

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CORRELAÇÃO ENTRE CITOTOXICIDADE,
ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS E ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS TRIAZENOS
EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jacqueline Nunes Rodrigues

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

**CORRELAÇÃO ENTRE CITOTOXICIDADE, ALTERAÇÕES
CROMOSSÔMICAS E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE
COMPOSTOS TRIAZENOS EM CÉLULAS DE MEDULA
ÓSSEA**

Jacqueline Nunes Rodrigues

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal
de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial
para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosmari Hörner
Co-orientadora: Dr^a. Virgínia Maria Cóser**

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Rodrigues, Jacqueline Nunes
CORRELAÇÃO ENTRE CITOTOXICIDADE, ALTERAÇÕES
CROMOSSÔMICAS E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS
TRIAZENOS EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA / Jacqueline Nunes
Rodrigues.-2013.
107 p.; 30cm

Orientadora: Rosmari Hörner
Coorientadora: Virgínia Maria Cóser
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2013

1. Triazenos 2. MTT 3. Citotoxicidade 4. Leucemia 5.
Citogenética I. Hörner, Rosmari II. Cóser, Virgínia Maria
III. Título.

© 2013

Todos os direitos autorais reservados a Jacqueline Nunes Rodrigues. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
E-mail: j.nunes.husm@hotmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**CORRELAÇÃO ENTRE CITOTOXICIDADE, ALTERAÇÕES
CROMOSSÔMICAS E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE
COMPOSTOS TRIAZENOS EM CÉLULAS
DE MEDULA ÓSSEA**

elaborada por
Jacqueline Nunes Rodrigues

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a Dr^a. Rosmari Hörner (UFSM)

Co-orientadora: Dr^a. Virgínia Maria Cóser (UFSM)

Prof^a. Dr^a. Luciane Noal Calil (UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Marta Maria Medeiros Frescura Duarte (ULBRA)

Santa Maria, 23 de agosto de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Programa de Pós Graduação de Ciências Farmacêuticas da UFSM, seus professores e funcionários, pela oportunidade da realização deste trabalho.

À Profª Drª Rosmari Hörner, minha orientadora, pela confiança em mim depositada, pelo acompanhamento e disponibilidade, pelos ensinamentos transmitidos, pelo exemplo ético e profissional, pela sua amizade, meu sincero agradecimento.

À Drª Virginia Maria Cóser, minha co-orientadora, agradeço pela amizade e constante incentivo, pelos conselhos e companheirismo, pelo conhecimento e criteriosa revisão dos cariótipos.

Ao Prof. Dr. Manfredo Hörner e ao doutorando Gustavo Luiz Paraginski, do Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos do Curso de Química desta Universidade, agradeço pelos conhecimentos transmitidos, síntese e caracterização dos compostos estudados.

Aos meus colegas do Laboratório de Hematologia-Oncologia, agradeço pela colaboração e apoio, em especial à acadêmica Francienne Beche Pereira, estagiária e bolsista, que esteve sempre ao meu lado contribuindo na condução das técnicas de citogenética.

Às minhas colegas de mestrado, Valússia, Maísa, Cláudia, Liliana, Silvana, Lívia, Mônica e Rosiéli, pelo companheirismo e amizade, em especial às acadêmicas do Curso de Farmácia Thaíse, Melise e Litiérri, hoje colegas, pela contribuição nos ensaios MTT e CIM dos compostos.

À minha família, aos meus pais João Pedro e Nelly, esposo Jorge e filha Viviane, pelo imenso amor, carinho, incentivo, compreensão e paciência, meu especial agradecimento.

Ao CNPq pelo suporte e apoio financeiro.

*Se alguém quer realmente buscar a verdade,
não deve escolher uma ciência particular;
elas estão todas unidas e dependem
umas das outras.*

(Descartes)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

CORRELAÇÃO ENTRE CITOTOXICIDADE, ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS TRIAZENOS EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA

AUTORA: JACQUELINE NUNES RODRIGUES

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a. ROSMARI HÖRNER

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 23 de agosto de 2013.

