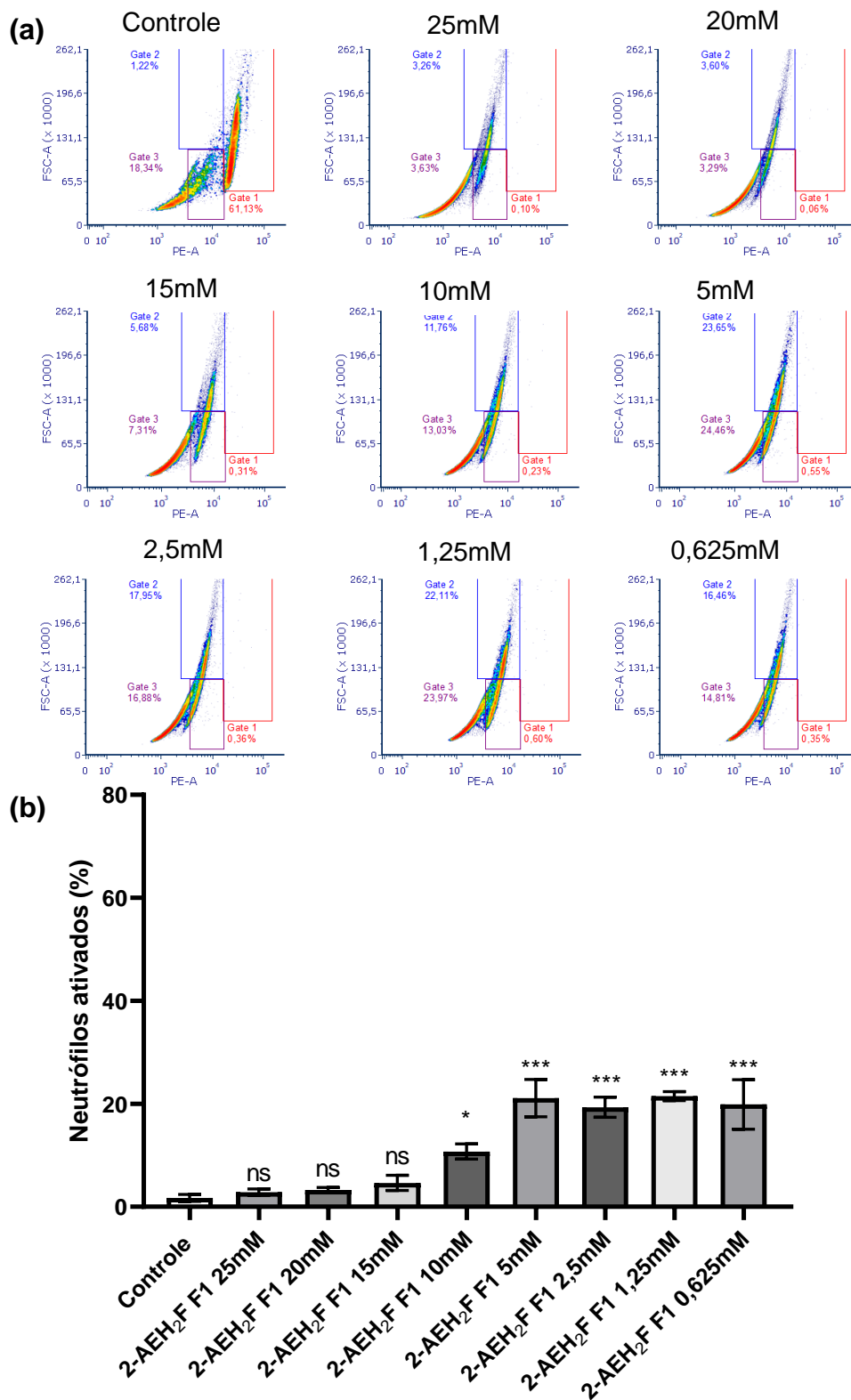
| <b>Amostras</b> | <b>Identificação</b> | <b>Idade</b> | <b>Sexo</b> | <b>Grupo Sanguíneo</b> |
|-----------------|----------------------|--------------|-------------|------------------------|
| Amostra 1       | DCR                  | 37           | M           | B+                     |
| Amostra 2       | MRH                  | 58           | F           | O+                     |
| Amostra 3       | SMC                  | 60           | M           | O+                     |
| Amostra 4       | MGA                  | 24           | F           | O+                     |
| Amostra 5       | TADO                 | 23           | M           | A-                     |
| Amostra 6       | RCBA                 | 70           | F           | A-                     |



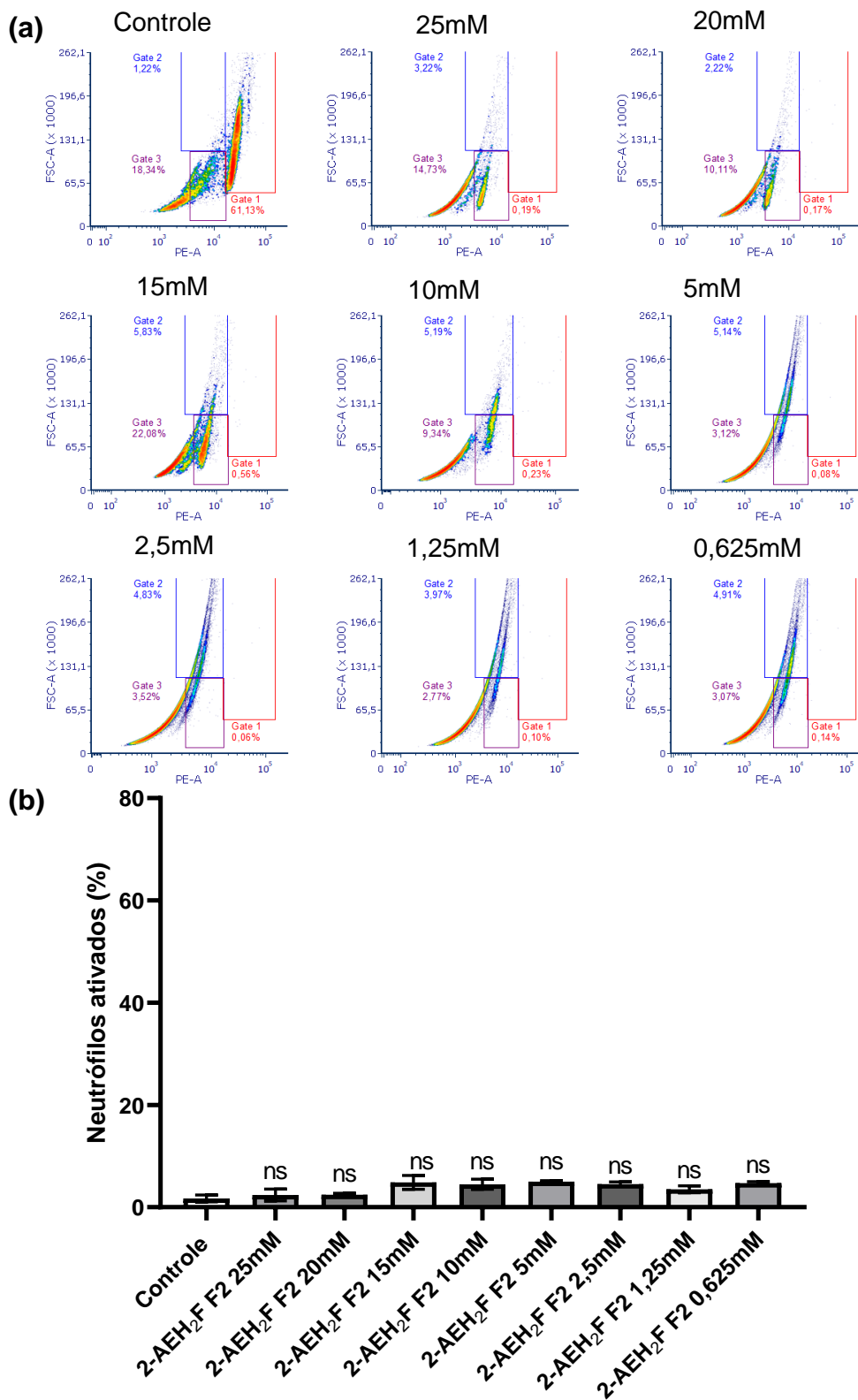
**Figura 59. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 1 (DCR), processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F1 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001. ns=não significativo.



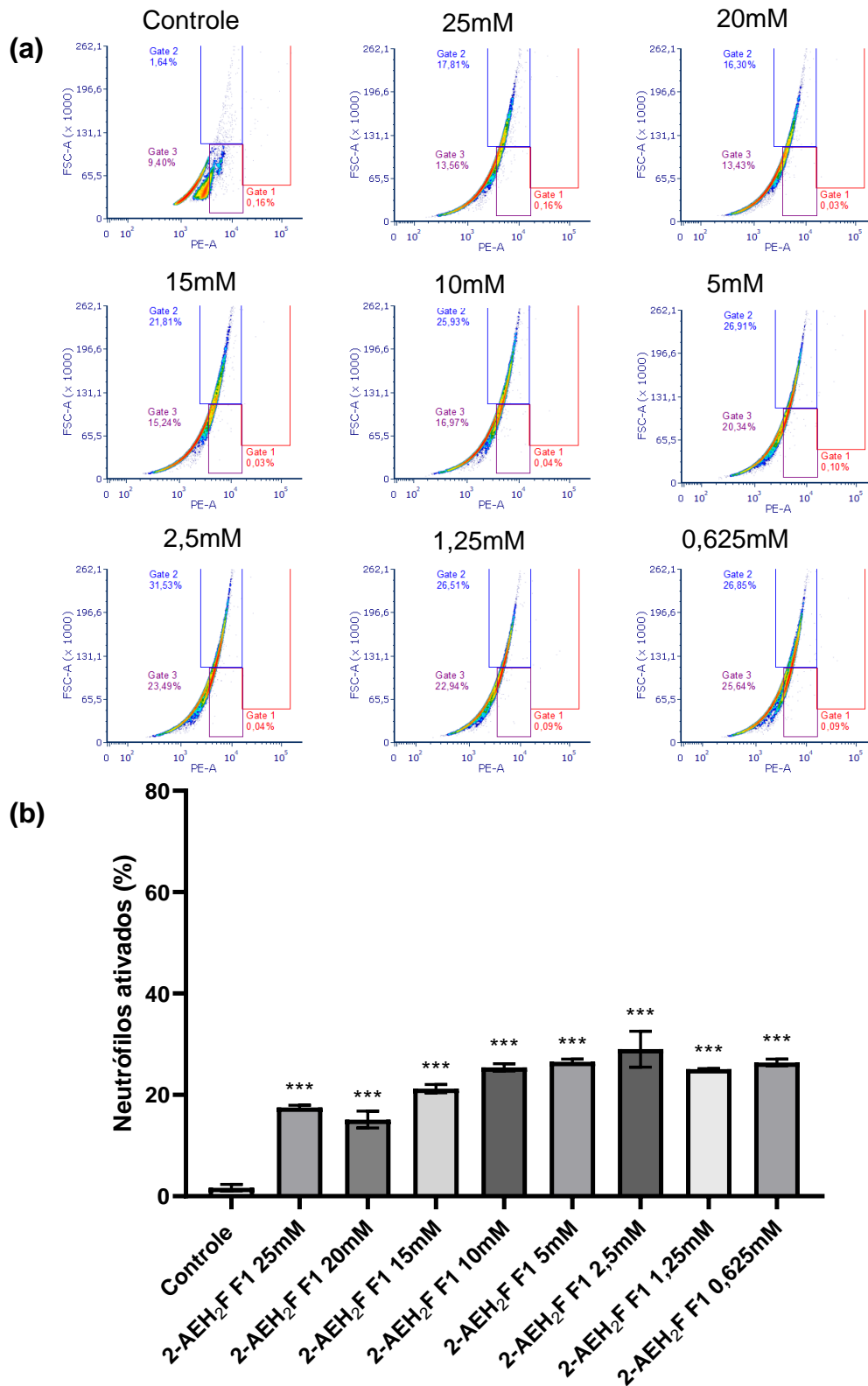
**Figura 60. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 1 (DCR), processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F2 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.



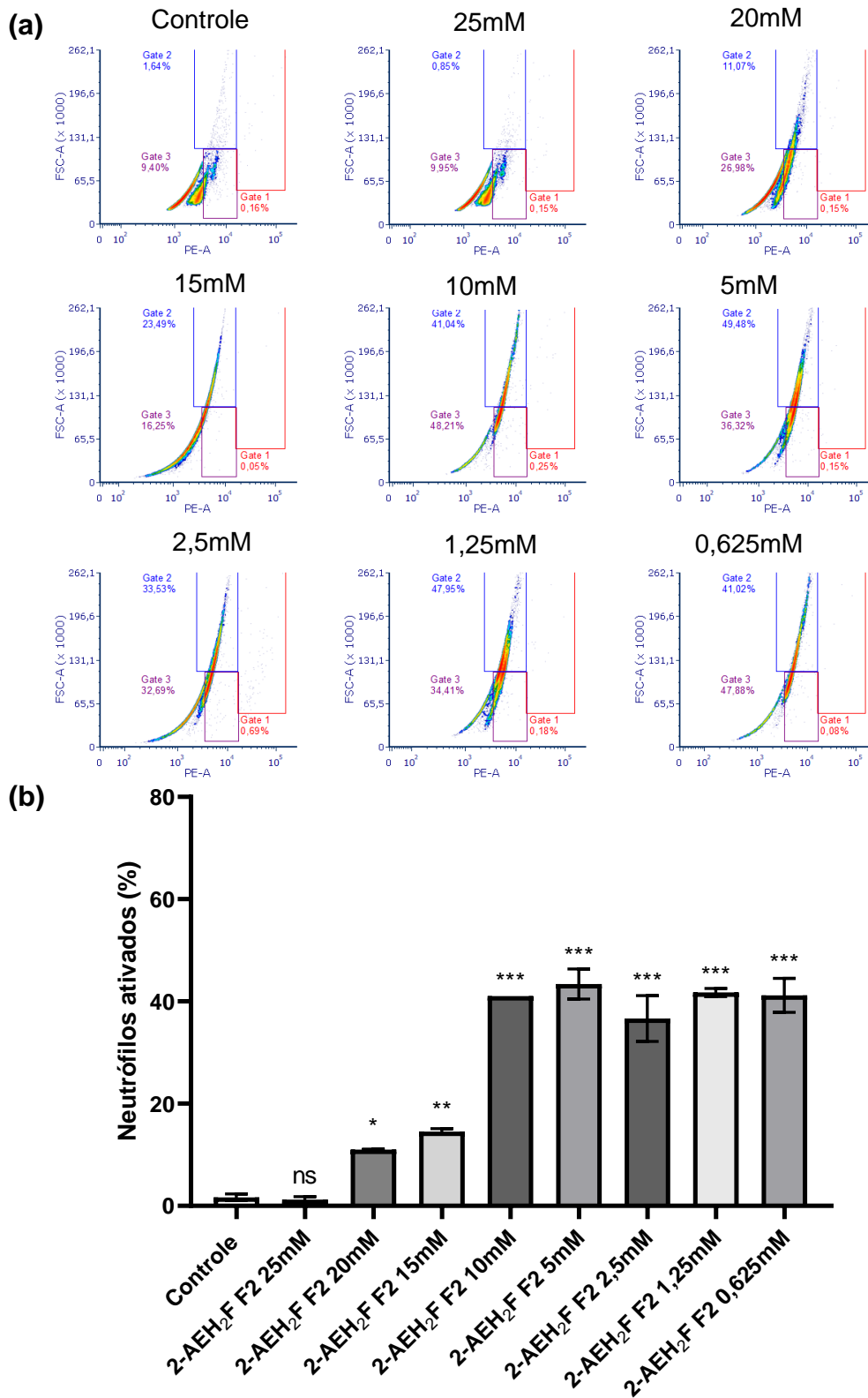
**Figura 61. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 2 (MRH), processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F1 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001. ns=não significativo.



