UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PRICILA MEIER SOUZA

ATIVIDADE DE DERIVADOS TRIAZÓLICOS DESPROTEGIDOS DO ÁCIDO CAFEICO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA DE LINHAGEM DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

VITÓRIA - ES
2021

PRICILA MEIER SOUZA

ATIVIDADE DE DERIVADOS TRIAZÓLICOS DESPROTEGIDOS DO ÁCIDO CAFEICO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA DE LINHAGEM DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Dalmaschio Daltoé

VITÓRIA - ES

2021

FOLHA DE APROVAÇÃO

PRICILA MEIER SOUZA

ATIVIDADE DE DERIVADOS TRIAZÓLICOS DESPROTEGIDOS DO ÁCIDO CAFEICO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA DE LINHAGEM DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito pra obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Vitória, 13 de setembro de 2021.

Banca Examinadora:

_____

Profa. Dra. Renata Dalmaschio Daltoé (Orientadora)

Professora – Departamento de Ciências Farmacêuticas - UFES

_____

Dra. Marcele Lorentz (membro titular)

Doutoranda – Departamento de Ciências Farmacêuticas - UFES

_____

Msc. Iuly Guimarães Ribeiro (membro titular)

Mestre – Departamento de Bioquímica - UFES

_____

Farmacêutica Mileni Rodrigues (membro suplente)

Mestranda - Departamento de Bioquímica - UFES

RESUMO

A leucemia mieloide crônica é uma neoplasia mieloproliferativa caracterizada pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph+), formado através de translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22, formando o gene BCR-ABL, codificador da proteína de mesmo nome, que apresenta atividade aumentada de tirosinocinase. A enzima mutada BCR-ABL, é o alvo dos inibidores de tirosinocinases (ITKs), usados no tratamento da leucemia mieloide crônica. O mesilato de imatinibe foi o primeiro que recebeu a aprovação do FDA e, assim como os ITKs de segunda geração, o dasatinibe e o nilotinibe, promovem a remissão da LMC em mais de 90% dos casos, contudo, uma parcela importante de pacientes não consegue uma boa resposta, pois o gene BRC-ABL pode desenvolver mecanismos de resistência que podem levar a um processo de falha da resposta ao tratamento. As fontes naturais sempre foram uma rica fonte de descobertas, com suas estruturas químicas amplas e diversificadas, que possibilitam o desenvolvimento de novos medicamentos, visando uma busca por uma maior eficácia, segurança e redução de efeitos colaterais. O ácido cafeico presente em diversas plantas, pode sofrer modificações em sua estrutura e sua conversão em ésteres ou amidas proporciona análogos com diversas atividades biológicas. O éster feniletílico do ácido cafeico, é um exemplo dessa diversidade, apresentando atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e antifúngica. Observando a resistência aos fármacos que alguns pacientes podem apresentar, o objetivo deste trabalho foi avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade de novos derivados triazólicos desprotegidos do ácido cafeico, sintetizados pelo nosso grupo e seus efeitos em células leucêmicas K562, portadoras do cromossomo Philadelphia. Foi realizada a avaliação da atividade citotóxica desses novos derivados triazólicos desprotegidos do ácido cafeico, através de determinação da viabilidade celular metabólica(VCM) por MTT. Após o tratamento com H46, H51 e Imatinibe, nas concentrações de 1×10^{-8} a 1×10^{-4} foi observado que houve VCM de 94,5%, 48,1% e 10,7% respectivamente. Pode-se observar que o composto H51 é mais eficaz do que o H46.

Palavras-chave: leucemia mieloide crônica; inibidores de tirosinocinase, ácido cafeico, BCR-ABL, antineoplásico.

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia is a myeloproliferative neoplasm characterized by the presence of the Philadelphia (Ph+) chromosome, formed by reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22, forming the BCR-ABL gene, encoding the protein of the same name, which has increased tyrosinokinase activity. The mutated enzyme BCR-ABL is the target of tyrosine kinase inhibitors (ITKs), used in the treatment of chronic myeloid leukemia. Imatinib mesylate was the first to receive FDA approval and, like second-generation ITKs, dasatinib and nilotinib, promote CML remission in more than 90% of cases, however, a significant portion of patients do not achieves a good response, as the BRC-ABL gene can develop resistance mechanisms that can lead to a process of failure to respond to treatment. Natural sources have always been a rich source of discoveries, with their broad and diversified chemical structures, which enable the development of new drugs, aiming at a search for greater efficacy, safety and reduction of side effects. Caffeic acid, present in several plants, can undergo changes in its structure and its conversion into esters or amides provides analogues with different biological activities. The phenylethyl ester of caffeic acid is an example of this diversity, presenting antioxidant, anti-inflammatory, antitumor and antifungal activities. Observing the drug resistance that some patients may present, the aim of this study was to evaluate, in vitro, the cytotoxicity of new unprotected triazole derivatives of caffeic acid synthesized by our group and their effects on K562 leukemic cells, carrying the Philadelphia chromosome. The evaluation of the cytotoxic activity of these new unprotected triazole derivatives of caffeic acid was performed, through the determination of metabolic cell viability (VCM) by MTT. After treatment with H46, H51 and Imatinib, in concentrations from 1×10^{-8} to 1×10^{-4}, it was observed that there was a VCM of 94.5%, 48.1% and 10.7% respectively. It can be seen that compound H51 is more effective than H46.

Keywords: chronic myeloid leukemia; tyrosine kinase inhibitors, caffeic acid, BCR-ABL, antineoplastic.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me fornecer essa oportunidade de obter uma profissão e me aprimorar como pessoa, sendo meu refúgio e meu guia, sempre me dando força e coragem para seguir meus sonhos.

Agradeço à minha família, principalmente meus pais, pois sem eles esse sonho não seria possível, sempre me apoiando, me dando um poderoso alicerce para seguir meu caminho e aos meus filhos, Letícia Meier e Matheus Meier, que sempre me incentivaram e me deram força para seguir em frente.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Renata Dalmaschio Daltoé, pela oportunidade de realizar este trabalho, por todo o apoio e por toda a orientação recebida, sempre com muito carinho e com muita competência. Foi uma honra e um prazer.

Agradeço aos meus amigos, do curso e do laboratório, por toda a paciência e compreensão, por estarem presentes em algum momento dessa caminhada, sempre me dando conselhos e dicas para complementar este trabalho.

Agradeço a Dra Marcele Lorentz, a Msc. Iuly Ribeiro e a farmacêutica Mileni Rodrigues, por aceitarem constituir a banca e cederem gentilmente seu tempo para contribuir com o aprimoramento deste trabalho de conclusão de curso.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para realização desse trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 originando o cromossomo Philadelfia (Ph+)..... 14

Figura 2: Mesilato de Imatinibe..... 16

Figura 3: Ácido Cafeico..... 21

Figura 4: Estrutura química do Éster fenetílico do ácido cafeico..... 23

Figura 5: Composto H46..... 26

Figura 6: Composto H51..... 26

Figura 7: Viabilidade celular metabólica (VCM) da linhagem K562..... 31

Figura 8: Composto H46..... 33

Figura 9: Composto H51..... 33

Figura 10: Diferença estrutural entre o ácido cafeico (CA) e o ácido ferúlico (FA) 33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o triênio 2020-2022 por sexo, exceto pele não melanoma..... 13

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos pré-clínicos..... 20

Tabela 2: Estudos clínicos. (ADME – absorção, distribuição, metabolismo e excreção)..... 20

Tabela 3: IC_{50} estimada do quimioterápico Imatinibe e dos compostos H46 e H51 sobre a linhagem celular K562..... 32

LISTA DE ABREVIATURAS

ABRALE	Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia
ABL	*Abelson Leukemia Virus*
ATCC	*American type culture collection*
ATP	Adenosina Trifosfato
BCR	*Breakpoint Cluster Region*
CAPE	Éster fenetílico do ácido caféico
DMSO	Dimetilsulfóxido
FA	Fase Acelerada
FB	Fase Blástica
FC	Fase Crônica
FDA	*Food and Drug Administration*
FISH	Hibridação *in situ* por Fluorescência
IARC	*Internacional Agency for Research on Cancer*
INCA	Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva
ITKs	Inibidores de Tirosinocinase
IUPAC	União Internacional da Química Pura e Aplicada
JAK/STAT	*Janus Kinase-Signal Transducer and Avtivator of Transcription*
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Pares de base
PCR	Proteína C Reativa
Ph	*Philadelphia*
PI3K	Phosphatidilinositol 3 kinase
qRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SNC	Sistema Nervoso Central
VCM	Viabilidade Celular Metabólica