As leucemias formam um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas. O tratamento destas neoplasias vem sendo um desafio à comunidade científica devido à diversidade genética nas células leucêmicas. Alterações cromossômicas adquiridas e modificações da expressão gênica estão envolvidas na gênese das leucemias. Isto tem estimulado o interesse no desenvolvimento de novos agentes quimioterapêuticos eficazes que atinjam alvos moleculares específicos. Os compostos da classe triazeno, tais como a dacarbazina e temozolomida, têm sido usados no tratamento clínico de diversos tipos de câncer, incluindo glioma, leucemia e melanoma. Dois novos compostos triazenos complexados com cobre (CuII) foram sintetizados com o objetivo de identificar novos agentes com atividade antiproliferativa e antibacteriana. Os compostos **1** - Bis[1,3-bis(2-clorofenil)triazenido- $\kappa N^{11}, N^{13}$ - μ -O-metóxi-piridina- κN -cobre(II)] - $C_{36}H_{34}N_8O_3Cl_4Cu_2$ e **2**- Bis[1,3-bis(2-fluorfenil)triazenido- $\kappa N^{11}, N^{13}$ - μ -O-hidróxi-piridina- κN -cobre(II)] - $C_{36}H_{34}N_8O_3F_4Cu_2$ foram testados em células leucêmicas de LMA, LLA, LMC e SMD *in vitro* pelo teste colorimétrico MTT. O composto **1** apresentou melhor atividade citotóxica frente à maioria dos tipos celulares avaliados neste estudo (IC₅₀: de 3,8 a 28,6 μ M) especialmente em células com alterações cromossômicas. Este composto ainda apresentou citotoxicidade em células de recidiva de LLA com alterações cariotípicas. Ressaltamos que sua atividade citotóxica foi significativamente mais elevada em células leucêmicas do que em células normais. Os valores de CIM demonstraram que o composto **1** apresentou maior atividade antibacteriana que o composto **2**, apresentando atividade de estreito espectro frente a cepas bacterianas gram positivas ATCCs e multirresistentes. Observou-se que o composto **1** foi mais promissor em relação ao potencial antiproliferativo do que ao potencial antibacteriano, inclusive quando comparado a agentes antineoplásicos como o etoposide. Estudos adicionais para melhor compreensão do mecanismo de ação deverão ser desenvolvidos.

Palavras-chave: Triazenos. MTT. Citotoxicidade. Leucemia. Citogenética.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Universidade Federal de Santa Maria

CORRELATION BETWEEN CYTOTOXICITY, CHROMOSOMAL ABNORMALITIES AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF TRIAZENES COMPOUNDS IN BONE MARROW CELLS

AUTHOR: JACQUELINE NUNES RODRIGUES

ADVISER: Prof^a. Dr^a. ROSMARI HÖRNER

Presentation date: Santa Maria, Aug 23rd, 2013.

Leukemias are a heterogeneous group of hematologic malignancies. The treatment of these neoplasms has been a challenge to the scientific community due to genetic diversity in leukemic cells. Acquired chromosomal abnormalities as well as modifications of gene expression are involved in the genesis of leukemia. Such facts have increased interest in the development of new effective chemotherapeutic agents that reach specific molecular targets. The compounds of the triazene class like dacarbazine and temozolomide have been used in the clinical treatment of various cancer types, including melanoma, leukemia and glioma. Two new compounds triazenes complexed with copper (CuII) were synthesized to identify new agents with antiproliferative and antibacterial activity. The Compounds **1** - Bis [1,3-bis (2-chlorofenyl) triazenido- $\kappa N^{11}, N^{13}$ - μ -O-methoxy-pyridine- κN -copper(II)] - $C_{36}H_{34}N_8O_2Cl_4Cu_2$ and **2** - Bis [1,3-bis (2-fluorfenyl) triazenido- $\kappa N^{11}, N^{13}$ - μ -O-hidroxy-pyridine- κN -copper(II)]- $C_{34}H_{28}N_8O_2F_4Cu_2$ were tested in leukaemic cells from AML, ALL, CML and MDS in vitro by MTT colorimetric assay. A higher-capacity of antiproliferative was verified in compound **1** with cytotoxicity (IC_{50} : 3.8 to 28.6 μM) in most cell types at diagnosis, particularly in cells with chromosome abnormalities. This compound also showed in vitro cytotoxicity of relapse of ALL cells with karyotypic alterations. The cytotoxic activity was significantly higher in leukemic cells than in normal cells. The MIC values showed that compound **1** had higher activity than compound **2**, showing narrow spectrum antibacterial activity against gram positive ATCCs and multiresistant bacterial strains. It was observed that Compound **1** was more promising in relation to the antiproliferative potential than the antimicrobial activity, even when compared to antineoplastic agents such as etoposide. Additional studies to understand the mechanism of action will soon be developed.