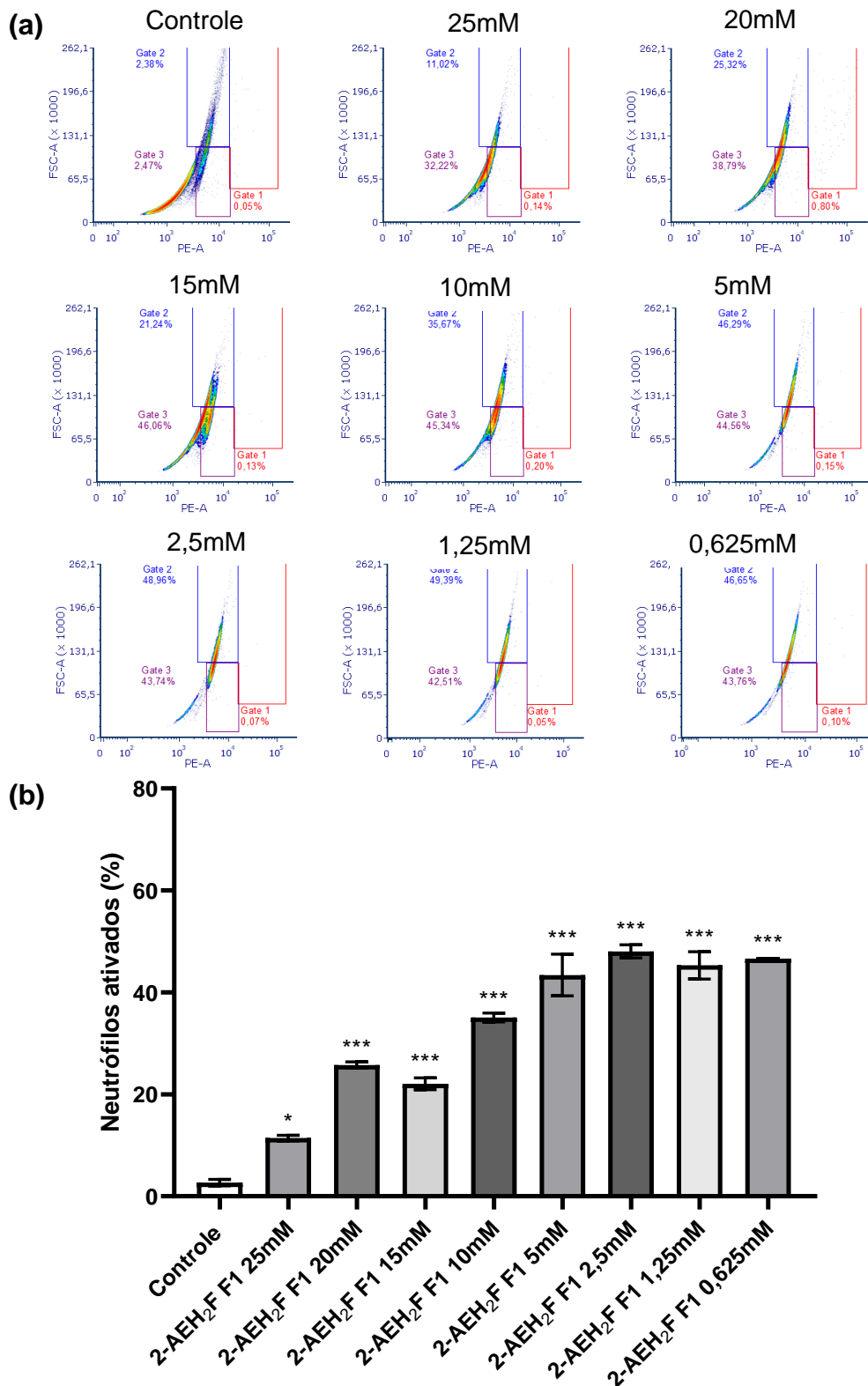
**Figura 62. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 2 (MRH), processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F2 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001. ns=não significativo.



**Figura 63. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 3 (SMC), processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F1 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001. ns=não significativo.

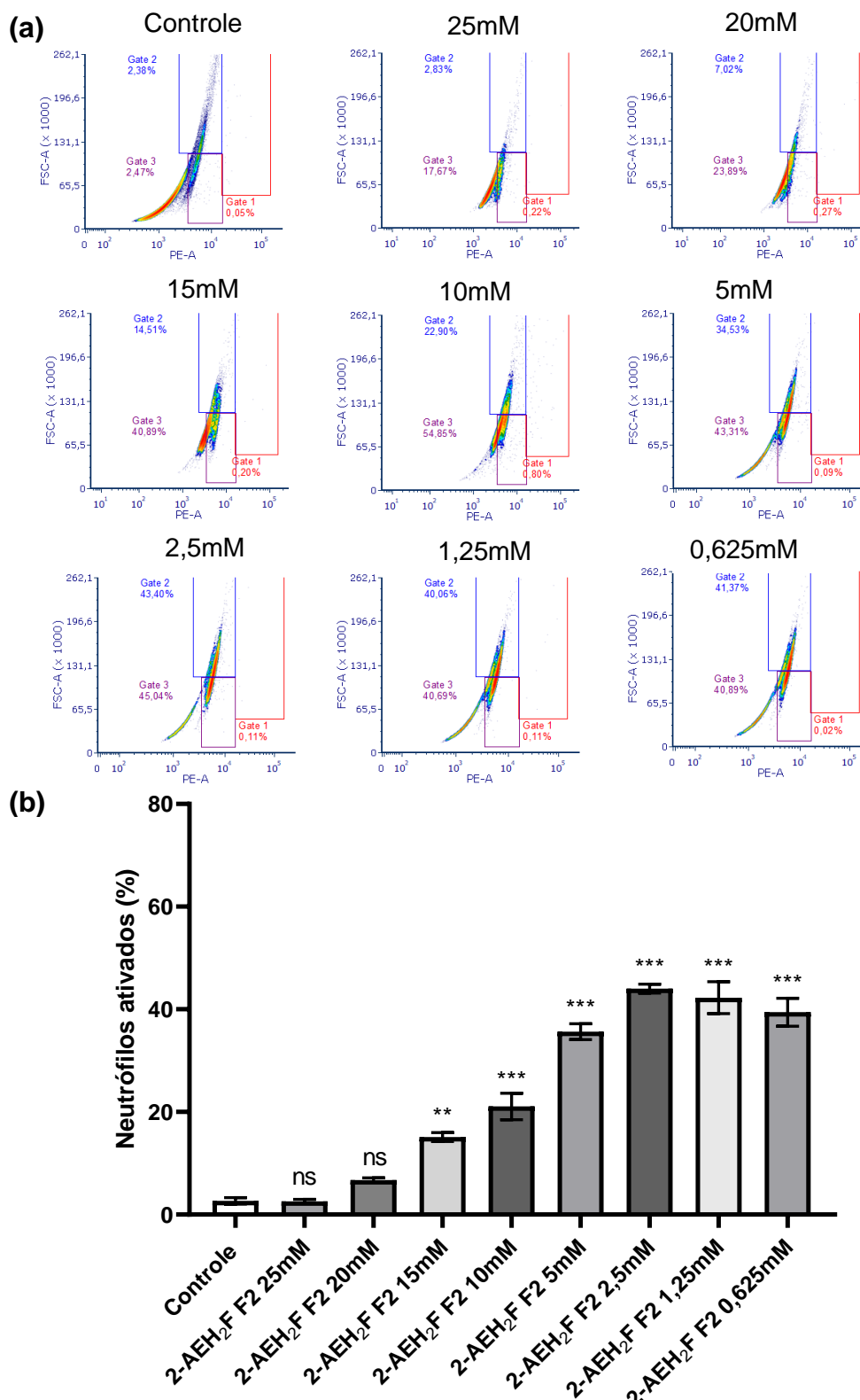


**Figura 64. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 3 (SMC), processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F2 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001. ns=não significativo.



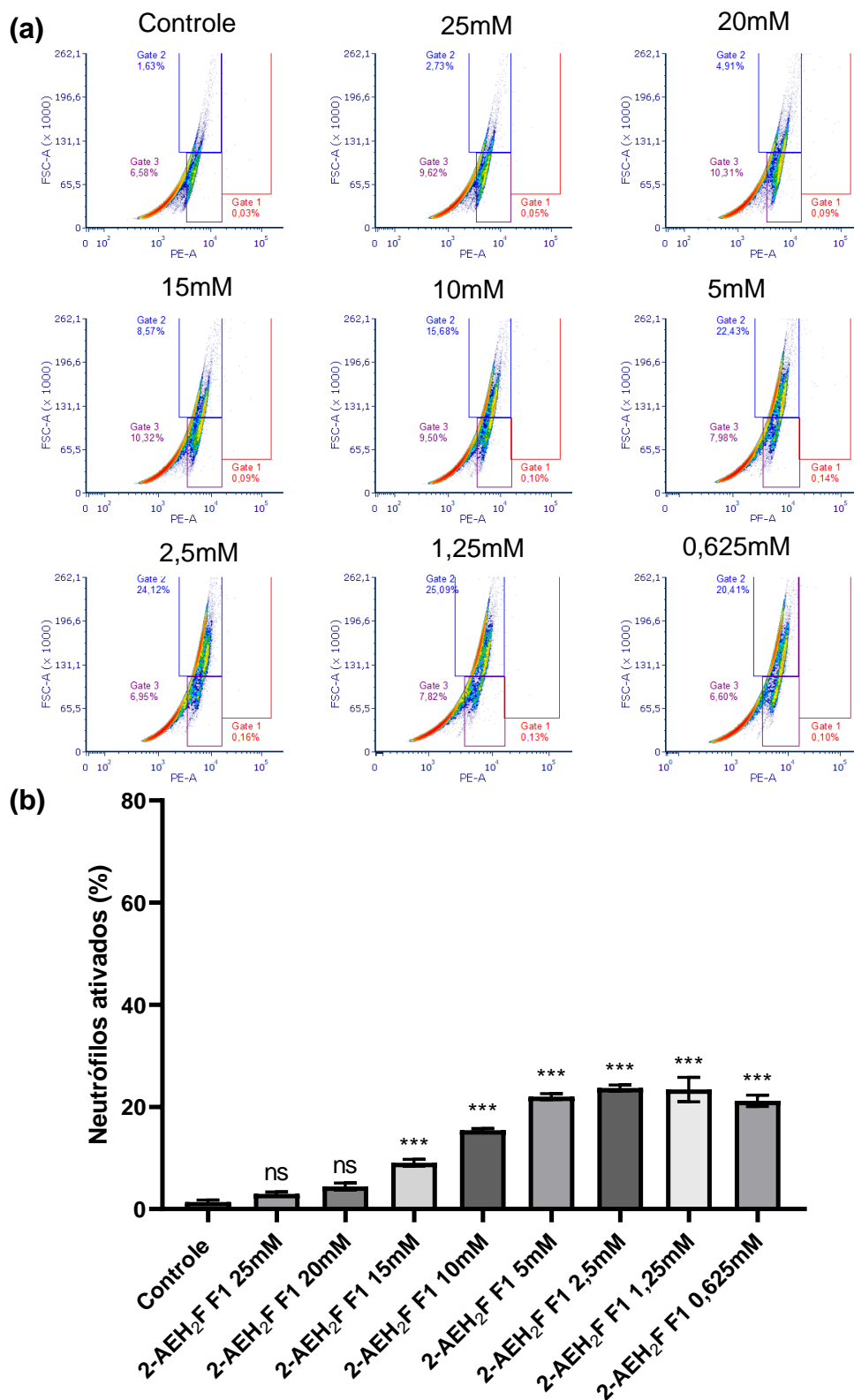
**Figura 65. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 4 (MGA), processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F1 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.



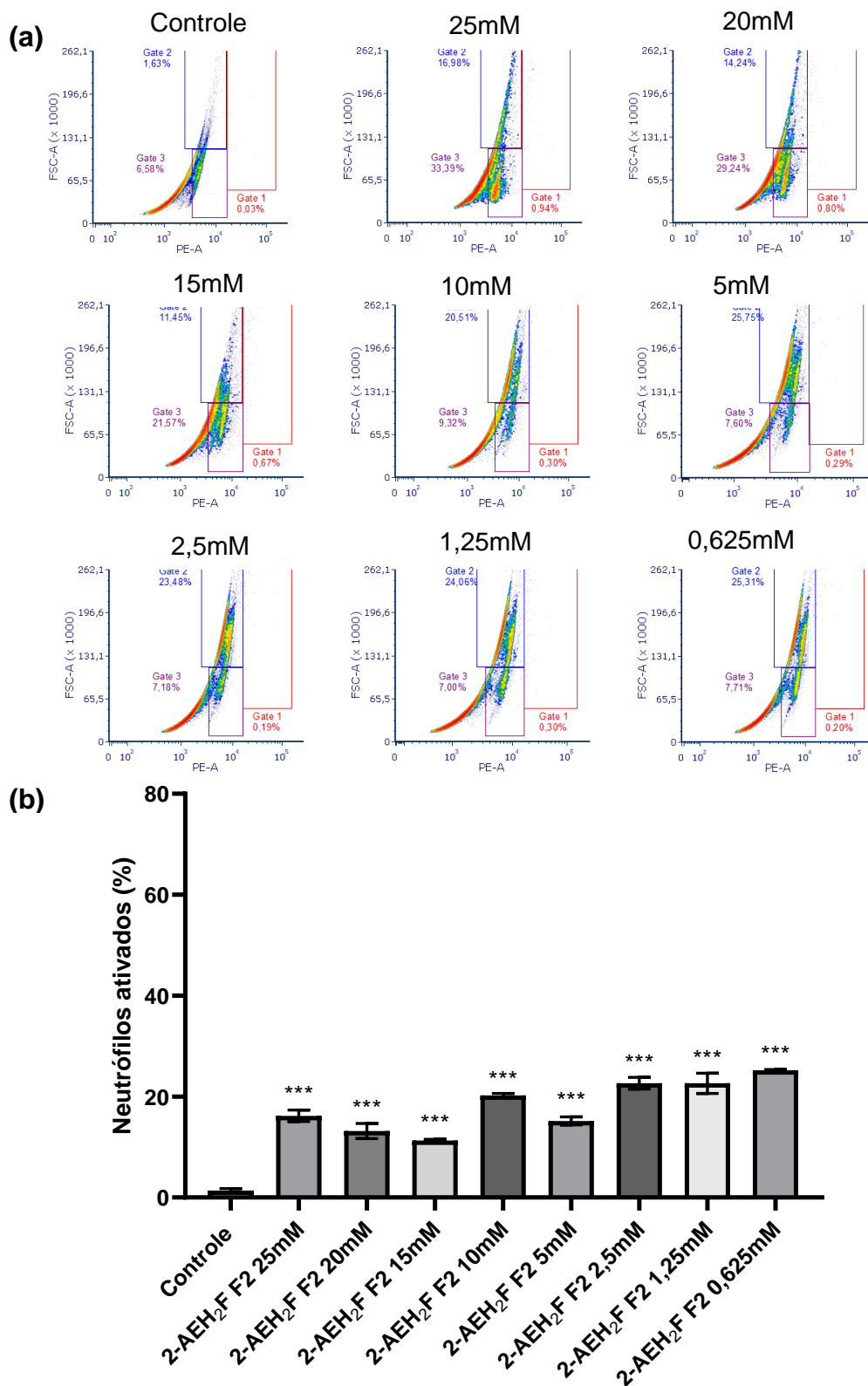


**Figura 66. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 4 (MGA), processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F2 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001. ns=não significativo.

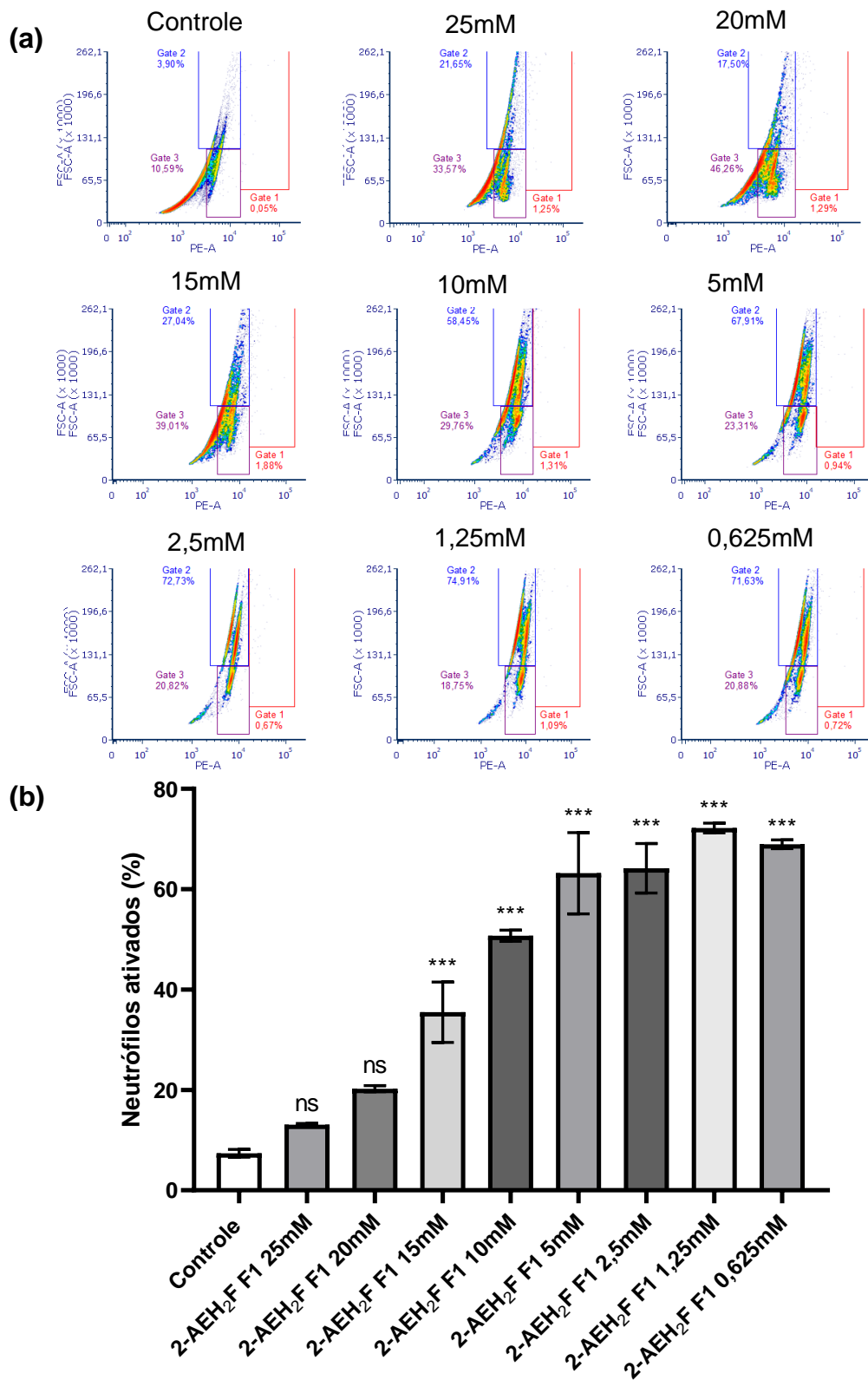
Quando tratado com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1, a amostra 5 (TADO) apresentou aumento da população de neutrófilos ativos das concentrações 0,625mM a 15mM, o aumento médio percentual foi de 93,8±4,3% (Figura 67). Para o tratamento com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 foi observado aumento dos leucócitos polimorfonucleares ativados em todas as concentrações testadas com alta efetividade, a média de aumento foi de 93,9±4,5% (Figura 68). A amostra 6 (RCBA), apresentou resultado semelhante as demais amostras, houve aumento dos neutrófilos ativados entre as concentrações 0,625mM e 15mM em 88,5±8,7% (Figura 69). O tratamento com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 promoveu aumento em todas as concentrações, entre 0,625mM e 10mM ou aumento percentual médio foi de 87,8±7,3%, já para as concentrações de 15mM a 25mM o aumento foi de 62,1±5,4% (Figura 70).