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO **12**

1.1-Leucemia Mieloide Crônica **12**

1.2-Inibidores de tirosinocinase (ITKs) **16**

1.3-Desenvolvimento de fármacos **19**

1.4-Ácido cafeico **21**

2-OBJETIVOS **25**

3-MATERIAL E MÉTODOS **26**

3.1-Compostos testados **26**

3.2-Cultivo e manutenção de linhagem celular que expressa atividade aumentada de tirosinocinase **27**

3.3-Ensaio de Viabilidade Celular Metabólica (VCM) *in Vitro* **27**

3.4-Determinação das IC_{50} dos compostos testados **28**

3.5-Análise Estatística **28**

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO **30**

5-CONCLUSÃO **35**

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **36**

1-INTRODUÇÃO

1.1-Leucemia Mieloide Crônica

O processo neoplásico consiste em uma proliferação celular anormal que ocorre por variados mecanismos, por acúmulo de danos celulares dependentes do tempo, podendo acometer qualquer tecido ou órgão. Se o sistema imunológico junto a outros mecanismos de reparo do DNA não conseguirem bloquear esse processo, em vias de crescimento celular, pode se desenvolver esse crescimento anormal de células (FANE, M., WEERARATNA, A. T., 2020).

Esse processo, também chamado de tumor, pode ser benigno quando é formado por células muito semelhantes às células normais que possuem baixa velocidade de multiplicação e são incapazes de migrar para outros sítios. O diagnóstico de câncer, ou o tumor maligno, com hiperproliferação e aumento de sobrevivência celular, ocorre quando as células se multiplicam de modo rápido e sem controle, podendo se desprender do tecido e migrar para outras partes do corpo através dos vasos sanguíneos e linfáticos, o que caracteriza a metástase (ABRALE, 2021).

A proliferação celular desordenada ocorre a partir de alterações no DNA celular por causas multifatoriais, ou seja, tanto por fatores genéticos e epigenéticos, quanto por fatores ambientais, são os agentes carcinogênicos. Essas alterações ocorrem normalmente, mas o sistema imune possui mecanismos que conseguem bloquear e eliminar essas células alteradas, porém, pode ocorrer da célula com seu DNA alterado, conseguir evadir a esses mecanismos desenvolvendo o tumor (FANE, M., WEERARATNA, A. T., 2020).

As alterações podem ocorrer em genes que, nas células normais estão inativos, denominados proto-oncogenes, e ao serem ativados, tornam-se oncogenes, responsáveis por transformar as células normais em neoplásicas. Esse período de ativação pode levar vários anos até o desenvolvimento tumoral, isso porque as alterações que ocorrem nos proto-oncogenes são cumulativas pelos agentes carcinogênicos, que em uma certa frequência, em um período de tempo e por

interações que podem acontecer entre esses agentes darão início e desenvolver o câncer (INCA, 2021).

As leucemias estão entre os cânceres mais incidentes. O número de casos novos de leucemia esperados para o Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022, será de 5.920 casos em homens e de 4.890 em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 5,67 casos novos a cada 100 mil homens (Quadro 1) e 4,56 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2021).

Quadro 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o triênio 2020-2022 por sexo, exceto pele não melanoma (INCA, 2021).

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia,brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

A medula óssea está presente no esqueleto axial e nas extremidades proximais do fêmur e do úmero e é onde ocorre a hematopoese, que é a produção de células do sangue, tanto leucócitos ou glóbulos brancos, quanto hemácias ou glóbulos vermelhos, bem como as plaquetas. Os leucócitos são a principal defesa do organismo, sendo ativados sempre que o mesmo é invadido por agentes agressores ou quando sofre alguma lesão. Já as hemácias são responsáveis pelas trocas gasosas, levando o oxigênio até os tecidos e retirando o gás carbônico, levando-o até os pulmões para ser excretado pelas vias aéreas superiores. As plaquetas, por sua vez, atuam na coagulação, controlando sangramentos e hemorragias (GOODMAN, 2012).

A medula óssea pode ser acometida por várias enfermidades, sendo uma de grande importância a leucemia, que se caracteriza pelo acúmulo de leucócitos malignos na medula óssea e na circulação periférica. Além de se multiplicarem de forma descontrolada, essas células mutadas têm seu metabolismo alterado, levando também a um tempo de meia vida mais curto. As leucemias podem ainda serem

subdivididas em leucemia linfocítica e a leucemia mieloide dependendo de quais células foram comprometidas, se pertencentes à linhagem linfoide ou mieloide. A velocidade com que a doença evolui e se torna mais grave determina se a leucemia será crônica, que se agrava de modo mais lento, ou será aguda, que se agrava de modo mais rápido (HOFFBRAND, V., 2013).

Dentre os diferentes tipos de cânceres, a Leucemia Mieloide Crônica (LMC), de que trata esse trabalho, é uma doença mieloproliferativa crônica clonal, em que as células alteradas pertencem à linhagem mieloide de células sanguíneas e é caracterizada por leucocitose, esplenomegalia e pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph), que é resultado da translocação recíproca e equilibrada entre os braços longos dos cromossomos 9q34 e 22q11(Figura 1). Essa translocação gera a proteína mutada BCR-ABL, com atividade aumentada de tirosinocinase, que desencadeia liberação de efetores da proliferação celular e inibidores da apoptose, sendo sua atividade responsável pela oncogênese inicial da LMC (HUANG, X., et al, 2019).

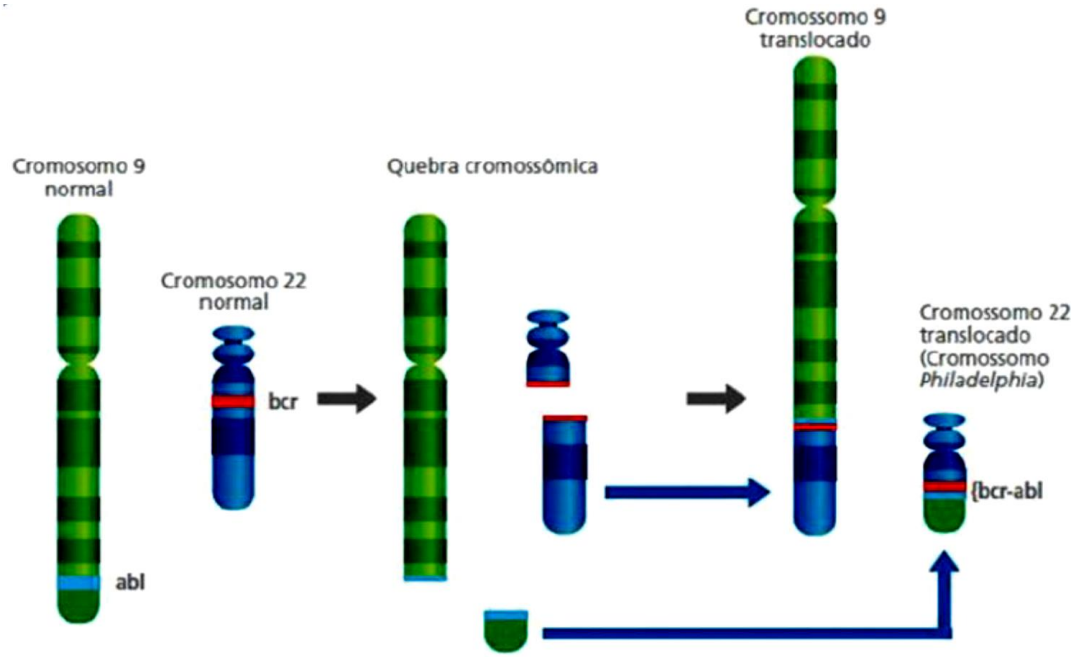

Figura 1: Translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 originando o cromossomo Philadelfia (Ph+). (GUSTAVO, L., 2021)

As proteinocinases são componentes importantes das vias de transdução de sinais, que regulam o crescimento celular. Essas vias de sinalização influenciam a

transcrição gênica e a síntese de DNA, bem como eventos citoplasmáticos. As proteinocinases podem ser classificadas em diferentes categorias, entre elas as tirosinocinases que fosforilam especificamente resíduos de tirosina. Os fatores de crescimento e outros ligantes ligam-se às tirosinocinases receptoras e as ativam em condições fisiológicas (GOODMAN, 2012).