Keywords: Triazenes. MTT. assay. Cytotoxicity. Leukemia. Cytogenetics.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular dos agentes antineoplásicos alquilantes dacarbazina (1), temozolomida (2) e diminazeno (3)	21
Figura 2 – Estrutura molecular da cisplatina	23
Figura 3 – Versatilidade dos compostos triazenos	24
Figura 4 – Estrutura molecular do composto 1	45
Figura 5 – Estrutura molecular do composto 2	45
Figura 6 – Método para análise citogenética	48
Figura 7 – Cariótipo (caso 21): 46,XY,del(16)(q23)	
Figura 8 – Viabilidade celular de células mieloides de MO (caso 21) frente a diferentes concentrações dos compostos 1 , 2 e antineoplásicos etoposide, carboplatina, vinorelbine e daunorrubicina pelo ensaio MTT	62
Figura 9 – Cariótipo (caso 20): 46,XX	
Figura 10 – Viabilidade celular de células linfoides de MO (caso 20) frente a diferentes concentrações dos compostos 1 , 2 e antineoplásico etoposide pelo ensaio MTT	63
Figura 11 – Cariótipo (caso 19): 48,XY,+8,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)	
Figura 12 – Viabilidade celular de células mieloides de MO de LMC (caso 19) frente a diferentes concentrações dos compostos 1 , 2 e antineoplásico etoposide pelo ensaio MTT	64
Figura 13 – Cariótipo (caso 14): 45,XX,-10	
Figura 14 – Viabilidade celular de células linfoides de MO (caso 14) frente a diferentes concentrações dos compostos 1 e 2 pelo ensaio MTT	66
Figura 15 – Cariótipo (caso 6): mn(40~44)[14]/mn(70~80)[09]/mn(81~87)[02]	
Figura 16 – Viabilidade celular de células de SMD de MO (caso 6) frente a diferentes concentrações dos compostos 1 e 2 pelo ensaio MTT	67
Figura 17 – Cariótipo (caso 8): 44~45,XY,del(4)(q24),-7[5],-15[9]-16[4],-18[8],+r[7],+mar[6][cp10]	
Figura 18 – Viabilidade celular de células mieloides de MO (caso 8) frente a diferentes concentrações dos compostos 1 e 2 pelo ensaio MTT	69
Figura 19 – Cariótipo (caso 2): 46,XX	
Figura 20 – Viabilidade celular de células mononucleares normais de MO (caso 2) frente a diferentes concentrações dos compostos 1 e 2 pelo ensaio MTT	70

LISTAS DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação FAB das leucemias mieloides agudas.....	28
Quadro 2 – Classificação OMS das leucemias mieloides agudas	29
Quadro 3 – Classificação das LLA baseada em alguns marcadores diferenciais	30
Quadro 4 – Classificação das principais drogas utilizadas em hematologia-oncologia quanto a especificidade no ciclo celular, fases no ciclo celular, classe e função	31
Quadro 5 – Principais anomalias cromossômicas na LMA	39
Quadro 6 – Principais anomalias cromossômicas na LLA	41
Quadro 7 – Perfil de sensibilidade dos isolados clínicos MDRs.....	51
Quadro 8 – Perfil das amostras, citogenética, viabilidade celular e IC ₅₀	54

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 – Análise descritiva dos dados do perfil das amostras estudadas	55
Tabela 2 – Análise comparativa dos compostos e concentração em relação à viabilidade celular (%) e IC ₅₀ (µM) com os cariótipos analisados	57
Tabela 3 – Comparação da citotoxicidade (IC ₅₀) em relação aos diferentes tipos de leucemia.....	58
Tabela 4 – Análise da viabilidade celular frente ao composto 1 nas diferentes concentrações 12.5, 50 e 100 µM, utilizando o teste t-pareado	58
Tabela 5 – Análise da viabilidade celular frente ao composto 2 nas diferentes concentrações 12.5, 50 e 100 µM, utilizando-se o teste t-pareado	59
Tabela 6 – Comparação entre os compostos 1 e 2 nas diferentes concentrações ..	59
Tabela 7 – Análise da viabilidade celular e IC ₅₀ dos compostos 1 e 2 em relação ao <i>status</i> : diagnóstico x recidiva.....	61
Tabela 8 – Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> dos compostos triazenos 1 e 2 frente a cepas bacterianas ATCCs.....	71
Tabela 9 – Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> dos compostos triazenos 1 e 2 frente a isolados clínicos MDRs	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	– <i>American Type Culture Collection</i>
CBM	– Concentração bactericida mínima
CCNE	– Centro de Ciências Naturais e Exatas
CGH	– Hibridização genômica comparativa
CIM	– Concentração inibitória mínima
CLSI	– <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
DNMT	– DNA metil-transferases
DO	– Densidade óptica
DRM	– Doença residual mínima
FAB	– Franco-Americano-Britânico, <i>French-American-British</i>
FISH	– Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
μg	– Micrograma
GBTLI	– Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância
HDAC	– Histona desacetilases
HUSM	– Hospital Universitário de Santa Maria
IC ₅₀	– Concentração que inibe 50% do crescimento celular
ISCN	– <i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>
μL	– Microlitro
LA	– Leucemia aguda
LLA	– Leucemia linfóide aguda
LMA	– Leucemia mieloide aguda
LMC	– Leucemia mieloide crônica
μM	– Micromolar
MDR	– Resistência a múltiplas drogas
MDR	– Resistentes a múltiplos antimicrobianos
MGMT	– Metilguanina-DNA metil transferase
MO	– Medula óssea