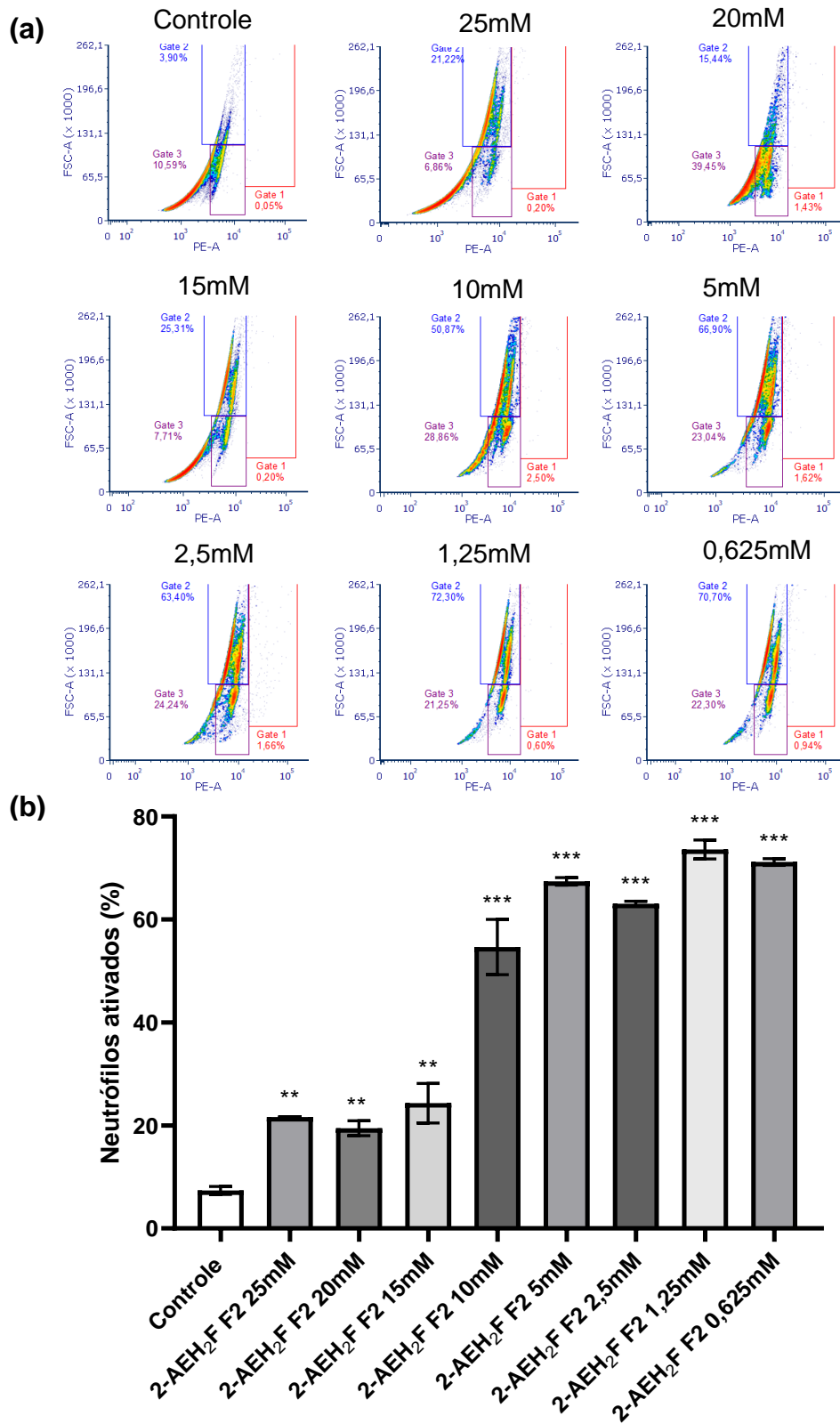
**Figura 67. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 5 (TADO), processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F1 no período de 3h. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001. ns=não significativo.



**Figura 68. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 5 (TADO), processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F2 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.



**Figura 69. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 6 (RCBA), processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F1 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.



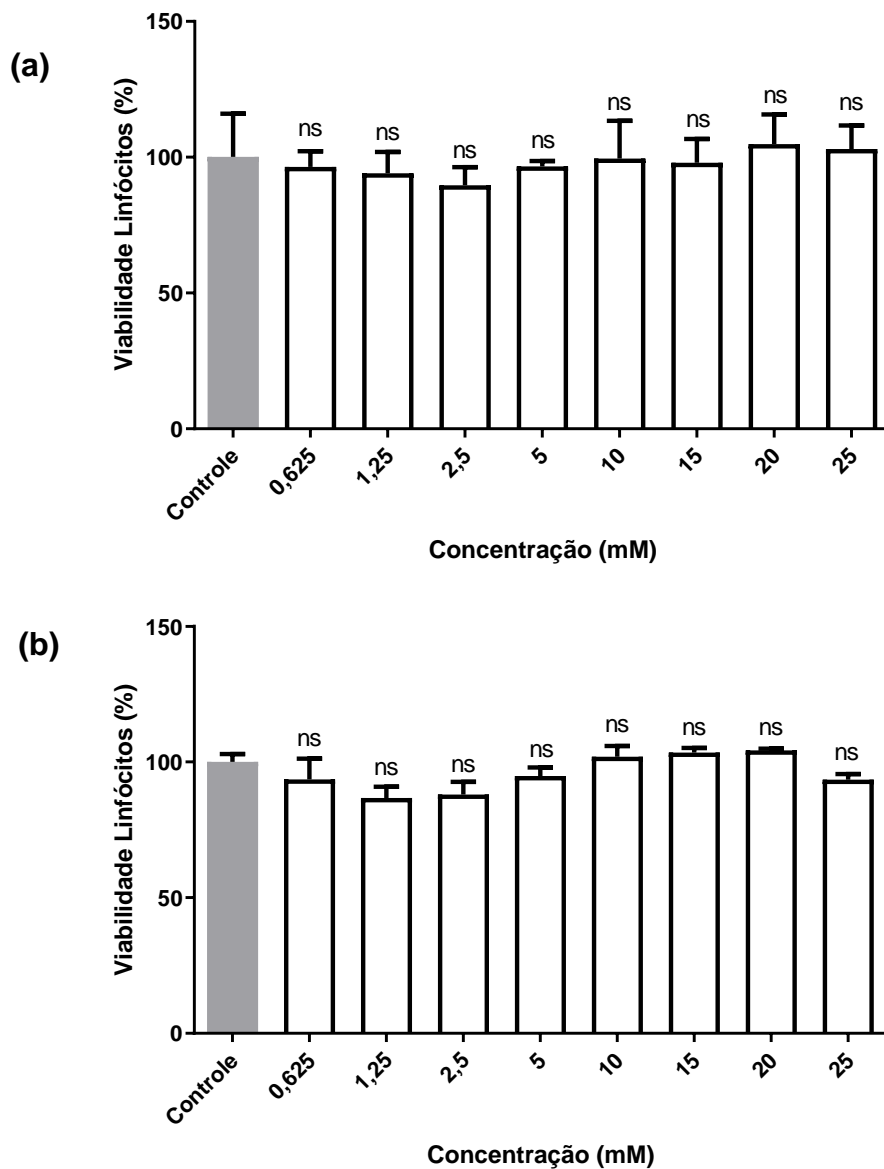
**Figura 70. Avaliação da ativação dos leucócitos polimorfonucleares, neutrófilo de sangue periférico.** Amostra 6 (RCBA), processada e tratada com diversas concentrações do 2-AEH<sub>2</sub>F F2 no período de 3h. **(a)** DensityPlots representativos da distribuição de acordo com a ativação dos neutrófilos. **(b)** Gráfico de barras mostrando a ativação dos neutrófilos expresso como média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

#### 4.11. Determinação da atividade do 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e 2-AEH<sub>2</sub>F F2 em leucócitos monomorfonucleares

A capacidade de induzir toxicidade para os linfócitos foi avaliada pelo método colorimétrico MTT. As células foram submetidas ao tratamento com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e 2-AEH<sub>2</sub>F F2 em diferentes concentrações por 24h. Não foi observado toxicidade ou aumento proliferativo para os linfócitos quando submetidos aos tratamentos anteriormente citados para a amostra 1 (DCR) (Figura 71 A-B). A amostrado 2 (MRH) quando tratada com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 apresentou aumento da população de neutrófilos nas maiores concentrações, de 10mM a 25mM, com aumento médio percentual de  $53,7 \pm 9,6\%$  (Figura 72 A). Quando tratada com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2, não foi observado alterações significativas (Figura 72 B).

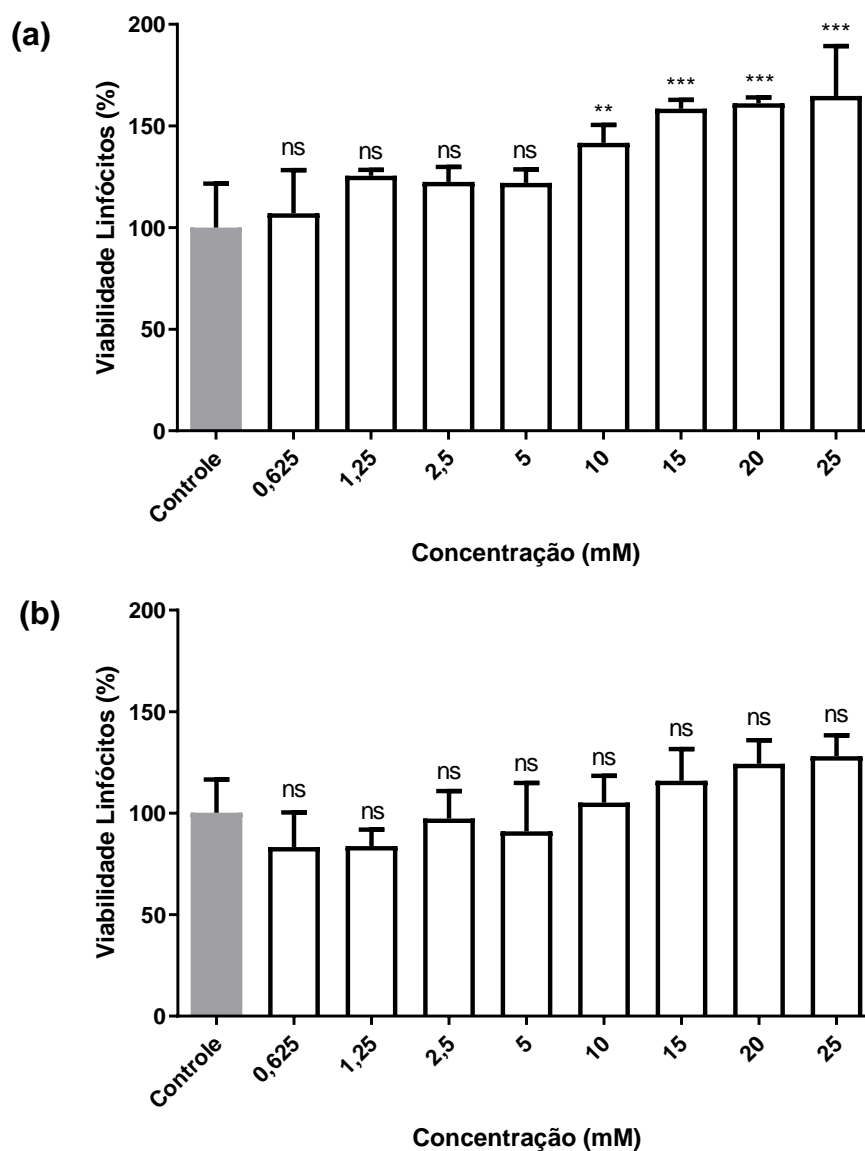
O 2-AEH<sub>2</sub>F F1 promoveu aumento proliferativo de linfócitos quando exposto a amostra 3 (SMC), sendo mais significativa para o intervalo de 10mM a 25mM, em  $28,3 \pm 6,8\%$  e de  $19,7 \pm 8,0\%$  para a concentração de 5mM (Figura 73 A). Não foi observado significância para o tratamento com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 (Figura 73 B). O tratamento com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 apresentou resultado diferente dos anteriores para a amostra 4 (MGA), foi observado efeito citotóxico para os tratamentos na concentração de 0,625mM a 2,5mM, com redução média da viabilidade em  $48,8 \pm 7,3\%$  e aumento proliferativo nas concentrações de 20mM ( $30,2 \pm 4,8\%$ ) e 25mM ( $36,1 \pm 2,4\%$ ) (Figura 74 A). O tratamento com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 não apresentou alteração proliferativa ou citotoxicidade (Figura 74 B).

A amostra 5 (TADO), quando tratada com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 não apresentou alteração significativa (Figura 75 A). Em contrapartida, quando tratada com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2, houve efeito citotóxico para as concentrações a partir de 5mM, com redução percentual média (5mM-25mM) de  $21,4 \pm 4,1\%$  (Figura 75 B). O tratamento com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 não apresentou nenhum efeito para amostra 6 (Figura 76 A). Já o tratamento com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2 se mostrou citotóxico em todas as concentrações, mas não foi possível obter valor de IC<sub>50%</sub>, na concentração mais alta de tratamento, 25mM houve redução de  $28,2 \pm 0,8\%$  de viabilidade (Figura 76 B).