As tirosinocinases são uma classe de proteínas que catalisam a transferência de grupos fosfato no ATP para os resíduos de tirosina de muitas proteínas importantes, fazendo a fosforilação dessas proteínas e, em seguida, transferindo o sinal para regular o crescimento, diferenciação e apoptose (JIAO et al, 2018).

A evolução da LMC se dá em três fases, a fase crônica inicial e progressiva, seguida de uma fase de transformação de duração variável e segue na fase terminal, também chamada de fase blástica. Na fase crônica ocorre a hiperplasia medular e manutenção da maturação das células mieloides. A fase de transformação pode apresentar neutrofilia, esplenomegalia, trombocitose, trombocitopenia, contagem de blastos entre 10-19% no sangue periférico ou na medula óssea. Na fase blástica pode ocorrer a presença de 20% ou mais de blastos no sangue periférico ou na medula óssea de acordo com a Portaria do Ministério da Saúde nº 1.219 de 4 de novembro de 2013.

Ainda conforme a Portaria, assim como qualquer processo neoplásico, o quanto antes for realizado o diagnóstico, maior será a probabilidade de cura e melhor será seu prognóstico. Dessa forma, a atenção básica à saúde é essencial para um resultado mais eficiente. O diagnóstico clínico se caracteriza pelo reconhecimento de sinais e sintomas e um rápido acesso aos serviços de saúde, sendo os mais comuns palidez, fadiga, febre, adenomegalia generalizada, infecções recorrentes ou persistentes, hematomas, petéquias, sangramentos inexplicados, hepatoesplenomegalia. Para o diagnóstico laboratorial de certeza são realizados o hemograma, imunofenotipagem do sangue periférico e da medula óssea, mielograma, citogenética da medula óssea, hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) e reação em cadeia da polimerase (PCR).

1.2-Inibidores de tirosinocinase (ITKs)

As proteinocinases, como já dito anteriormente, são componentes de extrema importância das vias de transdução de sinais intracelular. O genoma humano possui aproximadamente 550 proteinocinases que são classificadas em cinases que fosforilam resíduos de tirosina, cinases que fosforilam resíduos de serina e treonina e cinases inespecíficas (GOODMAN, 2012).

Os inibidores de tirosicinase são a primeira opção de tratamento para pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) e qual deles será utilizado dependerá da fase da LMC do paciente, do tratamento anterior e da resposta do sistema imune. O mesilato de imatinibe foi o primeiro ITK aprovado pelo FDA, o dasatinibe e o nilotinibe são os ITKs de segunda geração utilizados em pacientes resistentes ou intolerantes ao imatinibe. O bosutinibe e o ponatinibe são os de terceira geração aprovados em 2017 e 2012 respectivamente. O imatinibe não consegue penetrar na barreira hematoencefálica de modo eficiente, e em casos em que ocorre metástase para o SNC, é substituído pelo dasatinibe ou nilotinibe que conseguem atingir o líquido cefalorraquidiano com maior eficácia (CUELLAR et al, 2017).

O imatinibe (Figura 2), o dasatinibe e o nilotinibe conseguem a remissão da LMC em mais de 90% dos casos (LINEV, A. *et al*, 2018), porém uma parcela de pacientes não consegue uma boa resposta.

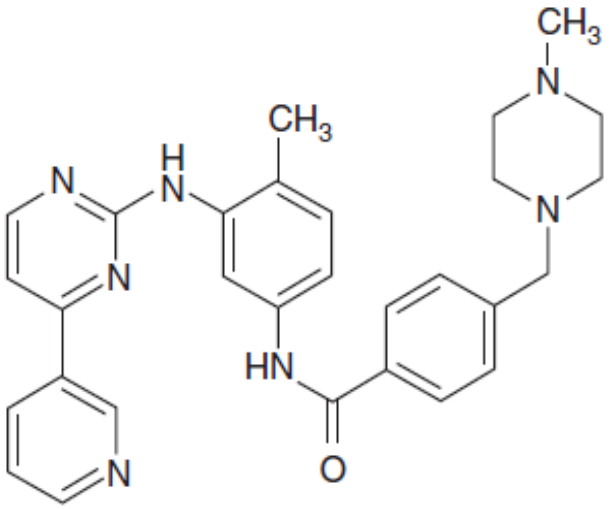

Figura 2: Mesilato de imatinibe (LINEV, A. *et al*, 2018)

O imatinibe, que é o medicamento da primeira geração de inibidores de tirosinocinases (ITKs), inibe competitivamente a ligação de ATP se ligando à BCR-ABL em sua conformação inativa, impedindo sua ativação pela ausência de sua ligação ao ATP. Desse modo, o imatinibe consegue inibir a proliferação celular causada por BCR-ABL e a formação de tumores sem induzir apoptose, ou seja, sem inibir o crescimento de células normais (AN, X. et al, 2010).

Os ITKs diferem entre si na potência, na especificidade de suas ligações e na capacidade de superar os mecanismos de resistência que as células leucêmicas podem desenvolver. Esses mecanismos podem levar a um processo de resistência primária, que é a ausência de resposta ao tratamento, ou ao processo de resistência secundária, em que ocorre a perda da resposta ao tratamento ao longo do mesmo (AN, X. et al, 2010).

A resistência aos ITKs é principalmente devida a mutações em BCR-ABL que alteram sua conformação impedindo que o medicamento se ligue ao sítio de ligação de ATP. Os ITKs de segunda geração conseguem uma melhor potência inibidora em relação ao imatinibe. No entanto, a mutação T315I bloqueia completamente tanto o imatinibe, quanto os de segunda geração dasatinibe e nilotinibe, sendo motivo de grande preocupação. Porém, o ITK de terceira geração, ponatinibe, consegue agir sobre BCR-ABL mesmo com mutações, incluindo a mutação T315I, no entanto, existe a preocupação em relação ao uso de ponatinibe pela sua toxicidade cardiovascular (RABIAN et al, 2019).

A resistência primária pode ocorrer pelo uso concomitante com outros medicamentos que irão interferir na ação da CYP450, responsável pela biotransformação do imatinibe, a inibindo ou estimulando. Outra forma de resistência primária é a variação dos níveis da proteína OCT-1 (*human organic cation*) que é a mediadora da entrada do imatinibe na célula (PUSHPAM, D., 2020)

As causas mais frequentes de resistência secundária são mutações que ocorrem em ABL. Essas mutações podem ocorrer em domínios diferentes, na alça de fosfato (P-loop), na alça de ativação e no domínio catalítico. Quando ocorrem no sítio de ligação do imatinibe são eliminadas ligações de hidrogênio críticas, as que ocorrem na alça de fosfato alteram a conformação da cinase e, as que ocorrem na alça de

ativação estabilizam em uma conformação ativa que irá impossibilitar a ligação do imatinibe (PAGNANO, K. 2008).

Apesar de um número crescente de pacientes apresentarem uma boa resposta ao tratamento com os ITKs, aproximadamente 30% dos pacientes tratados com imatinibe apresentam resistência à terapia, com metade deles apresentando o desenvolvimento de mutação pontual no domínio de ligação de ATP de BCR-ABL. O radotinibe é um ITK que apresenta uma analogia estrutural com o nilotinibe, que é um ITK de segunda geração, e é aprovado na Coreia do Sul para pacientes com LMC recém-diagnosticados e aqueles resistentes ou intolerantes a pelo menos um ITK. O radotinibe mostrou atividade contra as mutações mais comuns de BCR- ABL, exceto T315I. Apesar das inúmeras opções terapêuticas para pacientes com LMC, uma solução curativa excluindo o transplante de células-tronco alogênico ainda não foi descoberta. Isso se deve à capacidade da proteína desenvolver mecanismos de escape e ineficiência dos ITKs em relação às células-tronco leucêmicas, um alvo farmacológico que, na verdade, representa o principal objetivo a ser alcançado para vencer totalmente a doença (MASSARO et al, 2018).