MRC	– <i>Medical Research Council</i>
MTT	– Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5- difeniltetrazolio
NITriCo	– Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos
OMS	– Organização Mundial da Saúde
PCR	– Reação em cadeia da polimerase
Pgp	– Glicoproteína P
RPMI 1640	– <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SMD	– Síndrome Mielodisplásica
TKI	– Inibidor de tirosinoquinase
TZC	– Triazenos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1 Triazenos.....	20
3.2 Química de coordenação, química bioinorgânica e química medicinal	23
3.3 Leucemias agudas	26
3.3.1 Leucemia mieloide aguda.....	27
3.3.2 Leucemia linfóide aguda.....	29
3.3.3 Tratamento das leucemias agudas	30
3.3.3.1 Tratamento da LMA.....	33
3.3.3.2 Tratamento da LLA.....	34
3.4 Leucemia mieloide crônica.....	35
3.5 Citogenética das leucemias	36
3.5.1 Citogenética da LMA	37
3.5.2 Citogenética da LLA	40
3.6 Infecções bacterianas: multirresistência aos antimicrobianos	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Caracterização da amostra.....	44
4.2 Compostos Triazenos	44
4.3 Separação de células mononucleares.....	46
4.4 Teste de viabilidade celular.....	46
4.5 Avaliação da citotoxicidade em células leucêmicas <i>in vitro</i>	46
4.5.1 Determinação da IC ₅₀	47
4.6 Análise citogenética das amostras de medula óssea	47
4.7 Análise estatística	49
4.8 Avaliação da atividade antibacteriana <i>in vitro</i>	49
4.8.1 Cepas bacterianas	50
4.8.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	52
4.9 Considerações Éticas	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Avaliação da atividade citotóxica dos compostos 1 e 2.....	53
5.1.1 Comparação da atividade citotóxica dos compostos 1 e 2 com antineoplásicos em relação aos tipos celulares testados.	61

5.1.2 Avaliação da atividade citotóxica dos compostos 1 e 2 em células leucêmicas de LLA, LMA, LMC, SMD e células mononucleares normais.....	64
5.2 Avaliação da atividade antibacteriana dos compostos 1 e 2	71
CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS.....	75
Apêndice 1 – Termo de confidencialidade.....	86
Apêndice 2 – Manuscrito	87

1 INTRODUÇÃO

As leucemias são grupos heterogêneos de neoplasias hematológicas, que resultam da transformação total ou parcial das células da medula óssea. Vários critérios, dentre eles a morfologia, a citoquímica, a imunofenotipagem e a detecção de alterações genéticas constituem a base para classificação das neoplasias hematológicas (BAIN, 1998; FUTREAL et al., 2004; ZERBINI et al., 2011). As análises citogenéticas e moleculares permitem uma definição mais precisa no diagnóstico das leucemias, possibilitam a detecção de alterações cromossômicas e mutações gênicas das células leucêmicas. Além disso, permitem correlacionar com o diagnóstico, a classificação, a caracterização de diferentes estágios, a avaliação da remissão e o prognóstico destas enfermidades (FETT-CONTE et al., 2000; PEREIRA, 2006; POMBO-DE-OLIVEIRA, 2008).

As anormalidades genéticas que ocorrem nas leucemias podem ser divididas em duas principais categorias: aquelas que incluem alterações cromossômicas estruturais, principalmente translocações e inversões, e aquelas associadas às alterações de expressão gênica. As translocações cromossômicas resultam da mudança de posição de um gene ou de um fragmento gênico para uma diferente região cromossômica, resultando em genes quiméricos com funções aberrantes (FITZGERALD; MORRIS, 1992; BAIN, 1998; LOBO, 2008).

Anormalidades citogenéticas são identificadas em 60 a 80% dos casos de leucemia mieloide aguda (LMA) e aproximadamente em 80% dos casos de leucemia linfóide aguda (LLA), incluindo tanto anormalidades numéricas quanto estruturais (HRUSAK; PORWIT-MACDONALD, 2002; VELLOSO et al., 2011). A caracterização da leucemia mieloide crônica (LMC) pode ser baseada na morfologia das células e/ou no cariótipo, enquanto que nas leucemias linfóides crônicas é baseada nas características morfológicas e imunofenotípicas (ROONEY; CZEPULKOWSKI, 1992; ZEBRINI et al., 2011).

Os fármacos usados no tratamento do câncer, tanto de origem sintética como natural, foram descobertos a partir de testes em animais (CHABNER; ROBERTS, 2005). Esta descoberta ocorreu entre as décadas de 1950 e 1970, e a forma de ação destes fármacos se dá através de interação com o ácido desoxirribonucléico

(DNA) inibindo a síntese de material genético ou causando algum dano irreparável. Novos agentes naturais, como o paclitaxel, e semi-sintéticos, como o etoposide, foram descobertos e seu mecanismo de ação ocorre através da atuação no processo de proliferação celular. Esta descoberta acabou incentivando estudos sobre a inibição de novos alvos moleculares (LAZO; PARKER, 2006).