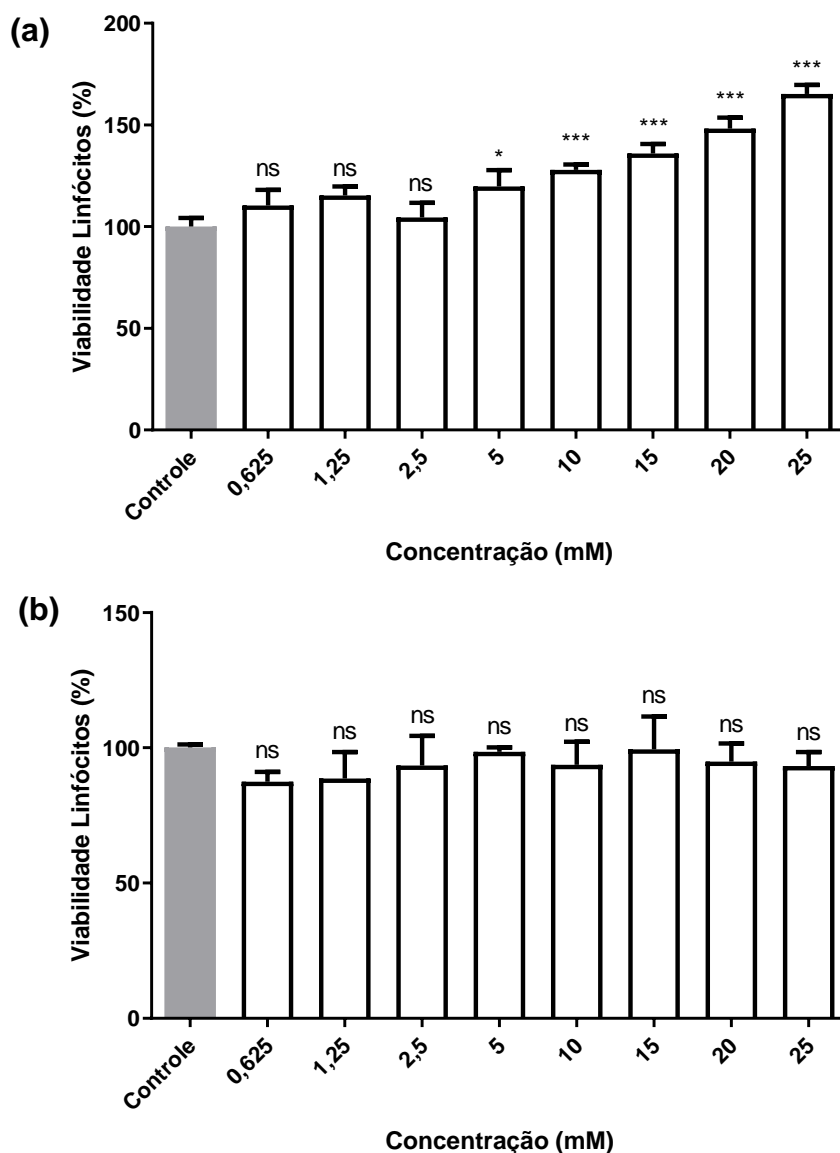


**Figura 71. Determinação da citotoxicidade em células mononucleares linfócitos pelo método colorimétrico MTT. Amostra 1 (DCR) tratadas em diferentes concentrações no período de 24h. (a) Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1. (b) Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F2.** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

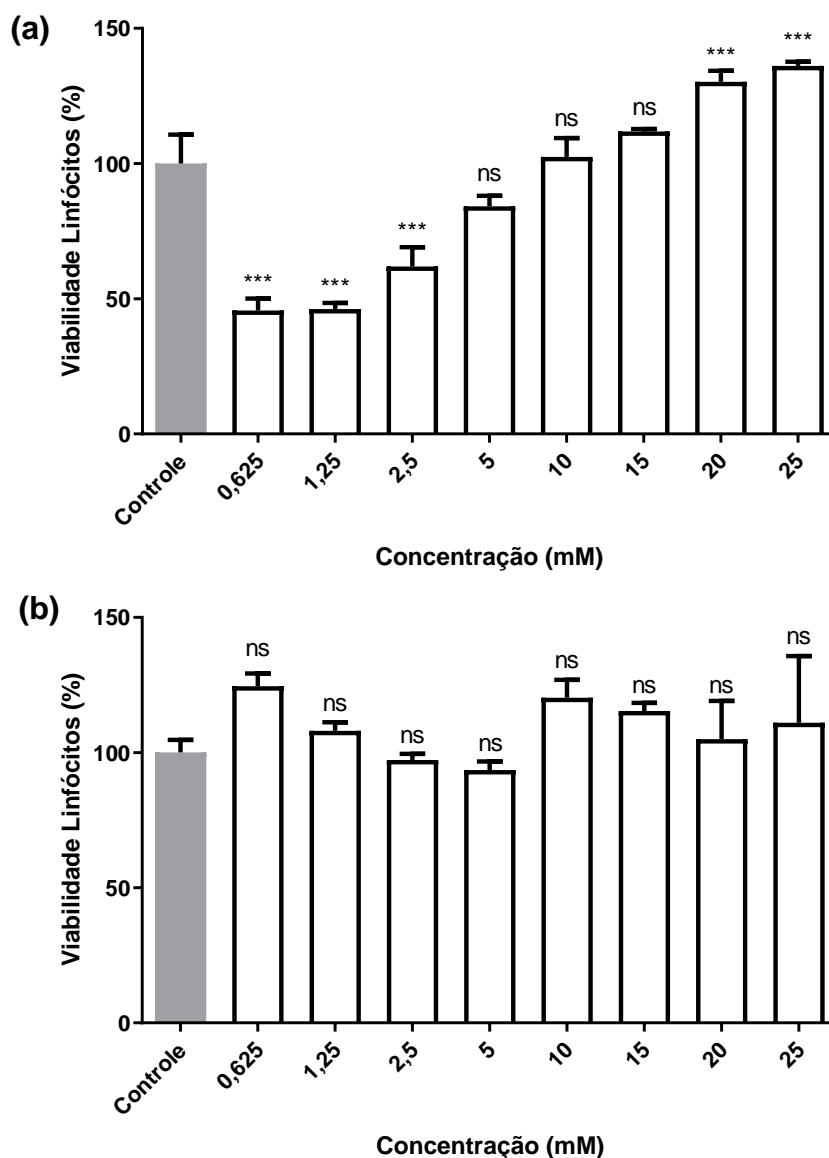




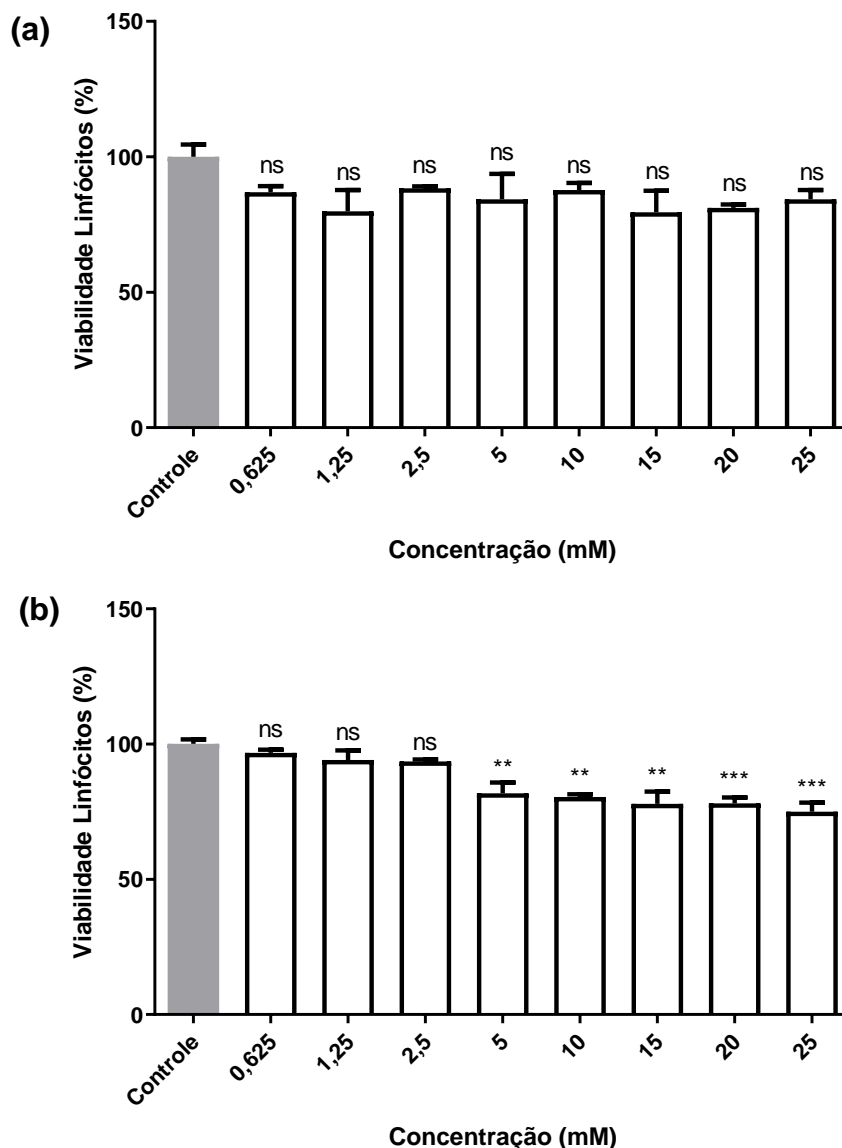
**Figura 72. Determinação da citotoxicidade em células mononucleares linfócitos pelo método colorimétrico MTT.** Amostra 2 (MRH) tratadas em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1. **(b)** Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F2. Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001. ns=não significativo.



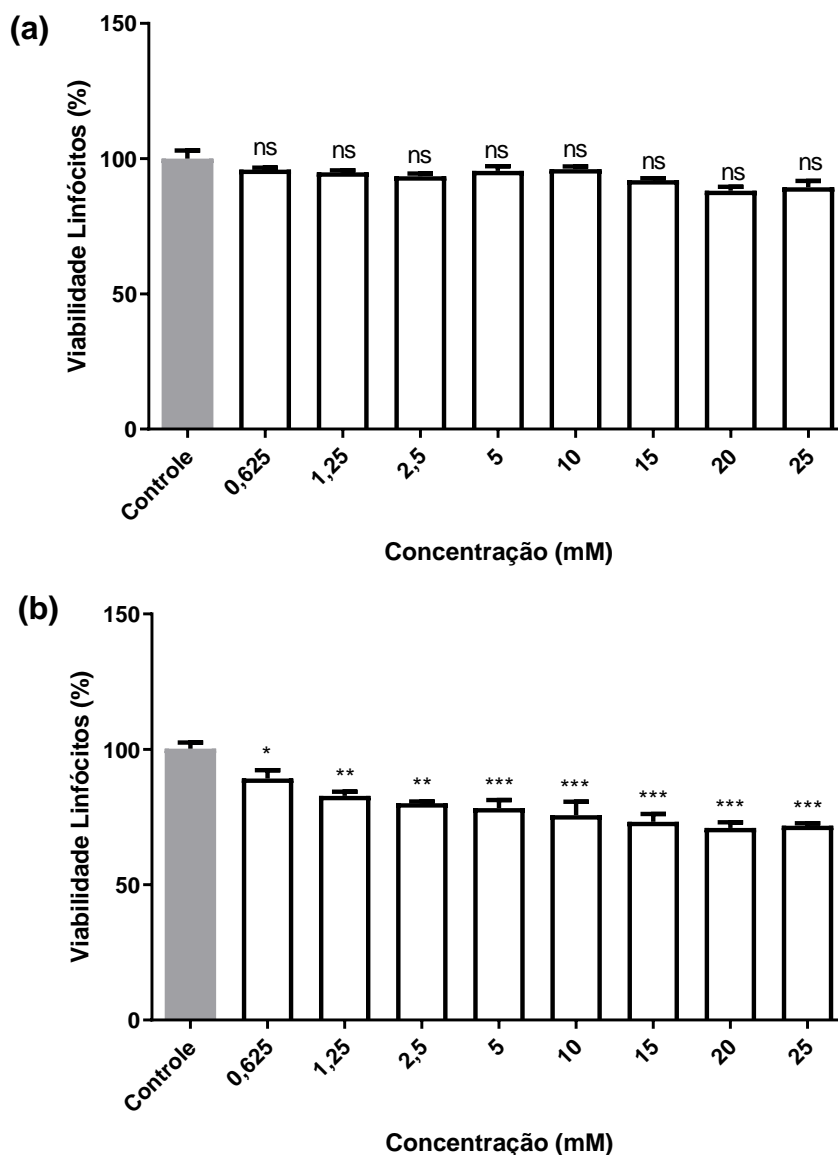
**Figura 73. Determinação da citotoxicidade em células mononucleares linfócitos pelo método colorimétrico MTT.** Amostra 3 (SMC) tratadas com diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1. **(b)** Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F2. Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experiências independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.



**Figura 74. Determinação da citotoxicidade em células mononucleares linfócitos pelo método colorimétrico MTT. Amostra 4 (MGA) tratadas em diferentes concentrações no período de 24h. (a) Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1. (b) Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F2.** Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experiências independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001. ns=não significativo.



**Figura 75. Determinação da citotoxicidade em células mononucleares linfócitos pelo método colorimétrico MTT.** Amostra 5 foram (TADO) tratadas em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1. **(b)** Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F2. Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experiências independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001. ns=não significativo.

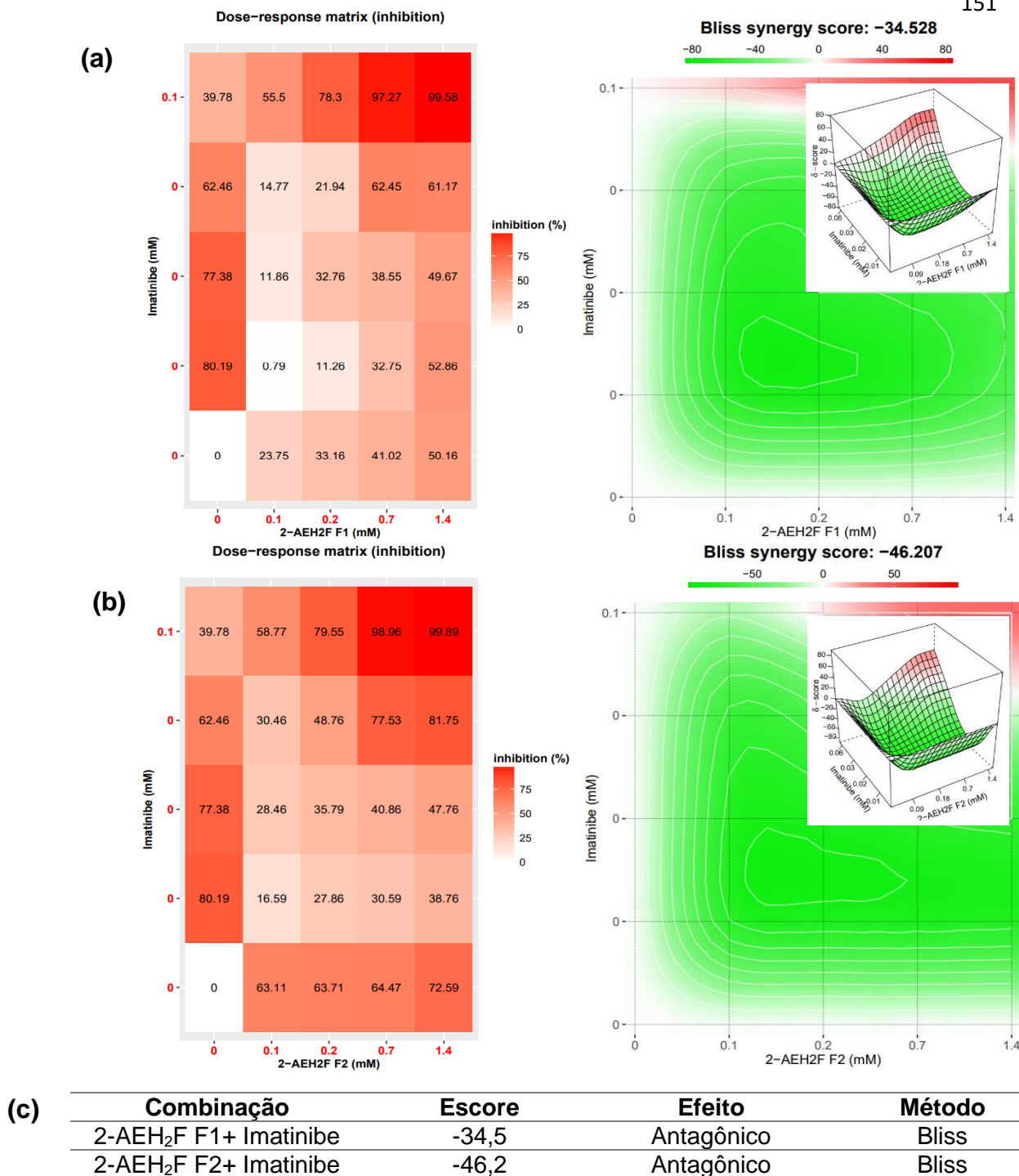


**Figura 76. Determinação da citotoxicidade em células mononucleares linfócitos pelo método colorimétrico MTT.** Amostra 6 (RCBA) tratadas em diferentes concentrações no período de 24h. **(a)** Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1. **(b)** Tratamento com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F2. Gráfico de coluna mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experiências independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001. ns=não significativo.