Observa-se que os efeitos adversos são importantes causas de resistência ao tratamento com os ITKs, podendo até mesmo levar à falha terapêutica. Um estudo realizado por Tsai et al (2018), do Departamento de Medicina Interna do Hospital Universitário Kaohsiung, em Taiwan, observou as causas da não adesão ao tratamento. Entre essas causas, estão fatores como: idade, sexo, escolaridade, estado civil, a carga de drogas concomitante, comorbidades e efeitos adversos não hematológicos comuns, tais como rash cutâneo, desconforto gastrointestinal, edema, dor de cabeça, mialgias, mal-estar, e derrame pleural quando se administra ITKs. Ao considerar a associação entre características sociais e adesão à medicação, idade avançada e estado civil casado mostrou uma tendência para uma melhor adesão. O ajuste da dose e suspensão da medicação melhora os efeitos adversos não hematológicos na maior parte dos casos.

Apenas algumas pessoas desenvolvem efeitos mais raros e isso pode estar relacionado a vários fatores, incluindo polimorfismos em genes que afetam os ITKs. O desenvolvimento de efeitos adversos também pode ser determinado pelo tipo de ITK, sua dosagem, horário da administração, fase da LMC, medicamentos

concomitantes e área corporal. Os ITKs de segunda e terceira geração podem gerar efeitos inesperados e até mesmo irreversíveis, sendo que observações de efeitos adversos de longo prazo existem apenas para o imatinibe até então. A maioria dos pacientes apresentam efeitos adversos leves a moderados e que se resolverão espontaneamente. A redução ou interrupção só deve ser realizada se o manejo do efeito adverso não for possível de outras maneiras e for necessário o monitoramento desse paciente. Entre esses efeitos destacam-se doença arterial obstrutiva crônica, cerebrovasculares, pneumonia, efeitos hepatobiliares, anormalidades endócrinas e metabólicas. (STEEGMANN et al, 2016)

1.3-Desenvolvimento de fármacos

Um novo medicamento leva em média entre 10 e 15 anos, com elevados, gastos até chegar às prateleiras da farmácia. Porém, novas tecnologias estão sendo utilizadas para a redução desse tempo e desse custo, que podem variar dependendo da doença e do medicamento. O custo geral de um medicamento órfão, que trata condições médicas raras e negligenciadas, é menor que o custo de um medicamento não órfão. (BERDIGALIYEV, N. & ALJOFAN, M., 2020)

As fontes naturais sempre foram uma rica fonte de descobertas, com suas estruturas químicas amplas e diversificadas. Possuem muitos agentes terapêuticos, sendo um desafio na purificação e caracterização de seus componentes, que limitam seu uso na descoberta de novos medicamentos. Nelas também estão presentes substâncias farmacologicamente ativas derivadas de fontes biológicas ou minerais, e destinadas ao uso no diagnóstico, cura, mitigação e prevenção de doenças. (BERDIGALIYEV, N. & ALJOFAN, M., 2020)

O desenvolvimento da triagem de alto rendimento (HTS) e bancos de dados de moléculas contribuíram para o estabelecimento de uma nova era de descoberta de medicamentos, sendo amplamente utilizados na indústria farmacêutica e permitem o acesso a milhares de moléculas contra um alvo biológico. Um dos modelos de triagem HTS mais utilizados é o baseado em cultura de células, que podem fornecer um importante quantitativo de informações biológicas durante uma triagem de drogas. Esse método deve possuir alta sensibilidade e é normalmente executado em placas

de cultura de 96 poços, que foi a utilizada na execução dos experimentos deste trabalho. (BERDIGALIYEV, N. & ALJOFAN, M., 2020)

Entre os novos fármacos, o reaproveitamento de medicamentos tem sido importante na descoberta de medicamentos antineoplásicos com novos mecanismos de ação, esse processo é descrito como o Reposicionamento de Medicamentos. Eles possibilitam benefícios como o conhecimento prévio de farmacocinética e toxicologia, com margem de segurança clínica de Fase I já estabelecida para sua indicação original, com isso, o reposicionamento se torna mais rápido e com menor custo. No entanto, é preciso reanalisar as suas atividades biológicas, sua farmacologia e seus estudos clínicos, para eliminação de riscos e de falhas terapêuticas. (OLGEN, S., KOTRA, L. P., 2019)

Para o planejamento e desenvolvimento de novos fármacos é importante seguir algumas etapas para que a segurança e a eficácia do candidato a medicamento sejam asseguradas. A escolha da estratégia de planejamento estrutural a ser adotada irá depender do conhecimento da estrutura do alvo terapêutico. Quando a estrutura da molécula alvo é conhecida, pode-se utilizar a docagem molecular através de experimentação *in silico*. As tabelas 1 e 2, mostram um breve resumo dos protocolos para o desenvolvimento de novos fármacos (GUIDO et al, 2010).

Tabela 1: Estudos pré-clínicos. (Adaptado de GUIDO et al, 2010)

Estudos pré-clínicos	
In vitro	Utilizam células ou tecidos
In vivo (Em animais)	Toxicidade aguda, de doses repetidas, mutagenicidades

Tabela 2: Estudos clínicos. (ADME – absorção, distribuição, metabolismo e excreção) (Adaptado de GUIDO et al, 2010)

Estudos clínicos	
Fase I	Estudo da toxicidade
Fase II	Estudo de eficácia e segurança. Número reduzido de pacientes
Fase III	Comprovação da eficácia, da segurança e estudos de ADME. Número maior de pacientes.
Fase IV	Farmacovigilância após comercialização do medicamento.

A RDC nº 9/2015 da Anvisa, define os procedimentos e requisitos para realização de ensaios clínicos com medicamentos, incluindo a submissão do Dossiê de Desenvolvimento Clínico de Medicamento (DDCM) a ser aprovado pela Anvisa.

1.4-Ácido cafeico

O ácido cafeico (CA) ou ácido 3,4-dihidroxicinâmico (Figura 3) está entre os principais representante dos ácidos hidroxicinâmicos e fenólicos, que estão presentes em várias fontes de alimentos como frutas, legumes, vinhos, azeite, chás e grãos de café, como produto de metabolismo secundário (FERIOTTO, G., et al, 2021).

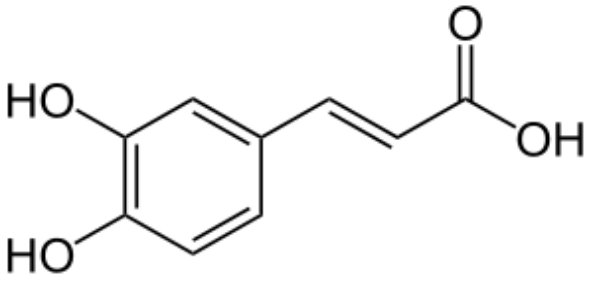

Figura 3: Ácido Cafeico. (FERIOTTO, G., et al, 2021)

Geralmente, não é encontrado na forma livre, sendo mais observado na forma de heterosídeo, como ácido clorogênico, ésteres e amidas. O ácido clorogênico é um éster formado entre o ácido cafeico e o ácido quínico, sendo um dos polifenóis mais abundantes nos alimentos dietéticos, principalmente no café. O ácido cafeico pode sofrer diversas modificações em sua estrutura, sua transformação em ésteres ou amidas proporciona análogos com diversas atividades biológicas. Um dos compostos mais ativos da própolis (*Baccharis dracunculifolia)*, o éster feniletílico do ácido cafeico, é um exemplo dessa diversidade de atividades biológicas, o qual apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e antifúngica. Várias ações metabólicas do ácido cafeico e seus derivados foram estudadas e comprovadas como, por exemplo, a atividade antitumoral e a atividade antioxidante, mostrando que muitos compostos derivados com potencial farmacológico podem ser obtidos (SILVA et al, 2014).