Os fármacos utilizados no tratamento do câncer podem ser divididos em agente ciclo-celular específicos ou ciclo-celular não específicos de acordo com o seu mecanismo de ação (RAJSKI; WILLIAMS, 1998). Dentre os ciclo-celular específicos estão os agentes antimetabólitos, agentes hormonais, produtos naturais e enzimas; os agentes ciclo-celular não específicos se dividem em produtos naturais, análogos da platina e agentes alquilantes (LAZO; PARKER, 2006; KATZUNG, 2010). Entre os agentes alquilantes temos os triazenos (TZC) que são compostos de cadeia aberta que contêm três átomos de nitrogênio interligados em sequência (N=NN) (HORNER et al., 2004). Os TZC são representados por compostos como a dacarbazina e a temozolamida que são usados na prática clínica como antitumorais, sendo o grupo triazeno o responsável por suas propriedades farmacológicas (MARCHESI et al., 2007). Os TZC possuem atividade biológica comprovada, inclusive atividade antibacteriana, contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (PARAGINSKI et al., 2006). A dacarbazina e a temozolamida são usadas para o tratamento de tumores metastáticos no cérebro e outras neoplasias sólidas. Estes dois compostos também possuem atividade antineoplásica em pacientes com leucemia (CAPORASO et al., 2007), logo, os TZC podem constituir uma classe de agentes antineoplásicos para o tratamento das leucemias sendo eficientes contra a forma refratária da doença, ou seja, quando o paciente não responde aos tratamentos convencionais

A citotoxicidade dos compostos TZC vem sendo intensamente estudada devido ao conhecimento de que suas ações possam interferir na proliferação das células, resultando então, na descoberta de novos agentes antitumorais de grande importância. Assim, considerando a atividade biológica dos compostos TZC e a importância da relação entre diferentes alterações citogenéticas para o desenvolvimento de futuros fármacos que atinjam alvos moleculares específicos, este estudo busca avaliar a capacidade citotóxica que compostos triazenos inéditos possam ter sobre as células leucêmicas com distintos tipos de aberrações cromossômicas.

A descoberta de novos agentes quimioterápicos com toxicidade reduzida e máxima atividade contra as células tumorais, principalmente leucemias agudas ou que não respondem mais aos tratamentos instituídos, são de grande interesse para a medicina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade dos compostos TZC inéditos em produzir citotoxicidade frente a células leucêmicas com a presença ou ausência de alterações cromossômicas, bem como, investigar a atividade antibacteriana destes compostos frente a diversas espécies bacterianas comumente envolvidas em infecções hospitalares.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade dos compostos TZC **1** - Bis[1,3-bis(2-clorofenil)triazenido-κN¹¹,N¹³-μ-O-metóxi-piridina-κN-cobre(II)] e **2**- Bis[1,3-bis(2-fluorfenil)triazenido-κN¹¹,N¹³-μ-O-hidróxi-piridina-κN-cobre(II)] frente a células de LLA, LMA, LMC, bem como células mononucleares normais de medula óssea, pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).
- Verificar a presença de alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais nas células de medula óssea utilizando a técnica de citogenética convencional.
- Relacionar as alterações cromossômicas encontradas com o grau de sensibilidade das células submetidas a atividade citotóxica dos compostos triazenos.
- Comparar a atividade citotóxica dos compostos **1** e **2** com alguns fármacos antineoplásicos de uso clínico como: carboplatina, etoposide, vinorelbine e daunorrubicina em células leucêmicas.
- Determinar a atividade antibacteriana dos compostos em estudo frente a cepas bacterianas padrão de referência *American Type Culture Collection*

(ATCC), e frente a bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos, isoladas de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Triazenos

Os TzC são compostos que se caracterizam pela presença do grupo diazoamina (-N=N-N-) e são de grande interesse devido a sua atividade biológica ser bem conhecida, principalmente na terapia anticâncer (KIMBALL; HERGES; HALEY, 2002). Em 1956, pesquisadores já tinham o conhecimento de que estes compostos eram ativos contra alguns tipos de leucemia para as quais havia resistência aos tratamentos convencionais da época (BURCHENAL et al., 1956).

O primeiro TzC comercialmente utilizado foi o 5-(3,3-dimetil-1-triazeno)imidazol-4-carboxiamida conhecido como dacarbazina que foi sintetizado na década de 1960 por Shealy et al. (SHEALY; KRAUTH; MONTGOMERY, 1962). Logo depois surgiu a temozolamida (3-metil-4-oxo-3,4-dihidroimidazol[5,1-d][1,2,3,5]tetrazina-8-carboxiamida), outro composto também utilizado na terapia contra o câncer (BROCH, 2008). O diminazeno (Berenil[®]), [1,3-Bis (4'-amidofenil)triazeno], é outro TzC que tem ação tripanossomicida e leishmanicida e é muito utilizado para tratar animais domésticos (PEREGRINE; MAMMAN, 1993).