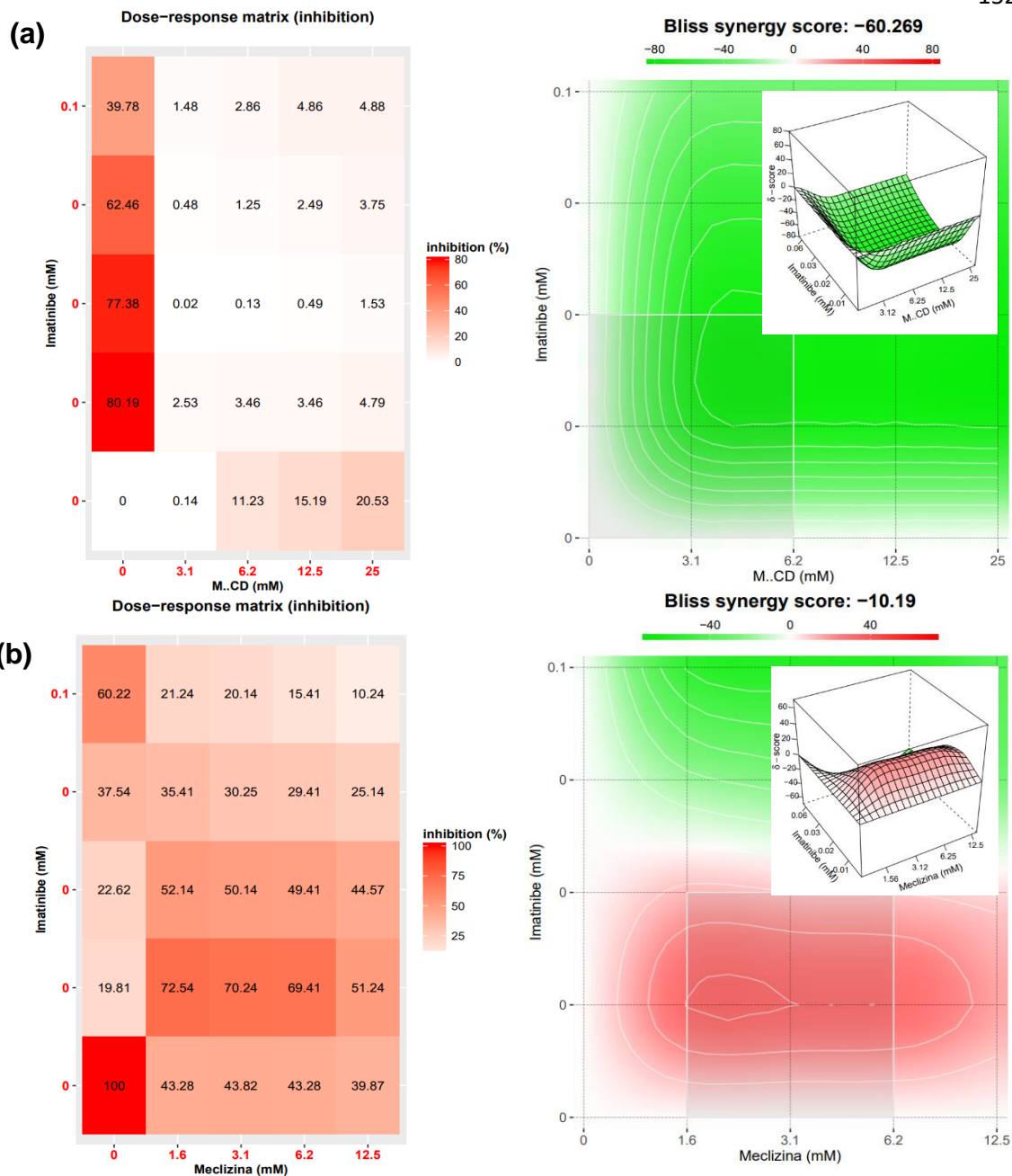
#### **4.12. Determinação das interações farmacológicas pelo software Synergy Findr.**

Estudo de interação farmacológica foi realizado pela combinação das matrizes entre os compostos 2-AEH<sub>2</sub>F F1, 2-AEH<sub>2</sub>F F2, Cloridrato de Meclizina, Metformina, Metil- $\beta$ -ciclodextrina e Sinvastatina, associados ao Mesilato de Imatinibe em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562.

Foi observado efeito antagônico para todos os tratamentos nas células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562. O composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1 quando associado com o Mesilato de Imatinibe apresentou escore de sinergia pelo método Bliss de -34,5, tendo assim efeito antagônico (Figura 77 A). Quando associado o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F2 com o Mesilato de Imatinibe, o escore obtido foi de -46,2 (Figura 77 B). A associação Metil- $\beta$ -ciclodextrina com Mesilato de Imatinibe o escore de sinergia mais alto de todos os tratamentos, -60,2 (Figura 78 A). O Cloridrato de Meclizina associado ao Mesilato de Imatinibe seu escore foi de -10,1 (Figura 78 B). A Metformina e a Sinvastatina quando associadas ao Mesilato de Imatinibe apresentaram escore de -52 e -40,8 respectivamente (Figura 79 A-B).



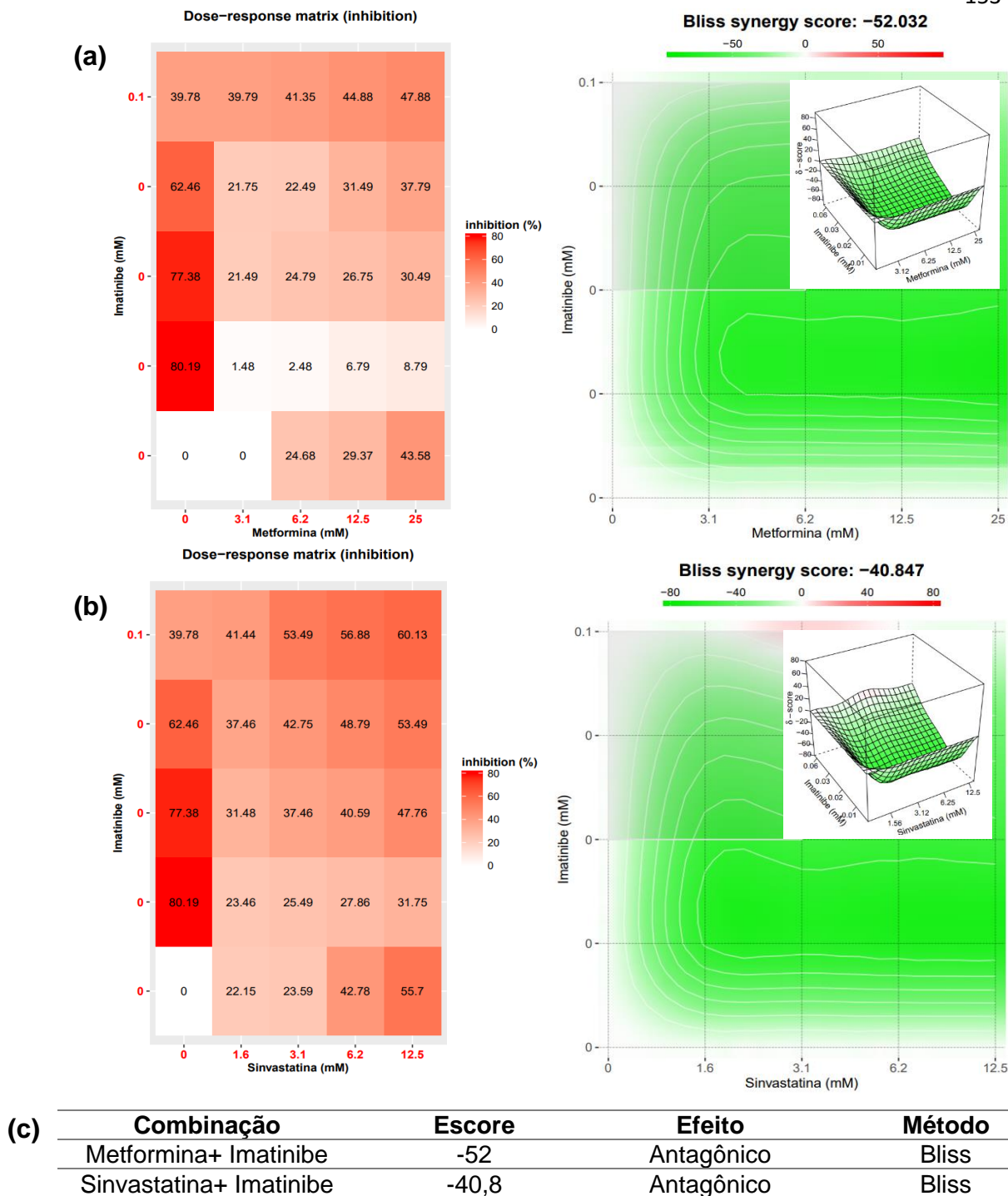
**Figura 77.** Determinação do efeito farmacológico aditivo, sinérgico ou antagônico em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562. **(a)** Associação 2-AEH<sub>2</sub>F F1+Mesilato de Imatinibe; **(b)** Associação 2-AEH<sub>2</sub>F F2+Mesilato de Imatinibe. O efeito antagônico é observado no gráfico com padrão de coloração entre o branco e o verde ( $\leq 0$ ), o efeito aditivo e o sinérgico são observados entre o branco e o vermelho ( $> 0$  e  $> 10$  sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **(c)** Tabelas mostrando a combinação de drogas e a pontuação de sinergia para essas combinações.



| (c) | Combinação           | Escore | Efeito     | Método |
|-----|----------------------|--------|------------|--------|
|     | MβCD+ Imatinibe      | -60,2  | Antagônico | Bliss  |
|     | Meclizina+ Imatinibe | -10,1  | Antagônico | Bliss  |

**Figura 78. Determinação do efeito farmacológico aditivo, sinérgico ou antagônico em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562. (a)** Associação Metil-β-Ciclodextrina+Mesilato de Imatinibe; **(b)** Associação Cloridrato de Meclizina+Mesilato de Imatinibe. O efeito antagônico é observado no gráfico com padrão de coloração entre o branco e o verde ( $\leq 0$ ), o efeito aditivo e o sinérgico são observados entre o branco e o vermelho ( $> 0$  e 10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **(c)** Tabelas mostrando a combinação de drogas e a pontuação de sinergia para essas combinações.





**Figura 79. Determinação do efeito farmacológico aditivo, sinérgico ou antagônico em células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562. (a)** Associação Metformina+Mesilato de Imatinibe; **(b)** Associação Sinvastatina+Mesilato de Imatinibe. O efeito antagônico é observado no gráfico com padrão de coloração entre o branco e o verde ( $\leq 0$ ), o efeito aditivo e o sinérgico são observados entre o branco e o vermelho ( $> 0$  e 10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **(c)** Tabelas mostrando a combinação de drogas e a pontuação de sinergia para essas combinações.

## 5. Discussão

---

---

Neste estudo, analisamos a capacidade de fármacos envolvidos no metabolismo energético e lipídico em potencializar os efeitos da terapia *in vitro* quando associado ao 2-aminoetil dihidrogeno fosfato (2-AEH<sub>2</sub>F 1 e 2-AEH<sub>2</sub>F F2) e ao Mesilato de Imatinibe em células tumorais leucemia mieloide crônica humana (K562). Após a associação destes fármacos ao 2-AEH<sub>2</sub>F, não foi observado potencialização dos efeitos *in vitro* da terapia, por outro lado, quando associados ao Mesilato de Imatinibe com metade dos valores de IC<sub>50%</sub> foram observados resultado significativos e com melhor resposta em menor concentração para fármacos como Cloridrato de Meclizina, e Sinvastatina. Houve modulação na expressão de proteínas envolvidas na morte e progressão celular, alterações nas populações de células distribuídas nas fases do ciclo celular, redução do potencial elétrico mitocondrial, alterações nas ultraestruturas celulares, como membrana carioteca, mitocôndria e formação de vacúolos intracelulares, observados nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, evidenciando a capacidade dos tratamentos em possivelmente modular as vias de morte celular regulada, com efeito protetivo ou não causando efeito nas células normais. As formulações 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e 2-AEH<sub>2</sub>F F2 foram obtidas por rotas de síntese diferentes e possuem grau de pureza distinto, a 2-AEH<sub>2</sub>F F1, apresenta carbonato de cálcio, enquanto a 2-AEH<sub>2</sub>F F2 está com grau de pureza mais alto.

A escolha do tratamento primário para pacientes com leucemia mieloide crônica diagnosticada na fase inicial ainda é muito difícil, mesmo levando em conta os avanços alcançados nos últimos anos. O transplante de células-tronco alogênicas ainda apresenta os melhores resultados, sendo limitado o número de pacientes elegíveis para esse tipo de procedimento <sup>79,80</sup>. Na maioria dos pacientes, o uso de Interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) promove um aumento na taxa de sobrevivência, mas apresenta uma toxicidade sistêmica <sup>81,82</sup>. Vários inibidores de tirosina quinase foram aprovados para o tratamento de LMC (imatinib, dasatinib, nilotinib e bosutinib), na terapia inicial mostrou remissão hematológica, mostrando sua capacidade de prolongar a vida <sup>83,84</sup>.

Compreender a atividade da tirosina quinase BCR-ABL para a transformação celular proporcionou grande avanço para o desenvolvimento de fármacos com especificidade e potencial terapêutico para a leucemia mieloide crônica. O Mesilato de Imatinibe é um inibidor seletivo de tirosina quinase BCR-

ABL1 e revolucionou a terapia medicamentosa da leucemia mieloide crônica <sup>83</sup>. Estudos pré-clínicos e clínicos foram muito promissores, superando as expectativas. As respostas em fase crônica são inéditas, com taxas de resposta citogenética completa (RMC) de mais de 40% em pacientes após falha de interferon (IFN) e mais de 80% em pacientes recém-diagnosticados, nível de eficácia que levou à aprovação regulatória em tempo recorde <sup>85</sup>.

Embora, a maioria das respostas sejam estáveis, a resistência ao tratamento após uma resposta inicial é comum em fases mais avançadas da doença <sup>86</sup>. Mutações no domínio de quinase do BCR-ABL que prejudicam a ligação do Mesilato de Imatinibe foram identificadas como a principal causa de resistência <sup>83</sup>. Pacientes com leucemia mieloide crônica que conseguem uma redução do mRNA BCR-ABL têm um risco muito baixo de progressão da doença <sup>87</sup>. No entanto, a doença residual geralmente permanece detectável por RT-PCR, indicando que a erradicação da doença pode representar um desafio significativo. Os mecanismos subjacentes à persistência de doenças residuais mínimas são desconhecidos <sup>88</sup>.

O desenvolvimento de novas terapêuticas é fundamental, principalmente quando se existe grande número de pacientes desenvolvendo ou apresentando resistência as terapêuticas convencionais, novos estudos e resultados apresentados nesse trabalho, estão buscando a associação de medicamentos já convencionalmente usados para controle de outras doenças, em associação a quimioterápicos como forma de sensibilização dessas células à terapia. Estudos com associação de paclitaxel ao cloridrato de Meclizina mostraram eficiência *in vitro* para redução da proliferação e indução de apoptose para células de câncer de pulmão (A549) <sup>89</sup>, resultado semelhante foi observado para células de câncer mama triplo negativo (MDA MB-231) <sup>90</sup>.

Alterações no metabolismo energético são uma marca importante das células tumorais, e direcionar o metabolismo energético dessas células é considerado como uma estratégia promissora para o tratamento do câncer <sup>91,92</sup>. As células de leucemia mieloide crônica resistentes que abrigam mutação BCR-ABL T315I apresentaram lenta proliferação celular associada à baixa regulação da via glicolítica e baixa produção ROS <sup>93</sup>. Essas observações sugerem que a ativação da tirosina quinase poderia impactar significativamente o metabolismo celular e afetar a sensibilidade medicamentosa nas células de leucemia. Como

tal, a modulação do metabolismo celular pode ser uma estratégia potencial para aumentar a sensibilidade à leucemia aos inibidores de tirosina quinase e superar a resistência às drogas.

Prost et al (2015) relataram que drogas anti-diabéticas tem um efeito terapêutico sobre as células de leucemia mieloide crônica<sup>94,95</sup>. Demonstrou que o tratamento combinado de pacientes quimiorresistentes, com Mesilato de Imatinibe mais pioglitazona induziu uma resposta eficiente para controle proliferativo. No presente trabalho, o cloridrato de Meclizina apresentou eficiência para redução de viabilidade das células de leucemia mieloide crônica humana (K562) *in vitro*, tanto isolada quanto associada ao Mesilato de Imatinibe, corroborando dados anteriormente descritos para drogas anti-diabéticas.

O efeito da meclizina no metabolismo energético é rápido, ocorrendo em poucos minutos, sendo mediado através de um efeito indireto sobre mitocôndrias<sup>96</sup>. A meclizina inibe o PCYT2 (gene que codifica uma enzima que catalisa a formação de fosfoetanolamina citidiltransferase (CDP-Etanolamina) a partir de trifosfato de citidina e fosfoetanolamina na via Kennedy da síntese fosfolipídica), aumentando significativamente os níveis de fosfoetanolamina celular. O aumento da fosfoetanolamina celular inibi a respiração mitocondrial<sup>95</sup>. Esse aumento acentuado durante a diferenciação celular precoce torna essas células particularmente suscetíveis à morte celular induzida por Meclizina causada pela inibição do PCYT2<sup>97</sup>. No entanto, é importante ressaltar que o mecanismo pelo qual os alquil fosfolipídeos alteram a taxa de respiração mitocondrial não foi totalmente caracterizado.