O ácido cafeico atua na defesa da planta contra predadores, pragas e infecções devido ao seu efeito inibitório sobre crescimento de insetos, fungos e bactérias, além

de proteger as folhas contra a radiação ultravioleta. No entanto, é encontrado em sua forma esterificada, o que dificulta sua absorção pelo corpo, precisando ser hidrolisado pela microbiota intestinal, pois o sistema digestivo humano não possui as esterases necessárias a hidrólise do ácido clorogênico para liberar o ácido cafeico. A concentração plasmática máxima foi observada 1h após a ingestão dos alimentos e diminui rapidamente, sendo excretado principalmente pela urina (ESPÍNDOLA, K. et al, 2019).

Seu efeito antineoplásico se dá inibindo a formação de produtos nitrogenados, como nitrosaminas e nitrosamidas, e sua propriedade antioxidante é atribuída à sua estrutura química. Suas hidroxilas fenólicas, presentes no grupo catecol, permitem a transferência de átomos de hidrogênio para radicais peroxil. Além disso, a dupla ligação na cadeia carbônica aumenta a estabilidade do radical fenólico (ESPÍNDOLA, K. et al, 2019).

Os fenóis, ácido dihidrocafeico, ácido 3,4-dihidroxifeniletanóico e ácido 3,4-dihidroxibenzóico, foram testados em 3 tipos de linhagens tumorais humanas; células do colo do útero, adenocarcinomas mamários, leucemia linfoblástica. O ácido cafeico mostrou atividade antiproliferativa contra todas as linhagens de células testadas, sobretudo para células do colo do útero, enquanto o ácido dihidrocafeico, apresentou uma atividade antiproliferativa irreversível sobre todas as linhagens de células. O ácido 3,4-dihidroxifeniletanóico, de forma também interessante, demonstrou atividade antiproliferativa e citotóxica em linhagem celular de leucemia linfoblástica (ZHANG, 2014).

Por fim, o ácido 3,4-dihidroxibenzóico também mostrou um efeito antiproliferativo sobre todas as linhagens de células testadas. Adicionalmente, esses compostos não apresentaram efeito citotóxico significativo contra células humanas sadias, fibroblastos não-neoplásicos obtidos a partir do tecido do pulmão embrionário humano. O éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE, Figura 4), extraído da própolis, apresentou um efeito antitumoral, antioxidante, antiinflamtório, bastante pronunciado sobre as linhagens de células tumorais, maior do que o apresentado pelo derivado octil e metílico (ZHANG, 2014).

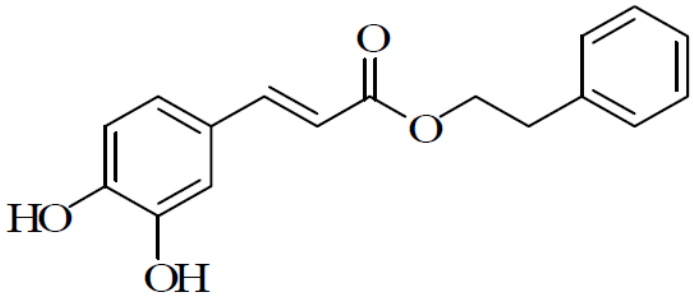

Figura 4: Estrutura química do Éster fenetílico do ácido caféico (ZHANG, 2014).

Desta forma, através de estudos de relação estrutura-atividade (SAR) foi possível observar que o comprimento da cadeia alquílica ligada à função éster parece interferir nas propriedades antiproliferativas, cujas, nos análogos triazólicos do ácido cafeico também foram estudadas, sendo os ensaios realizados com linhagem celular de câncer de mama (MCF-7) e células da mama não-tumorais (MCF10A). Os compostos não mostraram inibição significativa do crescimento de células não tumorais, mostrando uma toxicidade seletiva para a proliferação de células tumorais, característica desejável no desenvolvimento de fármacos antineoplásicos (BOUDREAU *et al*., 2009). Foi estudado o seu potencial citotóxico e apoptótico em linhagem celular LMC K562 e seu possível sinergismo com imatinibe (FERIOTTO, G., et al, 2021).

O ácido cafeico tem sido amplamente utilizado como um modelo para o desenvolvimento de novas entidades químicas com potencial interesse terapêutico em doenças humanas associadas ao estresse oxidativo. Além disso, a aplicabilidade de derivados do ácido cafeico expande-se para a indústria de cosméticos, devido às suas propriedades de estabilização. A síntese de ésteres, amidas e os híbridos com as drogas são estratégias de tendência para o desenvolvimento de derivados com aplicação terapêutica (SILVA T., OLIVEIRA C., BORGES F., 2013).

Considerando uma busca por fármacos altamente seletivos contra alvos terapêuticos moleculares que estão anormalmente expressos na célula tumoral, nosso grupo tem estudado derivados do ácido cafeico como potenciais inibidores de tirosinocinase, enzimas as quais representaram, na última década, uma esperança potencial como alvo na terapia antineoplásica.

Estudos de viabilidade celular metabólica realizados com esses compostos em linhagem de LMC BCR-ABL+ realizados previamente pelo nosso grupo mostraram a capacidade citotóxica desses compostos. Estes também demonstraram inibir a atividade da enzima ABL cinase em teste enzimático *in vitro*.

Diante dos resultados iniciais, nosso grupo sintetizou novos derivados triazólicos do ácido cafeico, de forma a tentar melhorar a atividade citotóxica já demonstrada pelos derivados inicialmente testados. Esses novos compostos são derivados do ácido cafeico que, diferentemente dos compostos sintetizados inicialmente pelo nosso grupo, tem suas hidroxilas desprotegidas.

Assim, tendo em vista que, apesar do sucesso dos ITKs no tratamento da LMC ainda ocorrem casos de quimioresistência, além dos efeitos adversos relacionados ao tratamento, nosso grupo vem se dedicando à avaliação de citotoxicidade de novas moléculas potenciais candidatas a novos fármacos. Diante desse cenário, foi realizada neste trabalho de conclusão de curso, a avaliação, *in vitro*, da citotoxicidade dos derivados triazólicos desprotegidos do ácido cafeico sintetizados pelo nosso grupo sobre células leucêmicas portadoras do cromossomo Philadelphia.

2-OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho de conclusão de curso foi avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade de derivados triazólicos do ácido cafeico, sintetizados pelo nosso grupo e seus efeitos em células leucêmicas portadoras do cromossomo Philadelphia.

Os objetivos específicos foram:

1. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica dos novos derivados triazólicos desprotegidos do ácido cafeico sintetizados pelo nosso grupo frente a linhagem LMC BCR-ABL+ K562;

2. Comparação da atividade citotóxica dos novos compostos com a atividade citotóxica do quimioterápico convencionalmente usado na rotina clínica oncológica da LMC, o imatinibe.

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1-Compostos testados

Dois novos derivados triazólicos do ácido cafeico sintetizados pelo grupo foram testados nas concentrações de 1 x 10^{-8} a 1 x 10^{-4}, na linhagem de LMC K562.

Os compostos foram sintetizados na Universidade Federal do Espírito Santo, Campus de Alegre, no interior do Estado do Espírito Santo, pelo professor Pedro Alves Bezerra Moraes e foram enviados ao laboratório na forma liofilizada em microtubos do tipo Eppendorf. Para sua utilização é necessário realizar um processo de diluição em Dimetilssulfóxido (DMSO – Neon Comercial, Suzano, SP).

- **Composto H46:**

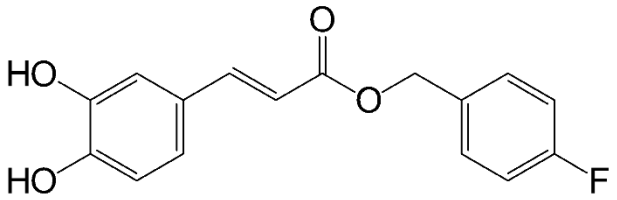

Figura 5: Composto H46

Nome IUPAC: (E)-4-fluorobenzil 3-(3,4-dihidroxifenil)acrilato
Peso Molecular: 288,27 g/mol

- **Composto H51:**

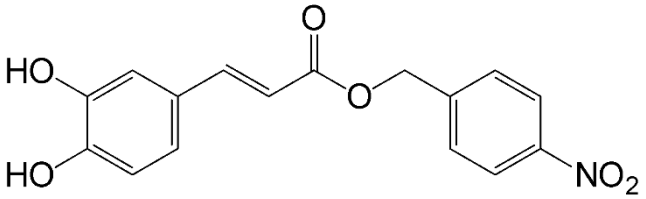

Figura 6: Composto H51.