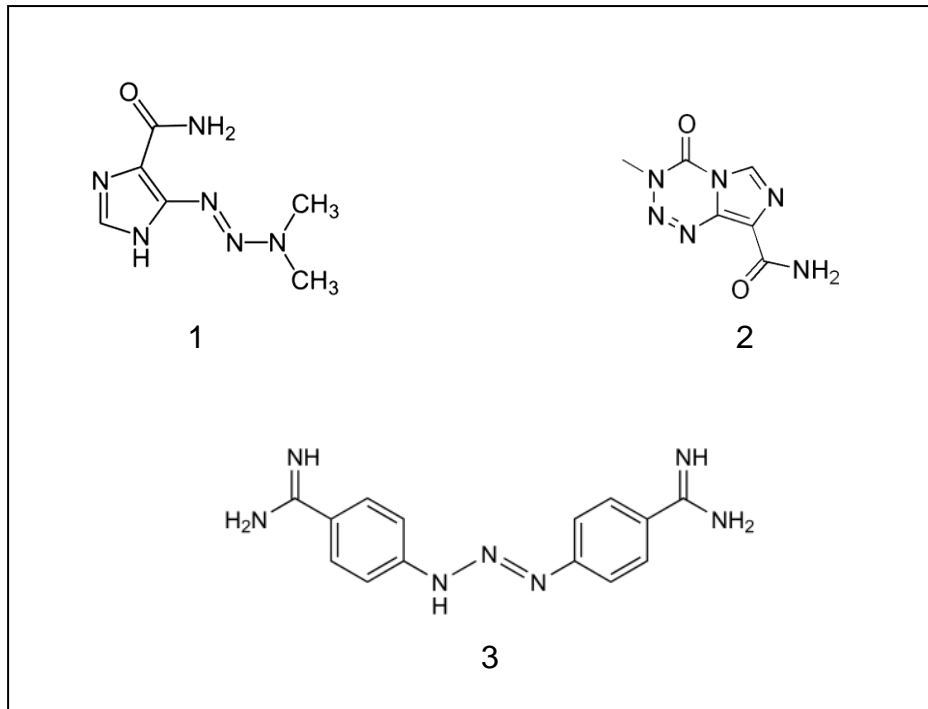


Figura 1 – Estrutura molecular dos agentes antineoplásicos alquilantes dacarbazina (1), temozolomida (2) e diminazeno (3)

A dacarbazina era inicialmente considerada como um antimetabólito, porém, como este derivado triazeno funciona através da alquilação do DNA, foi reclassificada como agente alquilante. Este fármaco precisa ser ativado inicialmente pelo citocromo P-450 no fígado através de uma reação de N-desmetilação, e quando atinge a célula alvo ocorre clivagem espontânea do metabólito que libera um componente alquilante chamado diazometano (LAZO; PARKER, 2006). Após sofrer ativação metabólica no fígado, a dacarbazina destrói as células em qualquer fase do ciclo celular. Seu principal uso é em melanoma maligno ou pode ser combinada com outras drogas em esquemas terapêuticos para tratamento de outras neoplasias (KATZUNG, 2010).

A temozolamida não precisa de ativação metabólica para se transformar na forma ativa alquilante, isto ocorre em pH fisiológico, e ela atua em todas as fases do ciclo celular. Seu principal uso é em pacientes com gliomas malignos (MAYER et al., 1994). Os efeitos citotóxicos da dacarbazina e da temozolamida estão relacionados com o fato de promoverem a alquilação do DNA impedindo a multiplicação das células tumorais e a síntese de proteínas nestas células. O sítio de alquilação mais frequente é o N⁷ da guanina, porém, o mecanismo de ação é relacionado com a metilação do O⁶ da guanina (BROCH, 2008). A diferença entre os dois fármacos

está no fato de que a temozolamida degrada espontaneamente ao seu metabólito ativo e pode ser ingerida oralmente penetrando na barreira hematoencefálica. Como é bem tolerada, a temozolamida é adequada para ser usada em combinação com outros agentes quimioterápicos quando ocorre resistência à ela (DANSON; MIDDLETON, 2001).

A temozolamida foi o primeiro fármaco aprovado em 30 anos para uso especificamente no tratamento de glioblastoma multiforme e astrocitoma anaplásico, que geralmente apresentam recorrência ou progridem após a terapia. A vantagem da temozolamida neste caso é de não produzir cardiotoxicidade, e poder ser administrada oralmente, o que reduz significativamente os custos para as instituições hospitalares (CARNERO GÓMEZ, 2005). Além destes usos, a dacarbazina e a temozolamida também podem ser ativas em células leucêmicas do tipo L1210 (linhagem de células linfoblásticas leucêmicas murinas), como publicado em 1976 por Venditti (VENDITTI, 1976). Estudos posteriores também comprovaram que a atividade antitumoral da temozolamida *in vivo*, frente às células L1210, é mantida quando administrada oralmente (STEVENS et al., 1987) ou na forma intraperitoneal (NEWLANDS, et al., 1997). A temozolamida ainda pode ser eficaz em casos de leucemia aguda conforme um estudo publicado em 2007 (CAPORASO et al., 2007). Adicionalmente, um estudo piloto mostrou que a dacarbazina pode induzir uma acentuada redução de células blásticas em pacientes com LMA, e estas mesmas células mostraram sensibilidade à temozolamida em um grande número de amostras (D'ATRI et al., 1995).