Foi observado que tanto o tratamento com o Cloridrato de Meclizina isolado, quanto associada ao Mesilato de Imatinibe, promoveu redução do potencial elétrico mitocondrial para a célula de leucemia mieloide crônica K562 e redução do índice proliferativo dessas células, mostrando um efeito positivo para terapêutica *in vitro*. Resultado semelhante foi encontrado para as células quando tratadas com o 2-aminoetil dihidrogeno fosfato, corroborando dados anteriormente citados.

O 2-aminoetil dihidrogeno fosfato é o monofosfoester mais abundante nas células, com papéis importantes nos processos celulares como turnover dos fosfolipídios, sendo um precursor na síntese de fosfolipídios de membrana<sup>43,98</sup>, ciclo celular<sup>99</sup>, autofagia<sup>100</sup>, e apoptose<sup>101</sup>. Na célula, pode ser produzida

através de três principais vias bioquímicas. Entre elas está a produção através da CDP-Etanolamina na via de Kennedy, via descarboxilamina mitocondrial (PS) (catalisada por fosfatidilserina descarboxilase) e acetilação de lisofosfatidiletanolamina (LysoPE) (catalisada pela LysoPE aciltransferase) <sup>102</sup>.

O 2-AEH<sub>2</sub>F apresenta ampla atividade antitumoral tanto *in vitro* quanto *in vivo*, induzindo citotoxicidade em diversas linhagens de células tumorais, independente do perfil de resistência a múltiplas drogas. Trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo demonstraram que o 2-AEH<sub>2</sub>F induziu toxicidade em adenocarcinoma de mama humano MCF-7 e redução do índice proliferativo <sup>48</sup>. Resultado semelhante foi observado para células de câncer de mama triplo negativo humano MDA MB-231, com modulação de proteínas envolvidas na morte celular e capacidade proliferativa <sup>47</sup>. Outro estudo demonstrou que o 2-AEH<sub>2</sub>F promoveu redução do potencial elétrico mitocondrial mediado por expressão a Bcl-2, sendo regulada pela redução da proteína MTCH2 ligada à progressão da leucemia mielóide e aumento das proteínas pró-apoptóticas Bad e Bax, dependentes do p53 <sup>49</sup>.

O 2-AEH<sub>2</sub>F também se mostrou eficiente para o tratamento *in vitro* de outras linhagens tumorais, como tumor ascítico de Ehrlich <sup>43</sup>; células melanoma murino e humano (B16-F10, Skmel-28, Mewo) <sup>45,46,103</sup> e células de hepatocarcinoma (Hepa1c1c7) <sup>104,105</sup>.

Além do metabolismo energético glicolítico, o metabolismo lipídico e a biossíntese do colesterol são de grande importância na funcionalidade da célula tumoral. A biossíntese de colesterol é regulada pela atividade do 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase (HMG-CoA). O colesterol e seus derivados são necessários em altas concentrações para células neoplásicas proliferarem, sintetizarem DNA e promoverem seu crescimento <sup>106</sup>. Sendo assim, foi observado que a inibição do HMG-CoA pode afetar a proliferação e a progressão do ciclo celular, sendo um alvo terapêutico de interesse para terapias adjuvantes.

As estatinas são um grupo de drogas amplamente utilizadas para reduzir o nível de colesterol plasmático por inibição do HMG-CoA. Além de seus efeitos sobre a taxa na síntese de colesterol, evidências crescentes de estudos sugerem que essas drogas apresentam efeitos adicionais, incluindo efeitos anti-

proliferativos, pró-apoptóticos e anti-metástases em vários tipos de células tumorais <sup>107-110</sup>. Também foi relatado que estatinas induzem a morte celular em várias linhagens celulares de leucemias humanas *in vitro* <sup>111-113</sup>. No entanto, o mecanismo exato da citotoxicidade induzida pela estatina não foi estabelecido, e dados recentes sugerem que nem todas as amostras de células de leucemia humana apresentam resposta citotóxica idêntica aos tratamentos.

Alguns trabalhos mostram que a Sinvastatina pode inibir a proliferação de células de leucemia humana *in vitro* e *in vivo*, e seus mecanismos podem estar envolvidos na regulação do ciclo celular <sup>106,114</sup>. Quinze genes foram regulados após tratamento com a Sinvastatina *in vitro* e *in vivo*, relacionados ao ciclo celular e diminuição da expressão do PCNA. Além disso, a sinvastatina exibiu redução do crescimento do tumor de xenoinxerto em camundongos nude com parada na fase G0/G1 do ciclo celular <sup>114</sup>. Resultados semelhantes foram observados no presente trabalho, onde a sinvastatina promoveu redução do índice proliferativo, potencial citotóxico e modulação de proteínas envolvidas nas vias de morte celular, tanto isolada, quanto associada ao Mesilato de Imatinibe.

Outro aspecto importante, são os efeitos colaterais sistêmicos das terapêuticas do câncer, dentre elas a leucopenia. A leucopenia pode ocorrer na administração de terapias intensivas, surgindo em aproximadamente 7% destas, estando associada ao aumento da mortalidade <sup>115,116</sup>. Pode ser resultado de uma redução qualquer um dos principais subtipos de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos ou basófilos), mas mais frequentemente neutrófilos e/ou linfócitos, que mais contribuem para a contagem total de leucócitos <sup>115</sup>.

Levando em consideração o tratamento com o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e com o 2-AEH<sub>2</sub>F F2, não foi observado efeito citotóxico *in vitro* para os linfócitos ou para os neutrófilos, pelo contrário, algumas das concentrações testadas, promoveu proliferação de linfócitos e uma ativação dos neutrófilos, demonstrando seu papel imunoprotetor.

Os linfócitos podem exercer grandes efeitos antitumorais, como demonstrado pelos resultados do transplante de células-tronco hematopoiéticas halogênicas para malignidades hematológicas, onde a doença do enxerto-versus-hospedeiro mediada por células T é inversamente associada à recidiva da doença, já a inibição de imunossupressão ou infusão de linfócitos doadores pode induzir recaídas <sup>117,118</sup>. Em relação aos neutrófilos, os altos números

circulando ou dentro de tumores, estão diretamente ligados ao desfecho clínico da doença, no câncer provavelmente possa ser explicado pela resposta inflamatória que é secundária a patologia, há, pelo menos em alguns casos, efeitos substanciais dos neutrófilos sobre o crescimento e a sobrevivência do câncer <sup>119</sup>.

No entanto, um dos principais problemas é que em muitos pacientes com câncer os anticorpos terapêuticos são dados em conjunto com a quimioterapia, induzindo neutropenia severa <sup>120</sup>. É importante entender a contribuição potencial dos neutrófilos à medida que as estratégias de tratamento estão mudando e novas terapêuticas estão surgindo.

Estudos vêm mostrando a eficiência de compostos como Cloridrato de Meclizina, Metformina e Sinvastatina associados a quimioterápicos, ou até mesmo em tratamentos adjuvantes. Avaliar a toxicidade e a capacidade de reduzir índice proliferativo para células é somente o ponto de partida para seleção de novo medicamentos, sendo essencial a identificação das vias de sinalização e a sua capacidade de modulação de proteínas associadas as vias de morte celular regulada, seja via intrínseca ou extrínseca, ferroptose, estresse do retículo, entre outros, ou até mesmo agir nas fases do ciclo celular.

Os tratamentos que apresentaram maior eficiência em modular as fases do ciclo celular foram o 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e a Sinvastatina, promovendo parada na fase S, 2-AEH<sub>2</sub>F F2 e o Cloridrato de Meclizina, promoveu parada na fase G2/M, para a Metformina em algumas concentrações quando isolado ou associado ao Mesilato de Imatinibe, é possível observada uma redução significativa da fase G0/G1. Sendo observado aumento da população de células com DNA fragmento.

Desde a elucidação dos mecanismos da divisão celular em células de mamíferos, proteínas que regulam o ciclo celular têm sido investigadas como alvos de drogas para terapia do câncer <sup>121</sup>. Estes incluem as quinases dependentes de ciclina (CDKs), que foram estabelecidas como reguladores da proliferação celular, e mais recentemente identificaram potenciais alvos terapêuticos.

As CDKs são frequentemente super expressas no câncer devido a vários eventos genéticos e epigenéticos que afetam suas vias regulatórias. O efeito geral é a perda da integridade do checkpoint, resultando em proliferação



descontrolada. Portanto, a inibição seletiva de CDKs pode limitar a progressão de uma célula tumoral através do ciclo celular e facilitar a indução de vias apoptóticas <sup>122</sup>. Sabe-se que a mutação BCR-ABL e alterações epigenéticas levam a uma atividade excessiva das CDKs na leucemia mieloide crônica <sup>123</sup>. Uma droga que apresentou efeito na proliferação de células tumorais, mediada por inibição de proteínas envolvidas nas fases do ciclo celular foi a Sinvastatina. Wang et al, (2013) sugerem que a inibição induzida pela sinvastatina estava associada à parada na fase G1, diminuição da proteína e expressão mRNA do marcador de proliferação ciclina D1, ciclina E, CDK 2 e aumento da expressão da proteína inibitória de CDKs, P21 <sup>124</sup>.

A translocação do gene BCR-ABL promove a ativação de várias vias que regulam o crescimento e a sobrevivência, sem afetar drasticamente a diferenciação celular, dentre essas vias destacam-se MAP-quinase,3 Akt/PI3K/mTOR4 e Jak/Stat5,6 vias que possibilitam a manutenção da cronificação desse crescimento celular, enquanto protege as células do processo apoptótico <sup>125-127</sup>. O supressor tumoral TP53 é frequentemente mutado em tumores sólidos, já para pacientes com leucemia mieloide crônica compreende em média de 20% dos casos, na maioria na fase blástica <sup>128,129</sup>. Também é relatado que a translocação promove regulação da tradução da HDM2 ubiquitina ligase E3, conseqüentemente afetando o nível da proteína p53 nos casos de leucemia mieloide crônica <sup>130</sup>.

A via da p53 regula importantes mecanismos de reparo a danos no DNA, regulação/checkpoints do ciclo celular, senescência e apoptose <sup>131</sup> Seu papel na apoptose é destacado por sua capacidade de regular positivamente a expressão de vários genes pró-apoptóticos como Bax, PUMA, Noxa, p53AIP1 e p53DINP1 <sup>132,133</sup>. Alguns trabalhos identificaram a realocização da proteína p53 no compartimento mitocondrial como um modo alternativo de ação apoptótica não transcricional direta de p53. A p53 mitocondrial é relatada por ativar proteínas pró-apoptóticas, deslocando-as de proteínas antiapoptóticas, como por exemplo as proteínas da família bcl-2, promovendo a liberação de citocromo c para desencadear a apoptose e a formação do complexo apoptossoma <sup>134-136</sup>.

O conjunto de resultados obtidos para modulação do supressor de tumor p53, demonstrou que os tratamentos com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1, 2-AEH<sub>2</sub>F F1, Sinvastatina, Mesilato de Imatinibe e todas as associações com o Mesilato de

Imatinibe, promoveram aumento do número de células expressando a proteína, evidenciado a capacidade antitumoral. Outras proteínas de importância foram moduladas, como as pro-apoptóticas Bax, Bad, caspase 3, com redução do número de células expressando a proteína antiapoptótica Bcl-2, consequentemente liberação de citocromo C e apoptose. Fotomicrografias eletrônicas obtidas de microscopia eletrônica de transmissão, evidenciam alterações ultraestruturais, como degradação da lâmina nuclear, degradação/alteração morfológica das mitocôndrias, com presença de vacúolos tanto mitocôndrias como citoplasmáticas.

Já foi evidenciado a capacidade de promover modulação na expressão de proteínas envolvidas na morte celular para o 2-AEH<sub>2</sub>F em várias linhagens tumorais. Conceição et al, (2021) sugere que o tratamento com o 2-AEH<sub>2</sub>F para células K-562 e K-562 Lucena (MDR+) induz efeito pró-apoptótico dependente de p53, com aumento de Bax, Bad, caspases 3, caspases 8 e liberação de citocromo C, ainda evidenciou um aumento na expressão das proteínas reguladoras p21 e p27 sugerindo potencial antiproliferativo com capacidade de controlar a progressão do ciclo celular <sup>49</sup>. Resultados semelhantes foram observados recentemente para câncer de mama triplo negativo humano e adenocarcinoma de mamário MCF-7 <sup>47,48</sup>.

Goldberg et al, (2003) demonstram em seu trabalho, que exposição de células de leucemia mieloide crônica, incluindo linhagem celulares estabelecidas e células recém-isoladas de pacientes, ao Mesilato de Imatinibe reduziu os níveis de proteína p53, e prejudicou severamente seu acúmulo em resposta aos danos no DNA, quando apresentando mutações em sua estrutura. Em contrapartida, em leucemia mieloide crônica, quando comparada a maioria dos tipos de câncer, a frequência de mutações p53 é baixa. Goldberg também evidencia que as células que expressam p53 tipo selvagem são mais resistentes ao tratamento com Mesilato de Imatinibe, mas moderadamente mais sensíveis aos danos do DNA, do que as células que não possuem p53 selvagem. Uma indução aprimorada de apoptose por Mesilato de Imatinibe e danos de DNA é observada em células com p53 tipo selvagem. Isso implica que o estado do p53 pode afetar a resposta das células a este tratamento <sup>137</sup>.

Estudos apontam que o tratamento com a Sinvastatina, resulta em um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células tumorais,

desencadeando significativamente morte celular por apoptose, caracterizado pelo aumento da condensação da cromatina, ativação do caspase-9 e 3, aumento da proteína pró-apoptóticas relacionadas a mitocôndrias pós-transcricionais a p53, Bax e diminuição da expressão de Bcl-2 e iASPP <sup>124</sup>.

O conjunto de dados apresentados neste estudo, corroboram a hipótese de ativação de morte celular por via intrínseca de apoptose para os tratamentos com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1, 2-AEH<sub>2</sub>F F2 e Sinvastatina. De uma forma sucinta, a via intrínseca é iniciada por quimioterapia, radiação e alterações intracelulares, como danos ao DNA, promovendo aumento da expressão de p53. Esses estímulos promovem alterações nas estruturas mitocondriais, regulando negativamente a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 permitindo a liberação de fatores apoptogênicos, incluindo citocromo c e SMAC/DIABLO para o citosol onde o citocromo c se liga ao adaptador Apaf-1 e pró-caspase-9 para formar um apoptosomo, levando à ativação do caspase-9. O caspase-9 ativado serve como uma caspase iniciadora para ativar caspases executoras 3, 6 e 7, que executam morte celular <sup>138</sup>.

O receptor TRAIL-DR4 também foi avaliado no presente trabalho. O receptor de morte TRAIL é um indutor de morte pertencem à superfamília fator de necrose tumoral (TNF), que inclui os receptores Fas/APO1, TNFR e TRAIL <sup>139</sup>. Após a união de ligantes a esses receptores, a via extrínseca é desencadeada. O receptor ativado recruta a proteína adaptadora, como FADD e a molécula pró-caspase-8 para formar um complexo de sinalização indutor de morte (DISC) <sup>140</sup>. O recrutamento da pro-caspase-8 para o DISC ativa caspase-8, resultando na ativação de caspases efetoras 3, 6 e 7, e indução de apoptose <sup>139,141</sup>. Pode haver crosstalk entre as duas vias de morte (intrínseca e extrínseca) através da clivagem t-Bid mediada por caspase-8 e subsequente translocação para a mitocôndria para iniciar a via intrínseca de apoptose <sup>142</sup>.

Os tratamentos com Cloridrato de Meclizina e Metformina, promoveram aumento significativo do receptor TRAIL-DR4, não alterando a expressão de marcadores envolvidos na via intrínseca da apoptose, como p53, Bax, Bcl-2, levando a considerar que essas drogas promovem citotoxicidade e redução do índice proliferativo pela via extrínseca, mediada por receptores de morte celular. O Mesilato de Imatinibe e todas as suas associações promoveram modulações para todos esses marcadores, tanto nas proteínas envolvidas na morte celular

por via intrínseca, quanto no aumento de células expressando receptores de morte TRAIL-DR4, corroborando o crosstalk que pode ocorrer decorrente da clivagem de Bid mediada por caspase 8.