Nome IUPAC: Composto H51: (E)-4-nitrobenzil 3-(3,4-dihidroxifenil)acrilato
Peso Molecular: 315,27 g/mol

O quimioterápico convencionalmente usado na rotina clínica oncológica da LMC, imatinibe (Figura 2), foi usado na linhagem testada para efeitos de comparação com a atividade dos novos compostos sintetizados.

3.2-Cultivo e manutenção de linhagem celular que expressa atividade aumentada de tirosinocinase

Foi utilizada a linhagem de LMC K562, adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro, que possui a translocação que resulta no gene híbrido BCR-ABL. Essa linhagem teve origem a partir de uma paciente de 53 anos com LMC em crise blástica terminal. São células de morfologia linfoblástica e não aderentes (BCRJ, 2021).

O cultivo foi feito em estufa a 37ºC e atmosfera de 5% de CO_2, que possibilita a manutenção da cultura em pH ótimo em torno de 7,2 a 7,4 através da seguinte reação de equilíbrio:

$$CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$$

Esse equilíbrio pode ser observado através da coloração do meio de cultura, que possui indicador vermelho de fenol, onde um pH mais ácido possui coloração laranja-amarelada até amarelo e um pH mais básico possui coloração roxa. O pH é também uma forma de indicar a presença de contaminação da cultura, além da turbidez, da morfologia e da redução da viabilidade celular.

As células foram mantidas em garrafas de cultura contendo meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (CRIPION, Andradina, SP, Brazil), que deve ser filtrado pois é uma potencial fonte de contaminação, 1% (v/v) de solução Penicilina-Estreptomicina (10000 u/mL – 10 mg/mL) e 0,5% (v/v) de Anfotericina B (250 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3.3-Ensaio de Viabilidade Celular Metabólica (VCM) *in Vitro*

As células foram plaqueadas na densidade de $5x10^5$ células/mL em placas de 96 poços. Foi realizado o tratamento das células, com os dois compostos e imatinibe nas concentrações: $1x10^{-4}$ mol/L, $1x10^{-5}$ mol/L, $1x10^{-6}$ mol/L, $1x10^{-7}$ mol/L e $1x10^{-8}$

mol/L e DMSO P.A. Alguns poços não receberam tratamento a fim de obtermos células sem tratamento para controle não tratado dos testes. As placas foram incubadas por 72h a 37ºC, em atmosfera de 5% de CO_2. Poços não receberam células, nem tratamento e foram utilizados como branco para calibrar o aparelho espectrofotômetro.

Após esse intervalo de incubação com os compostos supracitados, foi adicionado o reagente MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) a 5mg/mL e a realizada a incubação por 3h a 37°C.

Em seguida, a placa foi centrifugada, o sobrenadante removido e o reagente DMSO P.A. adicionado para solubilização dos cristais. A absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro de microplacas (Epoch 2 Biotek).

A absorbância foi lida a 540nm, sendo que as leituras de absorbância são proporcionais à quantidade de cristais formados, ou seja, à quantidade de células ainda viáveis após o teste.

3.4-Determinação das IC_{50} dos compostos testados

O cálculo estimado dos valores da concentração inibitória de 50% da proliferação celular (IC_{50}) foi realizado a partir da curva dose-resposta de cada composto testado, com valores normalizados, obtida através do ensaio de VCM descrito acima, com fins de comparação das potências entre os compostos testados. Os cálculos foram realizados com auxílio do software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Softaware, San Diego, CA, USA).

3.5-Análise Estatística

Para a análise estatística, realizada também por meio do software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Softaware, San Diego, CA, USA), os dados foram avaliados quanto as premissas de normalidade e homoscedasticidade; caso seguissem as premissas, o teste de Anova de uma via seguido do teste de comparação múltipla de Tukey foi realizado. Caso os dados não seguissem a premissa, foi realizado o teste não paramétrico correspondente, o ensaio de Kruskall-Wallis com pós teste de Dunn.

Para H46 então, foi realizado o ensaio de Kruskall-Wallis e o composto não provocou a redução significativa de VCM em K562. Para H51, foi realizado o ensaio de Anova de uma via, onde o composto provocou redução significativa quando comparado ao controle não tratado. Para o imatinibe não foi realizada a análise estatística, pois os dados representam médias e desvio padrão de apenas dois experimentos.

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaios de citotoxicidade ou viabilidade celular têm o objetivo de testar a atividade citotóxica de vários tipos de compostos em diferentes tipos celulares. O teste do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) é um teste colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular metabólica. (BERNHARD et al, 2003).

Desidrogenases mitocondriais, ativas apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, convertendo-o de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, chamado de formazan [E,Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan], que são cristais insolúveis em soluções aquosas. A formação deste produto colorido é, portanto, um marcador de viabilidade celular. No entanto, os tempos de incubação são longos (geralmente 4 horas) e é necessário adicionar um solubilizador antes de realizar a medição por colorimetria (BERNHARD et al, 2003).

Foram avaliadas as atividades citotóxicas, de dois compostos derivados do ácido cafeico desprotegidos, denominados H46 e H51, assim como do medicamento utilizado na primeira linha de tratamento da LMC, o mesilato de imatinibe.

Os resultados obtidos pelo ensaio de viabilidade celular metabólica pelo MTT, realizados com os compostos H46, H51 e com o mesilato de imatinibe, podem ser observados nos gráficos mostrados na figura 7 a seguir:

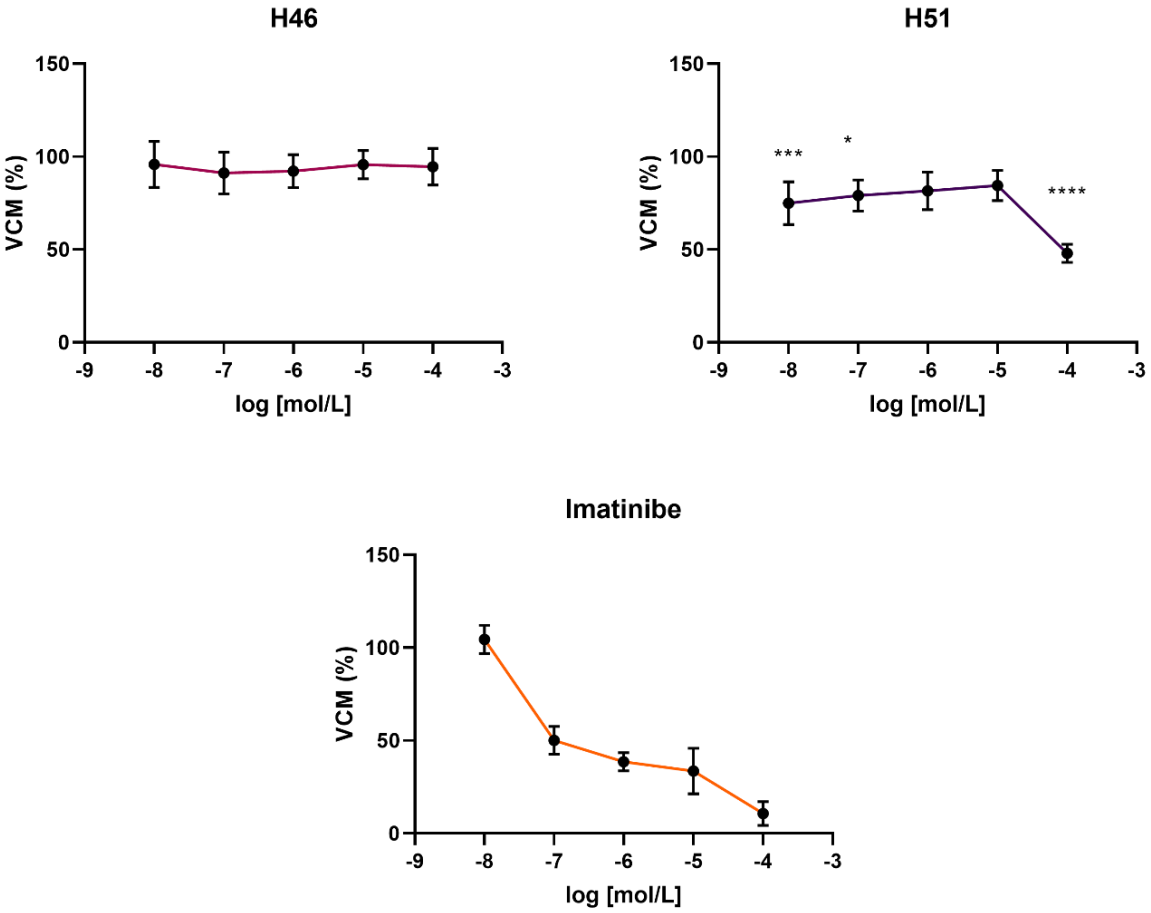

Figura 7: Viabilidade celular metabólica (VCM) da linhagem K562. Os gráficos representam a média e desvio padrão de experimentos independentes. Os dados foram analisados por teste de Anova de uma via com pós teste de Tukey ou por ensaio de Kruskall-Walli com pós teste de Dunn. *p< 0,05; ***p< 0,001; ****p< 0,0001 quando comparado com o grupo controle não tratado.

Como pode ser observado nos gráficos da figura 7, os compostos apresentaram diferentes comportamentos. O composto H46 não apresentou atividade citotóxica à linhagem K562, ao menos nas concentrações testadas, pois não provocou redução da VCM, alcançando 94,5% na concentração 1 x 10^{-4} mol/L. Porém, ainda de acordo com o gráfico, o composto H51 apresentou citotoxicidade de modo dose dependente, provocando a redução de VCM da linhagem a 48,1% na concentração de 1 x 10^{-4}mol/L. O mesilato de imatinibe provocou redução importante na VCM, chegando esta a aproximadamente 10% na concentração de 1x10^{-4} mol/L.

O composto H46 não obteve resultado significativo, entretanto, o composto H51 provocou redução de quase metade do número de células viáveis. O imatinibe provocou uma maior redução, o que já era esperado por se tratar de medicamento de primeira linha para o tratamento da LMC. Tendo em vista os resultados alcançados pelos dois compostos inéditos testados, pode-se constatar que um deles foi ineficaz dentro das concentrações testadas enquanto o outro apresentou melhores resultados.

A tabela 3 demonstra os valores de IC_{50} estimados em *software* GraphPad Prism. O composto H46 apresentou IC_{50} de 1,58 x 10^{-3}mol/L enquanto o composto H51 apresentou 8,25 x 10^{-5}mol/L e o imatinibe apresentou 2,24 x 10^{-7}mol/L.

Tabela 3: IC_{50} estimada do quimioterápico imatinibe e dos compostos H46 e H51 sobre a linhagem celular K562.

Composto	IC_{50} (mol/L)
H46	1,58 x 10^{-3}
H51	8,23 x 10^{-5}
Imatinibe	2,24 x 10^{-7}

De acordo com a Tabela 3, o composto H46 apresentou o maior valor de IC_{50}, o que torna esse composto menos potente do que o composto H51, já que é necessária uma maior concentração da substância para inibir a viabilidade metabólica de 50% das células.

O imatinibe, como esperado por ser a droga de escolha para o tratamento da LMC, se mostrou mais potente que os compostos inéditos, já que apresentou o menor valor de IC_{50}, ou seja, com uma menor concentração do fármaco se obtém inibição de viabilidade de metade da população celular.

Como o composto H46 (Figuras 5 e 8) apresenta apenas o grupamento fluorobenzil como diferença em relação ao composto H51(Figuras 6 e 9), que possui o grupamento nitrobenzil e apresentou melhores resultados, é um indicativo de que o composto halogenado perde sua ação medicamentosa, ao menos dentro das concentrações que foram testadas.

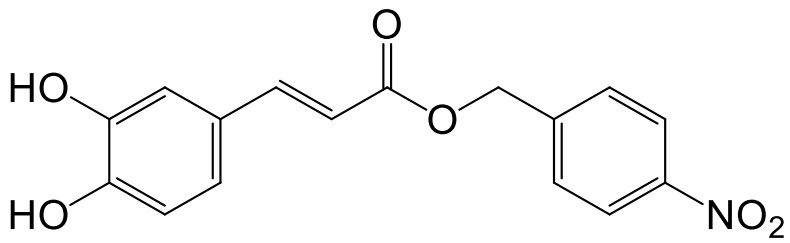

Figura 8: Composto H46: (E)-4-fluorobenzil 3-(3,4-dihidroxifenil)acrilato

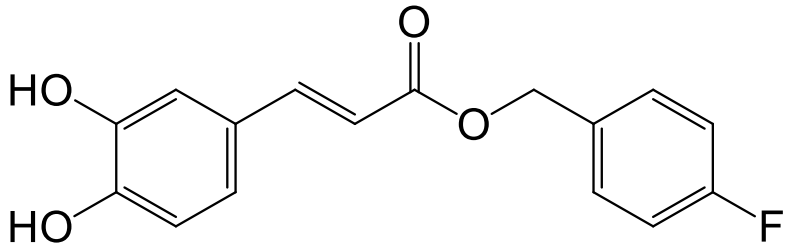

Figura 9: Composto H51: (E)-4-nitrobenzil 3-(3,4-dihidroxifenil)acrilato

Ácidos fenólicos foram avaliados por Feriotto et al (2021), através da viabilidade celular por MTT em linhagem K562, e o ácido cafeico foi o que demonstrou melhor efeito, com IC_{50} = 38µM, enquanto os outros, como o ácido ferúlico, ácido chicórico, ácido neoclorogênico, produziram efeitos desprezíveis e foram considerados inativos na faixa de concentração testada. A molécula de ácido ferúlico, que possui estrutura semelhante à do ácido cafeico (Figura 10), tendo como diferença apenas uma substituição no anel aromático de uma hidroxila por uma metoxila, foi utilizada como controle negativo e o controle positivo foi o imatinibe, com IC_{50} = 0,18µM. Com isso, pode-se observar a importância do grupo catecol na ação farmacológica dos ácidos fenólicos.

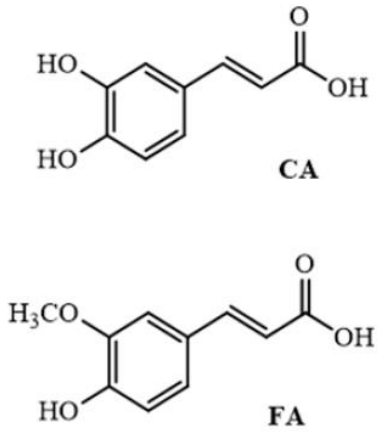

Figura 10: Diferença estrutural entre o ácido cafeico(CA) e o ácido ferúlico(FA) (FERIOTTO et al, 2021).

Estudos realizados por Sanderson et al (2013), utilizando 19 derivados sintéticos do ácido cafeico, mostraram que 16 deles reduziram a viabilidade celular de células LNCaP, uma linhagem de células de câncer de próstata, de forma dependente de concentração, incluindo o CAPE, éster fenetílico do ácido cafeico. Sete desses derivados sintéticos apresentaram IC_{50} menor que CAPE, e a maioria deles, provocou redução acima de 80% na viabilidade celular. Também foram testados 16 derivados sintéticos do ácido cafeico no crescimento celular em LNCaP e 12 deles promoveram redução na taxa de crescimento celular. A porção catecol e o substituinte na porção éster se mostraram essenciais na atividade antioxidante. Os efeitos citotóxicos dos derivados sintéticos do ácido cafeico não seguem o mesmo padrão de estrutura-atividade, com potências citotóxicas e antiproliferativas diferentes. Fatores estéricos e interação tridimensional desempenham importante papel nesses efeitos. Há uma relação entre hidrofobicidade e citotoxidade, mas não é o suficiente para demonstrar o mecanismo de ação desses derivados.