A temozolamida age predominantemente através da metilação da O⁶-guanina no DNA (TAVERNA et al., 1992; LACAL et al., 1996). Um obstáculo para este fármaco é a enzima de reparo do DNA, a O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) (BOBOLA et al., 1996; WANG et al., 1996) pois remove os grupos metil que levariam a célula à morte por apoptose, conferindo um importante mecanismo de resistência à temozolamida que se apresenta nas leucemias (HEGI et al., 2005). A ausência da expressão da O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase foi correlacionada com maior probabilidade de resposta à temozolamida (SEITER et al., 2009) e uma das estratégias quando se tem refratariedade das células leucêmicas é combinar a temozolamida com outros fármacos (SEITER et al., 2002).

Triazenos isoladamente ou em combinação com inibidores de MGMT tem sido testados em LMA. Em um caso de leucemia aguda refratária com infiltração na

pele, o tratamento com temozolomida associado a inibidores de MGMT produziu boa resposta, embora transitória, com desaparecimento dos blastos e das lesões de pele (BONMASSAR et al., 2013).

Em estudos recentes, uma nova classe de 1,3-diaryltriazenos, denominado 1,3-bis(4-nitrofenil)triazeno está sendo proposta como uma molécula anticâncer que atinge preferencialmente células tumorais, mostrando-se altamente citotóxica contra diferentes linhagens destas células, incluindo células de carcinoma cervical (HeLa), células de carcinoma colorretal e células de carcinoma de laringe resistentes à cisplatina (CIMBORA-ZOVKO et al., 2011).

3.2 Química de coordenação, química bioinorgânica e química medicinal

A Química de Coordenação é uma importante área da química inorgânica, estuda os compostos de coordenação, este termo é usado para designar um complexo neutro ou um composto iônico no qual pelo menos um dos íons envolvidos é um complexo. O complexo representa um átomo metálico na forma iônica (ácido de Lewis) rodeado por um conjunto de ligantes (bases de Lewis). O ligante é um íon ou molécula que pode ter existência independente. A ligação estabelecida entre ácido e base de Lewis é uma ligação coordenada (EPSTEIN; ROSENBERG, 2003).

Os compostos de coordenação representam moléculas com grande aplicabilidade na Química Medicinal e quando envolvem metais de transição, também são chamados de complexos metálicos (EPSTEIN; ROSENBERG, 2003). A cisplatina (cis-diaminodicloroplatina [II]), agente antineoplásico ciclo celular inespecífico, é exemplo de complexo metálico inorgânico, no qual um átomo central de platina (Pt) está rodeado por quatro ligantes: dois átomos de cloro (Cl) e dois grupos amônia (NH₃) (KATZUNG, 2010).

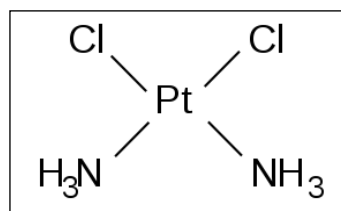


Figura 2 – Estrutura molecular da cisplatina

A química medicinal, cuja atuação está centralizada na descoberta, *design*, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos, bem como no estudo do respectivo metabolismo e modo de ação, tem despertado especial interesse no desenvolvimento de complexos metálicos que possuam uma ação terapêutica, visando sintetizar novos fármacos ou aperfeiçoar a produção de outros já introduzidos na prática clínica (PEREIRA; MORENO, 2010).

Entre os compostos de coordenação destacam-se os TZC, sistemas nitrogenados de cadeia aberta, que apresentam três átomos de nitrogênio ligados em sequência, essas moléculas possuem grande versatilidade nos modos de coordenação devido à geometria molecular e à presença de sítios doadores de elétrons (base de Lewis) ligados quimicamente a centros metálicos (ácidos de Lewis) (EPSTEIN; ROSENBERG, 2003). Sua aplicabilidade se estende da química farmacológica à química de materiais. Os trizenos podem ser facilmente transformados em vários grupos funcionais como demonstrado na Figura 3 (HAFNER; BRASE, 2012).