So-Jung et. al, (2009), demonstraram que o tratamento de células de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562 com Mesilato de Imatinibe resultou na ativação da via de morte mediada por receptor TRAIL, incluindo ativação caspase 8, crosstalk de bid, liberação citocromo c e ativação caspase 3. Esses resultados foram acompanhados pela regulação de c-FLIP, um regulador antiapoptótico, fator de resistência que suprime o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Fas-L, e TRAIL, bem como apoptose desencadeada por agentes de quimioterapia em células tumorais <sup>143,144</sup>. Não foram encontrados dados para ação do Cloridrato de Meclizina, em promover ativação ou regulação de receptores de morte TRAIL

O estudo de Nazim et. al, (2016) evidenciaram que a metformina promoveu regulação do c-FLIP, potencializando a morte de células tumorais induzidas por TRAIL através da ativação do fluxo de autofagia em células tumorais de pulmão TRAIL-resistentes, sugerindo que a metformina pode ser uma estratégia terapêutica eficiente quando associada a quimioterapia <sup>145</sup>. Strekalova et. al, (2017), observaram que a metformina sensibilizou diversas células de câncer de mama triplo negativo para agonistas receptores TRAIL. A metformina aumentou seletivamente a sensibilidade das células epiteliais de mama transformadas, com ativação de caspase 8 induzida por receptor TRAIL, ativando via de apoptose, apresentando pouco efeito citotóxico para as células epiteliais não transformadas da mama. Esses efeitos da metformina foram acompanhados pela redução significativa dos níveis da proteína XIAP, regulador negativo da apoptose induzida pelo TRAIL. A metformina também potencializou os efeitos antitumorais do TRAIL em modelo câncer de mama triplo negativo murino metastático <sup>146</sup>.

Estudos adicionais deverão ser conduzidos, a fim de elucidar os mecanismos de ação diretamente envolvidos no efeito apoptótico do Cloridrato de Meclizina, Metformina e das associações com o Mesilato de Imatinibe. Estudos *in vivo* são necessários para avaliar os efeitos sistêmicos de todos esses tratamentos. Contudo, os dados apresentados sugerem, o envolvimento da via intrínseca da apoptose para os tratamentos com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1, 2-

AEH<sub>2</sub>F F2 e Sinvastatina, bem como ativação da via extrínseca mediada por TRAIL-DR4 para os tratamentos com Cloridrato de Meclizina, e ativação de ambas as vias para o tratamento com o Mesilato de Imatinibe e suas associações.

## 6. Conclusões

---

---

Foram avaliados nesse estudo dois compostos sintéticos do monofosfoester 2-AEH<sub>2</sub>F (2-AEH<sub>2</sub>F F1 e o 2-AEH<sub>2</sub>F F2) tanto isolados quanto em associação com drogas que potencializam efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos em linhagem de leucemia mieloide crônica humana da linhagem K562, não sendo observadas diferenças significativas entre elas na resposta de citotoxicidade para as células tumorais.

- Os tratamentos isolados com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1, 2-AEH<sub>2</sub>F F2, Cloridrato de Meclizina, Metformina, Sinvastatina e Mesilato de Imatinibe, promoveram citotoxicidade na linhagem tumoral de leucemia mieloide crônica K562;
- As drogas associadas aos compostos 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e 2-AEH<sub>2</sub>F F2 nas menores concentrações, não apresentaram eficiência na indução de citotoxicidade, porém, em contrapartida, as associações com o Mesilato de Imatinibe foram capazes de induzir efeitos citotóxicos nas menores concentrações;
- Os tratamentos com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e a Sinvastatina promoveram parada na fase S do ciclo celular, enquanto o tratamento com 2-AEH<sub>2</sub>F F2 promoveu para na fase G2/M do ciclo celular. O Cloridrato de Meclizina, foi capaz de reduzir a população células na fase G0/G1 do ciclo celular.
- As associações apresentaram resultados semelhantes aos compostos isolados com maior significância. Houve aumento de DNA fragmentado para os tratamentos em combinação com o Mesilato de Imatinibe;
- Houve redução significativa do potencial elétrico mitocondrial e redução do índice proliferativo na linhagem tumoral de leucemia mieloide crônica K562 para os tratamentos com o composto 2-AEH<sub>2</sub>F F1, 2-AEH<sub>2</sub>F F2, Cloridrato de Meclizina, Metformina, Sinvastatina e Mesilato de Imatinibe isolados e em associação;
- Os tratamentos com os compostos 2-AEH<sub>2</sub>F F1 e 2-AEH<sub>2</sub>F F2 em leucócitos polimorfonucleares não apresentaram toxicidade e foram capazes de induzir sua ativação.

- Os resultados obtidos para os tratamentos com 2-AEH<sub>2</sub>F F1, 2-AEH<sub>2</sub>F F2 e Sinvastatina, sugerem modulação na via intrínseca da apoptose promovendo: diminuição da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, aumento de p53, Bax e caspase 3 fosforilada e liberação do citocromo c;
- Houve aumento na expressão do receptor de morte TRAIL-DR4 para o tratamento com o Cloridrato de Meclizina e Metformina, sugerindo ativação de via extrínseca de morte celular;
- As associações farmacológicas, modularam a expressão das proteínas envolvidas na via intrínseca da apoptose, sugerindo ativação das duas vias de morte, intrínseca e extrínseca, possivelmente pelo crosstalk de Bid, uma vez que ocorreu aumento de células expressando p53, caspase 3 e liberação de citocromo c.



## 7. Referências

---

---

1. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31-46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
5. INCA. *Estimativa 2020: Incidência de Câncer No Brasil.*; 2019.
6. Chopra M, Bohlander SK. The cell of origin and the leukemia stem cell in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2019;58(12):850-858. doi:10.1002/gcc.22805
7. Eaves CJ. Review Series Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. Published online 2015. doi:10.1182/blood-2014
8. Zylbersztejn F, Flores-Violante M, Voeltzel T, Nicolini FE, Lefort S, Maguer-Satta V. The BMP pathway: A unique tool to decode the origin and progression of leukemia. *Exp Hematol.* 2018;61:36-44. doi:10.1016/j.exphem.2018.02.005
9. Carbone A. Classification of Tumors of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Discovering Diseases—Defining Their Features. *Hemato.* 2020;1(1):7-9. doi:10.3390/bloods1010004
10. Schepers K, Campbell TB, Passegué E. Normal and leukemic stem cell niches: Insights and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell.* 2015;16(3):254-267. doi:10.1016/j.stem.2015.02.014
11. Rosenbauer F, Tenen DG. Transcription factors in myeloid development: Balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(2):105-117. doi:10.1038/nri2024
12. Reinisch A, Chan SM, Thomas D, Majeti R. Biology and clinical relevance of acute myeloid leukemia stem cells. *Semin Hematol.* 2015;52(3):150-164. doi:10.1053/j.seminhematol.2015.03.008
13. Panuciak K, Margas M, Makowska K, Lejman M. Insights into modern therapeutic approaches in pediatric acute leukemias. *Cells.* 2022;11(1). doi:10.3390/cells11010139
14. Faderl S, Kantarjian Elihuuesteyyeditors H. *Acute Leukemias Second Edition.*; 2021. <http://www.springer.com/series/5416>
15. de Novellis D, Cacace F, Caprioli V, Wierda WG, Mahadeo KM, Tambaro FP. The tki era in chronic leukemias. *Pharmaceutics.* 2021;13(12). doi:10.3390/pharmaceutics13122201

16. Minciacchi VR, Kumar R, Krause DS. Chronic myeloid leukemia: A model disease of the past, present and future. *Cells*. 2021;10(1):1-23. doi:10.3390/cells10010117
17. Nowell PC, Hungerford DA. *Chromosome Studies on Normal and Leukemic Human Leukocytes 1.*; 1960. doi:10.1093/jnci/25.1.85
18. Apperley JF. Chronic myeloid leukaemia. In: *The Lancet*. Vol 385. Lancet Publishing Group; 2015:1447-1459. doi:10.1016/S0140-6736(13)62120-0
19. Radivoyevitch T, Weaver D, Hobbs B, et al. Do persons with chronic myeloid leukaemia have normal or near normal survival? *Leukemia*. 2020;34(2):333-335. doi:10.1038/s41375-019-0699-y
20. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol*. 2020;95(6):691-709. doi:10.1002/ajh.25792
21. Kang ZJ, Liu YF, Xu LZ, et al. The philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer*. 2016;35(1). doi:10.1186/s40880-016-0108-0
22. Foà R, Chiaretti S. Philadelphia Chromosome–Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2022;386(25):2399-2411. doi:10.1056/nejmra2113347
23. Özgür Yurttaş N, Eşkazan AE. Novel therapeutic approaches in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2020;91. doi:10.1016/j.leukres.2020.106337
24. Kaleem B, Shahab S, Ahmed N, Shamsi TS. Chronic myeloid leukemia - Prognostic value of mutations. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015;16(17):7415-7423. doi:10.7314/APJCP.2015.16.17.7415
25. Eşkazan AE. Evolving treatment strategies in CML – moving from early and deep molecular responses to TKI discontinuation and treatment-free remission: is there a need for longer-term trial outcomes? *Br J Clin Pharmacol*. 2018;84(8):1635-1638. doi:10.1111/bcp.13637
26. Warburg O. *SCIENCE Injuring of Respiration On the Origin of Cancer Cells*. Vol 123.; 1956. <https://www.science.org>
27. Otto Warburg B, Wind F, Negelein N. *THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY.*; 1931.
28. Potter M, Newport E, Morten KJ. The Warburg effect: 80 years on. *Biochem Soc Trans*. 2016;44(5):1499-1505. doi:10.1042/BST20160094
29. Pedersen PL. *Tumor Mitochondria and the Bioenergetics of Cancer Cells*. Vol 22. Karger; 1978.
30. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(10):685-698. doi:10.1038/nrc3365
31. Liu T, Liu W hong, Zhao J sheng, Meng F zheng, Wang H. Lutein protects against  $\beta$ -amyloid peptide-induced oxidative stress in cerebrovascular endothelial cells through modulation of Nrf-2 and NF-kb. *Cell Biol Toxicol*. 2017;33(1):57-67. doi:10.1007/s10565-016-9360-y

32. Zhou X, Kannisto K, Curbo S, et al. Thymidine Kinase 2 Deficiency-Induced mtDNA Depletion in Mouse Liver Leads to Defect  $\beta$ -Oxidation. *PLoS One*. 2013;8(3). doi:10.1371/journal.pone.0058843
33. Moen MD, Mckeage K, Plosker GL, et al. *ADIS DRUG EVALUATION Imatinib A Review of Its Use in Chronic Myeloid Leukaemia*. Vol 67.; 2007.
34. Hochhaus A, Saglio G, Hughes TP, et al. Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENESTnd trial. *Leukemia*. 2016;30(5):1044-1054. doi:10.1038/leu.2016.5
35. Carroll M, Ohno-Jones S, Tamura S, et al. *CGP 57148, a Tyrosine Kinase Inhibitor, Inhibits the Growth of Cells Expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR Fusion Proteins.*; 1997. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/90/12/4947/1412450/4947.pdf>
36. Zhou L, Sun X, Huang Z, et al. Imatinib Ameliorated Retinal Neovascularization by Suppressing PDGFR- $\alpha$  and PDGFR- $\beta$ . *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;48(1):263-273. doi:10.1159/000491726
37. Raimondi C, Fantin A, Ruhrberg C. Imatinib may be ABL to improve anti-angiogenic therapy. *Mol Cell Oncol*. 2015;2(1). doi:10.4161/23723548.2014.968034
38. Buchdunger E, O'reilly T, Wood J. *Pharmacology of Imatinib (STI571)*. Vol 38.; 2002. [www.ejconline.com](http://www.ejconline.com)
39. J. Topaly, W. J. Zeller, S. Fruehauf. *Review COMBINATION THERAPY WITH IMATINIB MESYLATE (STI571): SYNOPSIS OF IN VITRO STUDIES.*; 2022.
40. Carlo B Gambacorti-Passerini, Rosalind H Gunby, Rocco Piazza, Annamaria Galiotta, Roberta Rostagno, Leonardo Scapozza. Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. *Lancet Oncol*. 2003;4:75-85.
41. Eyster KM. Staying Current The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Adv Physiol Educ*. 2007;31:5-16. doi:10.1152/advan
42. Ellison DW, Beal MF, Martin JB, Beal MF. *Phosphoethanolamine and Ethanolamine Are Decreased in Alzheimer's Disease and Huntington's Disease*. Vol 417.; 1987.
43. Ferreira AK. *Alquil Fosfatado Sintético Precursor Dos Fosfolípidios de Membrana Celular Com Potencial Efeito Antitumoral e Apoptótico Em Modelos de Tumores Experimentais.*; 2013.
44. Olivia Gonçalves de Almeida Leitão da Cunha, Lucas Campos de Sá Rodrigues, Daniel da Conceição Rabelo, et al. Clinical Oncology Translational Study Phase-1 with Antitumor Phosphorylethanolamine (2-AEH2P) in Dogs with Neoplasms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2021;9(5). doi:10.17265/2328-2150/2021.05.001

45. Maria AA, da Silva LGL, Correia CC, Ruiz GRG. Antiproliferative effect of the Jararhagin toxin on B16F10 murine melanoma. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14(1). doi:10.1186/1472-6882-14-446
46. Ferreira AK;, Meneguelo R;, Neto SC;, Chierice GO;, Maria DA. *Synthetic Phosphoethanolamine Induces Apoptosis Through Caspase-3 Pathway by Decreasing Expression Of Bax/Bad Protein and Changes Cell Cycle in Melanoma*. Vol 3.; 2011. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1064212>
47. de Sousa Cabral LG, Hesse H, Freire KA, et al. The BR2 peptide associated with 2-aminoethyl dihydrogen phosphate is a formulation with antiproliferative potential for a triple-negative breast cancer model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;153:113398. doi:10.1016/j.biopha.2022.113398
48. Manuela Garcia Laveli da Silva, Laertty Garcia de Sousa Cabral, Monique Gonçalves Alves, et al. 2-aminoethyl Dihydrogen Phosphate as a Modulator of Proliferative and Apoptotic Effects in Breast Cancer Cell Lines. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2021;9(3). doi:10.17265/2328-2150/2021.03.001
49. Conceição TO, Cabral LGS, Laveli-Silva MG, et al. New potential antiproliferative monophosphoester 2-aminoethyl dihydrogen phosphate in K-562 and K-562 MDR+ leukemia cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2021;142. doi:10.1016/j.biopha.2021.112054
50. Gohil VM, Zhu L, Baker CD, et al. Meclozine inhibits mitochondrial respiration through direct targeting of cytosolic phosphoethanolamine metabolism. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(49):35489-35499. doi:10.1074/jbc.M113.489237
51. Oishi R, Shishido S, Yamori M, Saeki K. *Comparison of the Effects of Eleven Histamine Hi-Receptor Antagonists on Monoamine Turnover in the Mouse Brain*. Vol 349.; 1994.
52. Kaile´n BK, Mottet I. *Delivery Outcome after the Use of Meclozine in Early Pregnancy*.; 2002.
53. di Masi A, Marinis E de, Ascenzi P, Marino M. Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. *Mol Aspects Med*. 2009;30(5):297-343. doi:10.1016/j.mam.2009.04.002
54. Yan J, Chen B, Lu J, Xie W. Deciphering the roles of the constitutive androstane receptor in energy metabolism. *Acta Pharmacol Sin*. 2015;36(1):62-70. doi:10.1038/aps.2014.102
55. Carazo A, Dusek J, Holas O, et al. Teriflunomide is an indirect human constitutive androstane receptor (CAR) activator interacting with epidermal growth factor (EGF) signaling. *Front Pharmacol*. 2018;9(OCT). doi:10.3389/fphar.2018.00993
56. Gohil VM, Sheth SA, Nilsson R, et al. Nutrient-sensitized screening for drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis. *Nat Biotechnol*. 2010;28(3):249-255. doi:10.1038/nbt.1606

57. Wang L, Li S, Tang P, Yan J, Xu K, Li H. Characterization and evaluation of synthetic riluzole with  $\beta$ -cyclodextrin and 2,6-di-O-methyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. *Carbohydr Polym*. 2015;129:9-16. doi:10.1016/j.carbpol.2015.04.046
58. Rudrangi SRS, Bhomia R, Trivedi V, et al. Influence of the preparation method on the physicochemical properties of indomethacin and methyl- $\beta$ -cyclodextrin complexes. *Int J Pharm*. 2015;479(2):381-390. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.01.010
59. Garofalo T, Giammarioli AM, Misasi R, et al. Lipid microdomains contribute to apoptosis-associated modifications of mitochondria in T cells. *Cell Death Differ*. 2005;12(11):1378-1389. doi:10.1038/sj.cdd.4401672
60. Mahammad S, Parmryd I. Cholesterol depletion using methyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Methods Mol Biol*. 2015;1232:91-102. doi:10.1007/978-1-4939-1752-5\_8
61. Martínez-Abundis E, Reynoso-Von Drateln C, Hernández-Salazar E, González-Ortiz M. Effect of etanercept on insulin secretion and insulin sensitivity in a randomized trial with psoriatic patients at risk for developing type 2 diabetes mellitus. *Arch Dermatol Res*. 2007;299(9):461-465. doi:10.1007/s00403-007-0784-3
62. Pedersen TR, Tobert JA. Simvastatin: A review. *Expert Opin Pharmacother*. 2004;5(12):2583-2596. doi:10.1517/14656566.5.12.2583
63. André J, Patrício M. *Estatinas: Panorama Atual e Novas Indicações Terapêuticas*.; 2014.
64. Collins R, Reith C, Emberson J, et al. Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy. *The Lancet*. 2016;388(10059):2532-2561. doi:10.1016/S0140-6736(16)31357-5
65. Willey JZ, Elkind MS v. *3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase Inhibitors in the Treatment of Central Nervous System Diseases*. <https://jamanetwork.com/>
66. Moutinho M, Nunes MJ, Rodrigues E. The mevalonate pathway in neurons: It's not just about cholesterol. *Exp Cell Res*. 2017;360(1):55-60. doi:10.1016/j.yexcr.2017.02.034
67. Swerdlow DI, Preiss D, Kuchenbaecker KB, et al. HMG-coenzyme A reductase inhibition, type 2 diabetes, and bodyweight: Evidence from genetic analysis and randomised trials. *The Lancet*. 2015;385(9965):351-361. doi:10.1016/S0140-6736(14)61183-1
68. Malenda A, Skrobanska A, Issat T, et al. Statins impair glucose uptake in tumor cells. *Neoplasia*. 2012;14(4):311-323. doi:10.1593/neo.12444
69. Inzucchi SE. Is it time to change the type 2 diabetes treatment paradigm? No! metformin should remain the foundation therapy for type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2017;40(8):1128-1132. doi:10.2337/dc16-2372
70. Flory J, Lipska K. Metformin in 2019. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2019;321(19):1926-1927. doi:10.1001/jama.2019.3805

71. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017;60(9):1577-1585. doi:10.1007/s00125-017-4342-z
72. Yu H, Zhong X, Gao P, et al. The Potential Effect of Metformin on Cancer: An Umbrella Review. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10. doi:10.3389/fendo.2019.00617
73. Ma R, Yi B, Riker AI, Xi Y. Metformin and cancer immunity. *Acta Pharmacol Sin*. 2020;41(11):1403-1409. doi:10.1038/s41401-020-00508-0
74. Ng CAW, Jiang AA, Toh EMS, et al. Metformin and colorectal cancer: a systematic review, meta-analysis and meta-regression. *Int J Colorectal Dis*. 2020;35(8):1501-1512. doi:10.1007/s00384-020-03676-x
75. Ahn HK, Lee YH, Koo KC. Current status and application of metformin for prostate cancer: A comprehensive review. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):1-18. doi:10.3390/ijms21228540
76. De A, Kuppusamy G. Metformin in breast cancer: preclinical and clinical evidence. *Curr Probl Cancer*. 2020;44(1). doi:10.1016/j.currprobcancer.2019.06.003
77. Sun Y, Fang Y, Yoon MS, et al. *Phospholipase D1 Is an Effector of Rheb in the MTOR Pathway.*; 2008. [www.pnas.org/cgi/content/full/](http://www.pnas.org/cgi/content/full/)
78. Johnson L v, Walsh ML, Chen LB. *Localization of Mitochondria in Living Cells with Rhodamine 123 (Fluorescence Microscopy/Rous Sarcoma Virus/Colchicine)*. Vol 77.; 1980. <https://www.pnas.org>
79. Jabbour E, Cortes J, Kantarjian HM, et al. Allogeneic stem cell transplantation for patients with chronic myeloid leukemia and acute lymphocytic leukemia after Bcr-Abl kinase mutation-related imatinib failure. *Blood*. 2006;108(4):1421-1423. doi:10.1182/blood-2006-02-001933
80. Dreger P, Corradini P, Kimby E, et al. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: The EBMT transplant consensus. *Leukemia*. 2007;21(1):12-17. doi:10.1038/sj.leu.2404441
81. Simonsson B, Gedde-Dahl T, Markev rn B, et al. Combination of pegylated IFN- $\alpha$ 2b with imatinib increases molecular response rates in patients with low- or intermediate-risk chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2011;118(12):3228-3235. doi:10.1182/blood-2011-02-336685
82. Preudhomme C, Guilhot J, Nicolini E, et al. *Imatinib plus Peginterferon Alfa-2a in Chronic Myeloid Leukemia A BS T R AC T*. Vol 363.; 2010. <http://ctep.info.nih>
83. Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, et al. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2017;376(10):917-927. doi:10.1056/nejmoa1609324
84. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34(4):966-984. doi:10.1038/s41375-020-0776-2
85. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. Review in translational hematology The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. Published online 2005. doi:10.1182/blood-2004-08

86. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. *Five-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia A B S T R A C T.*; 2022. [www.nejm.org](http://www.nejm.org)
87. Hughes TP, Hochhaus A, Branford S, et al. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: An analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). *Blood*. 2010;116(19):3758-3765. doi:10.1182/blood-2010-03-273979
88. Quintás-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of Primary and Secondary Resistance to Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer Control*. 2009;16(2):122-131.
89. Fernandes S, Ricardo T, de Azevedo A, et al. *Abstract B57: Meclizine Synergistically Enhances Anticancer Effects of Paclitaxel in A549 Lung Cancer Cells*. Vol 24.; 2018.
90. Manuela Garcia Laveli da Silva, Luciana Bastianelli Knop, Durvanei Augusto Maria. Meclizine Chloridrate and Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin Associated with Monophosphoester Synthetic Phosphoethanolamine Modulating Proliferative Potential in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2019;7(7). doi:10.17265/2328-2150/2019.07.006
91. Zhu J, Thompson CB. Metabolic regulation of cell growth and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(7):436-450. doi:10.1038/s41580-019-0123-5
92. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*. 2016;23(1):27-47. doi:10.1016/j.cmet.2015.12.006
93. Ko BW, Han J, Heo JY, et al. Metabolic characterization of imatinib-resistant BCR-ABL T315I chronic myeloid leukemia cells indicates down-regulation of glycolytic pathway and low ROS production. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(9):2180-2188. doi:10.3109/10428194.2016.1142086
94. Prost S, Relouzat F, Spentchian M, et al. Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPAR $\gamma$  agonists. *Nature*. 2015;525(7569):380-383. doi:10.1038/nature15248
95. Naka K. New routes to eradicating chronic myelogenous leukemia stem cells by targeting metabolism. *Int J Hematol*. 2021;113(5):648-655. doi:10.1007/s12185-021-03112-y
96. Gohil VM, Sheth SA, Nilsson R, et al. Nutrient-sensitized screening for drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis. *Nat Biotechnol*. 2010;28(3):249-255. doi:10.1038/nbt.1606
97. Guan Y, Chen X, Wu M, et al. The phosphatidylethanolamine biosynthesis pathway provides a new target for cancer chemotherapy. *J Hepatol*. 2020;72(4):746-760. doi:10.1016/j.jhep.2019.11.007
98. Ferreira AK, Meneguelo R, Neto SC, Chierice GO, Maria DA. Synthetic Phosphoethanolamine Induces Apoptosis Through Caspase-3 Pathway by Decreasing Expression of Bax/Bad Protein and Changes Cell Cycle in Melanoma. *Journal of Cancer Science & Therapy*. 2011;3(3):53-59. Accessed April 23, 2022. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1064212>



99. Deeba F, Tahseen HN, Sharad KS, et al. Phospholipid diversity: Correlation with membrane-membrane fusion events. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2005;1669(2):170-181. doi:10.1016/j.bbamem.2005.02.009
100. Emoto K, Kobayashi T, Yamaji A, et al. *Redistribution of Phosphatidylethanolamine at the Cleavage Furrow of Dividing Cells during Cytokinesis (Phospholipid Asymmetrycell Divisioncytokinescontractile Ringactin Filament)*. Vol 93.; 1996. <https://www.pnas.org>
101. Emoto K, Toyama-Sorimachi N, Karasuyama H, Inoue K, Umeda M. *SHORT NOTE Exposure of Phosphatidylethanolamine on the Surface of Apoptotic Cells*. Vol 232.; 1997.
102. Pavlovic Z, Bakovic M. Regulation of phosphatidylethanolamine homeostasis-the critical role of CTP: Phosphoethanolamine cytidyltransferase (Pcyt2). *Int J Mol Sci.* 2013;14(2):2529-2550. doi:10.3390/ijms14022529
103. Luna ACDL, Santos Filho JRDA, Hesse H, Neto SC, Chierice GO, Maria DA. Modulation of pro-apoptotic effects and mitochondrial potential on B16F10 cells by DODAC/PHO-S liposomes. *BMC Res Notes.* 2018;11(1). doi:10.1186/s13104-018-3170-7
104. Luna AC de L. *Potencial Antitumoral Da Formulação Lipossomal DODAC/Fosfoetanolamina Sintética No Modelo de Hepatocarcinoma*. Faculdade de Medicina ; 2017. doi:10.11606/T.5.2017.tde-15122017-092710
105. Luna AC de L, Saraiva GKV, Chierice GO, Hesse H, Maria DA. Antiproliferative and proapoptotic effects of DODAC/synthetic phosphoethanolamine on hepatocellular carcinoma cells. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2018;19(1). doi:10.1186/s40360-018-0225-2
106. Lishner M, Bar-Sef A, Elis A, Fabian I. *Effect of Simvastatin Alone and in Combination With Cytosine Arabinoside on the Proliferation of Myeloid Leukemia Cell Lines.*; 2017. <http://jim.bmj.com/>
107. Lee SJ, Lee I, Lee J, Park C, Kang WK. Statins, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, potentiate the anti-angiogenic effects of bevacizumab by suppressing angiopoietin2, BiP, and Hsp90 $\alpha$  in human colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2014;111(3):497-505. doi:10.1038/bjc.2014.283
108. Jiang Z, Zheng X, Lytle RA, Higashikubo R, Rich KM. Lovastatin-induced up-regulation of the BH3-only protein, Bim, and cell death in glioblastoma cells. *J Neurochem.* 2004;89(1):168-178. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02319.x
109. Campbell MJ, Esserman LJ, Zhou Y, et al. Breast cancer growth prevention by statins. *Cancer Res.* 2006;66(17):8707-8714. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4061
110. Fromigué O, Haÿ E, Modrowski D, et al. RhoA GTPase inactivation by statins induces osteosarcoma cell apoptosis by inhibiting p42/p44-MAPKs-Bcl-2 signaling independently of BMP-2 and cell differentiation. *Cell Death Differ.* 2006;13(11):1845-1856. doi:10.1038/sj.cdd.4401873
111. Jang J, Lee J, Jang JH, Jung CW, Park S. Anti-leukemic effects of simvastatin on NRASG12D mutant acute myeloid leukemia cells. *Mol Biol Rep.* 2019;46(6):5859-5866. doi:10.1007/s11033-019-05019-8

112. van der Weide K, Dejonge-Peeters SDPWM, Kuipers F, DeVries EGE, Vellenga E. Combining simvastatin with the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib results in an enhanced cytotoxic effect in a subset of primary CD34+ acute myeloid leukemia samples. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(9):3076-3083. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-3004
113. de Jonge-Peeters SDPWM, van der Weide K, Kuipers F, Sluiter WJ, de Vries EGE, Vellenga E. Variability in responsiveness to lovastatin of the primitive CD34+ AML subfraction compared to normal CD34+ cells. *Ann Hematol*. 2009;88(6):573-580. doi:10.1007/s00277-008-0633-2
114. Yang YC, Huang WF, Chuan LM, et al. In vitro and in vivo study of cell growth inhibition of simvastatin on chronic myelogenous leukemia cells. *Chemotherapy*. 2008;54(6):438-446. doi:10.1159/000158663
115. Thachil J, Hill QA. *Haematology in Critical Care: A Practical Handbook*; 2014.
116. Robson V, Poynter J, Lawler PG, Baudouin S v. *The Need for a Regional Weaning Centre, a One-Year Survey of Intensive Care Weaning Delay in the Northern Region of England\**; 2001.
117. Kudo K, Imai C, Lorenzini P, et al. T lymphocytes expressing a CD16 signaling receptor exert antibody-dependent cancer cell killing. *Cancer Res*. 2014;74(1):93-102. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1365
118. Imai C, Mihara K, Andreansky M, et al. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2004;18(4):676-684. doi:10.1038/sj.leu.2403302
119. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, et al. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- $\beta$ : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*. 2009;16(3):183-194. doi:10.1016/j.ccr.2009.06.017
120. Hiemstra IH, Kuijpers TW, van den Berg TK, Matlung HL, Treffers LW. *Louise W. Treffers Neutrophils in Cancer*; 2016.
121. Lapenna S, Giordano A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(7):547-566. doi:10.1038/nrd2907
122. Larochelle S, Merrick KA, Terret ME, et al. Requirements for Cdk7 in the Assembly of Cdk1/Cyclin B and Activation of Cdk2 Revealed by Chemical Genetics in Human Cells. *Mol Cell*. 2007;25(6):839-850. doi:10.1016/j.molcel.2007.02.003
123. Oghabi M, Safaroghli-Azar A, Pourbagheri-Sigaroodi A, et al. Anti-proliferative effects of a small molecule inhibitor of CDK AT7519 on chronic myeloid leukemia (CML) cells through halting the transition of cells from G2/M phase of the cell cycle. *Biocell*. 2020;44(2):183-192. doi:10.32604/biocell.2020.08880
124. Wang Y, Xu SL, Wu YZ, et al. Simvastatin induces caspase-dependent apoptosis and activates P53 in OCM-1 cells. *Exp Eye Res*. 2013;113:128-134. doi:10.1016/j.exer.2013.05.013
125. Xie S, Lin H, Sun T, Arlinghaus RB. Jak2 is involved in c-Myc induction by Bcr-Abl. *Oncogene*. 2002;21:7137-7146. doi:10.1038/sj.onc

126. Rowley JD. Chromosome translocations: dangerous liaisons revisited. *Nature Reviews*. 2001;1(1):245-250.
127. Nowell PC. Discovery of the Philadelphia chromosome: A personal perspective. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(8):2033-2035. doi:10.1172/JCI31771
128. Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: In vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(12):909-923. doi:10.1038/nrc2012
129. di Bacco A, Keeshan K, McKenna SL, Cotter TG. Molecular Abnormalities in Chronic Myeloid Leukemia: Deregulation of Cell Growth and Apoptosis. *Oncologist*. 2000;5(5):405-415. doi:10.1634/theoncologist.5-5-405
130. Trotta R, Vignudelli T, Candini O, et al. *BCR/ABL Activates Mdm2 MRNA Translation via the La Antigen.*; 2003.
131. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(4):275-283. doi:10.1038/nrm2147
132. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(5):402-412. doi:10.1038/nrm2395
133. Shu KX, Li B, Wu LX. The p53 network: p53 and its downstream genes. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007;55(1):10-18. doi:10.1016/j.colsurfb.2006.11.003
134. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O. *P53 Has a Direct Apoptogenic Role at the Mitochondria Shows That the Type, Strength, and Kinetics of the Target Gene Profiles Depend on P53 Levels, Stress Type*. Vol 11.; 2003.
135. Steele AJ, Prentice AG, Hoffbrand AV, et al. P53-mediated apoptosis of CLL cells: Evidence for a transcription- independent mechanism. *Blood*. 2008;112(9):3827-3834. doi:10.1182/blood-2008-05-156380
136. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(5):402-412. doi:10.1038/nrm2395
137. Goldberg Z, Levav Y, Krichevsky S, Fibach E, Haupt Y. Treatment of chronic myeloid leukemia cells with imatinib (STI571) impairs p53 accumulation in response to DNA damage. *Cell Cycle*. 2004;3(9):1186-1193. doi:10.4161/cc.3.9.1126
138. Gewirtz DA, Holt SE, Grant S. *Apoptosis, Senescence, and Cancer*. Vol 1.; 2007.
139. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*. 2005;4(2):147-171. doi:10.4161/cbt.4.2.1508
140. Fellenberg J', Mau H, Nedel S, Ewerbeck V, Debatin \*k-M. *Drug-Induced Apoptosis in Osteosarcoma Cell Lines Is Mediated by Caspase Activation Independent of CD95-Receptor/Ligand Interaction*. Vol 18.; 1999.
141. Ashkenazi A, Dixit VM. *Death Receptors: Signaling and Modulation.*; 1998. <http://science.sciencemag.org/>

142. Wu GS. TRAIL as a target in anti-cancer therapy. *Cancer Lett.* 2009;285(1):1-5. doi:10.1016/j.canlet.2009.02.029
143. Park SJ, Kim MJ, Kim HB, Kang CD, Kim SH. Sensitization of imatinib-resistant CML cells to TRAIL-induced apoptosis is mediated through down-regulation of Bcr-Abl as well as c-FLIP. *Biochemical Journal.* 2009;420(1):73-81. doi:10.1042/BJ20082131
144. Safa AR. *C-FLIP, A MASTER ANTI-APOPTOTIC REGULATOR.* Vol 34.; 2012.
145. Nazim UM, Moon JH, Lee JH, et al. *Activation of Autophagy Flux by Metformin Downregulates Cellular FLICE-like Inhibitory Protein and Enhances TRAIL-Induced Apoptosis.* Vol 7.; 2016. [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)
146. Strekalova E, Malin D, Rajanala H, Cryns VL. Metformin sensitizes triple-negative breast cancer to proapoptotic TRAIL receptor agonists by suppressing XIAP expression. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;163(3):435-447. doi:10.1007/s10549-017-4201-0