A fim de investigar seu uso como agente quimioterápico, Touaibia et al (2011), investigaram o ácido cafeico e derivados do CAPE em linhagens de células HeLA, de colo do útero, MDA-MB-231, de câncer de mama, MOLT-3, de leucemia linfoblástica e L-132, de fibroblastos não neoplásicos de tecido pulmonar embrionário humano. Foi observado que o comprimento da cadeia carbônica entre o anel aromático e o grupo carboxila, junto à dupla ligação, afetam a atividade neoplásica de formas diferentes. O comprimento da cadeia carbônica foi diferencial nas propriedades anti-proliferativas. O CAPE exerce efeito antioxidante no nível transcricional, inibindo NF-κB, reduzindo a expressão de genes pró-inflamatórios, eliminando radicais livres, quelando íons metálicos e inibindo enzimas que induzem a formação de radicais livres ou peroxidação lipídica. Com base nessas ações, tem-se explorado a síntese de ácido cafeico e análogos de CAPE em busca de uma molécula antioxidante de alta eficiência.

5-CONCLUSÃO

Diante dos resultados observados, conclui-se que ainda há um caminho a ser percorrido na pesquisa do nosso grupo para encontrar um medicamento compatível com a ação citotóxica do mesilato de imatinibe para o tratamento da LMC.

Foi observada uma menor potência do composto H46 e uma potência e efeito melhores com o composto H51. Diante dos experimentos realizados pode-se observar que qualquer mudança de substituinte realizada na estrutura dos compostos é importante tanto para aumentar, como para reduzir a sua potência ou eficácia. Cabe agora ao nosso grupo buscar substituintes que possam levar ao aumento dessa potência ou eficácia.

Essa pesquisa é importante pois representa um passo inicial para descoberta de novos medicamentos para LMC que atuem sobre mecanismos diferentes dos ITKs. Isso possibilita contornar os efeitos adversos causados por esses medicamentos a fim de que os pacientes possam ter uma melhor qualidade de vida e uma melhor adesão ao tratamento.

Esses novos medicamentos, podem tornar-se, após melhorias nas suas estruturas químicas e novos testes, novas opções terapêuticas.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRALE. Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia. Disponível em: https://www.abrale.org.br/doencas/o-que-e-cancer/ Acessado em setembro de 2020.

AN, Xin et al. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: A review. **Elsevier**. Volume 34, p. 1255-1268, abril de 2010.

ANVISA - **RDC nº 9, de 20 de fevereiro de 2015**. Disponível em < Ministério da Saúde (anvisa.gov.br) >, Acesso em julho de 2021.

BANCO DE CÉLULAS DO RIO DE JANEIRO(BCRJ), disponível em < K-562 | APABCAM (bcrj.org.br) > Acesso em agosto de 2021.

BERDIGALIYEV, Nurken, ALJOFAN, Mohamad. An overview of drug discovery and Development. **Future Medicine Chemistry.** Kasaquistão, 2020.

BERNHARD, David et al. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. **Cancer letters**, v. 195, n. 2, p. 193-199, 2003.

BOUDREAU, L. H. et al. Caffeoyl and cinnamoyl clusters with anti-inflammatory and anti-cancer effects. Synthesis and structure–activity relationship. **New Journal of Chemistry**, v. 33, n. 9, p. 1932-1940, 2009.

CUELLAR, Sandra. BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leucemia. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**, Chicago, abril de 2017.

ESPÍNDULA, Kaio et al. Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma. **Frontiers in Oncology.** Volume 9, junho de 2019.

FANE, Mitchell, WEERARATNA, Ashani. How the ageing microenvironment influences tumour progression. **Nature.** Volume 20, fevereiro de 2020. Filadélfia, EUA. Disponível em < https://doi.org/10.1038/s41568-019-0222-9 > Acessado em novembro de 2020.

FERIOTTO, Giordana et al. Caffeic Acid Enhances the Anti-Leukemic Effect of Imatinib on Chronic Myeloid Leukemia Cells and Triggers Apoptosis in Cells Sensitive and Resistant to Imatinib. **International Journal of Molecular Sciences**. Suíça, fevereiro de 2021.

GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman.** 12 ed. São Paulo: AMGH Editora Ltda, 2012.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Revista Estudos Avançados**. São Paulo, v.24, n.70, p.81-98, 2010.

GUSTAVO, L. **Carta Molecular: O Centro de Genoma Compartilhamento de informações nº 37.** Disponível em:< www.cartamolecular.com > Acessado em julho de 2021.

HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, P. A. H. Fundamentos em hematologia. In: **Fundamentos em hematologia**, p. 192-193, 2013.

HUANG, Xianbo. The molecular mechanisms underlying BCR/ABL degradation in chronic myeloid leukemia cellspromoted by Beclin1-mediated autophagy. **Cancer Management and Research**. Volume 11, p 5197–5208, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Definição: Leucemia**. 2018. Disponível em < http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/definicao> Acessado em setembro de 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2021 de Incidência de Câncer no Brasil. **Ministério da Saúde.** Disponível em < Estatísticas de câncer | INCA - Instituto Nacional de Câncer > Acessado em agosto 2021.

JIAO, Qinlian. Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. **BioMed Central.** China, 2018.

LINEV, Alexandar. Mutations Associated with Imatinib Mesylate Resistance – Review. **Folia Med**. Volume 60, p. 617-623, 2018.

MASSARO, Fulvio. Novel tyrosine-kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukemia: safety and efficacy. **Expert Review of Hematology.** Roma, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Portaria nº 1219 de 04 de novembro de 2013:** Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Leucemia Mieloide Crônica do Adulto. Disponível em < https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt1219_04_11_2013.html > Acesso em março de 2020.

OLGEN, Sureyya, KOTRA, Lakshmi. Drug Repurposing in the Development of Anticancer Agents. **Bentham Science**. Canadá, Volume 26, p. 5410-5427, 2018.

PAGNANO, K. B. B. Leucemia Mielóide Crônica – Causas de falha do tratamento com mesilato de imatinibe. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.** Campinas, SP, Vol. 30, Supl. 1, p. 22-26, 2008.

PUSHPAM, Deepam; BAKHSHI, Sameer. Pharmacology of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia; a clinician's perspective. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**. Suíça, 2020.

RABIAN, Florence; LENGLINE, Etienne; REA, Delphine. Towards a Personalized Treatment of Patients with Chronic Myeloid Leukemia. **Springer Link**. França, 2019. Disponível em < https://link.springer.com/article/10.1007/s11899-019-00546-4 > Acessado em julho de 2021.

SANDERSON, J. T. et al. Antiproliferative, antiandrogenic and cytotoxic effects of novel caffeic acid derivatives in LNCaP human androgen-dependent prostate cancer cells. **Elsevier**. Canadá, Volume 21, p. 7182-7193, 27 de agosto de 2013

SILVA, Tiago; OLIVEIRA, Catarina; BORGES, Fernanda. Caffeic acid derivatives, analogs and applications: a patent review**. Expert Opinion**, Porto, p. 11-24, 2014.

STEEGMANN, JL et al. European LeukemiaNet recommendations for the management and avoidance of adverse events of treatment in chronic myeloid leukaemia. **Nature**. Madri, 3 jun 2018. Volume 30, p. 1648-1671. Disponível em < https://www.nature.com/articles/leu2016104 > Acesso em julho de 2021.

TSAI, Yu-Fen et al. Side effects and medication adherence of tyrosine kinase inhibitors for patients with chronic myeloid leukemia in Taiwan. **Medicine.** EUA, 2018.

TOUAIBIA, M., JEAN-FRANÇOIS, J., DOIRON, J. Caffeic Acid, A Versatile Pharmacophore: An Overview. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.** Canadá, 2011. Volume 11, p. 695-713.

ZHANG, et al. Bioactivity and Chemical Synthesis of Caffeic Acid Phenethyl Ester and Its Derivatives. **Journal Molecules**. Volume 19, p. 16458 – 16476. Disponível em < Molecules | An Open Access Journal from MDPI > Acessado em março de 2021.