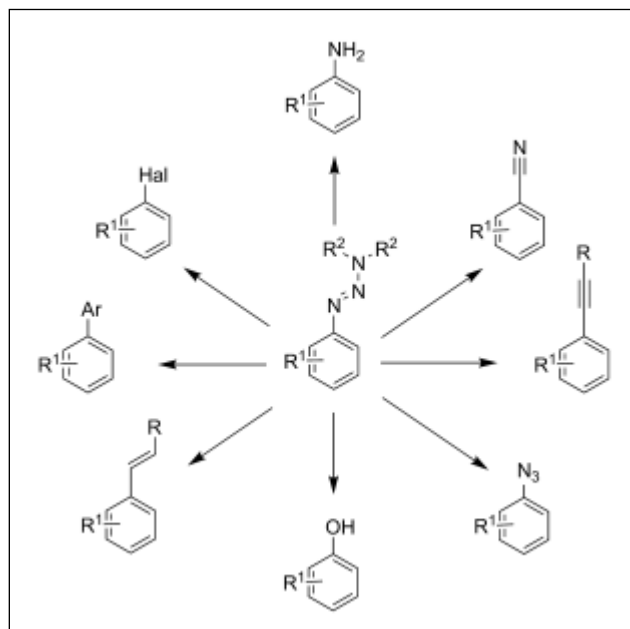


Figura 3 – Versatilidade dos compostos trizenos

A bioquímica inorgânica ou bioinorgânica, outra área da química inorgânica, tem contribuído para o conhecimento detalhado do metabolismo dos diferentes

elementos químicos, da atuação dos metais, principalmente dos metais de transição presentes nos sistemas biológicos. Além disso, avalia as consequências na incorporação, captação, transporte, utilização e armazenamento desses metais nos sistemas orgânicos, destacando-se a verificação de sua toxicidade no campo medicinal e aplicações farmacológicas (BARAN, 2005; THOMPSON; ORVIG, 2006).

Os metais, de forma geral, podem coordenar-se a ligantes em uma configuração tridimensional, onde a molécula pode reconhecer e interagir com um alvo molecular determinado. Além disso, os metais têm a habilidade de perder elétrons formando espécies catiônicas, o que os tornam solúveis nos sistemas biológicos. É na forma de cátions que eles desempenham seu papel nos processos fisiológicos, tornando-se comum a coordenação e interação destes com espécies ricas em elétrons, tais como proteínas e DNA (RIJT; SADLER, 2009).

Entre os metais de transição, ferro, zinco e cobre são os elementos mais abundantes nos seres vivos. O ferro faz parte de uma série de processos e funções, entre eles o metabolismo do oxigênio (hemoglobina, mioglobina, oxigenases), transporte de elétrons (citocromos, ferredoxinas), e em centros catalíticos de enzimas de diversos tipos (peroxidases, catalases, fosfatases ácidas). O zinco é, depois do ferro, o metal mais abundante em sistemas biológicos. Já foram identificadas mais de 200 metaloenzimas contendo esse elemento (BARAN, 2004).

O íon cobre é outro elemento importante para os sistemas biológicos, pode estar presente no estado oxidado Cu(II) ou reduzido Cu(I) desempenhando funções na fisiologia das células, como um cofator catalítico de várias enzimas celulares (citocromo-oxidase, tirosinase, ceruloplasmina, lisina oxidase, ascorbato oxidase, superóxido dismutase, amina oxidase), na respiração mitocondrial e na absorção de ferro, assim como seu excesso pode causar danos aos componentes celulares (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2003; BARAN, 2004; LINDER, 2012).

Estudos conduzidos por Silva et al. em 2011 demonstraram que novos complexos com cobre foram capazes de inibir o crescimento de células K562 (linhagem de células de leucemia mielocítica crônica) e apresentaram atividade de clivagem do DNA de plasmídeo (SILVA et al., 2011). Também mostraram ter atividade antineoplásica em linhagens celulares HEP-2, de carcinoma laríngeo humano (RAMAKRISHNAN et al., 2011).

Desenvolver metalodrogas (*metal-based drugs*) ou fármacos em geral não é uma estratégia fácil. No caso específico de compostos inorgânicos, a bioacumulação

do íon metálico pode causar efeitos colaterais severos e, portanto, aspectos farmacológicos e fisiológicos devem ser investigados *in vivo* utilizando modelos animais que comprovem a eficácia e segurança do composto antes da liberação do fármaco para testes clínicos em humanos (ROCHA et al, 2011).

Um exemplo da importância da modificação de moléculas na síntese química de compostos é o desenvolvimento do mesilato de imatinibe, fármaco aprovado como tratamento de primeira linha para pacientes com LMC em fase crônica, também indicado para pacientes com LLA e tumor gastrointestinal metastático (PENG; LLOYD; SCHRAM, 2005). Vários grupos químicos foram incorporados à molécula sintetizada inicialmente, com o objetivo de melhorar suas propriedades farmacológicas, como a introdução de um grupo metil, que aumentou sua atividade em ensaios celulares. A adição de um grupo benzidina ao anel fenil, aumentou a sua atividade tirosinoquinase e adição de N-metil piperazina, possibilitou maior solubilidade em água e biodisponibilidade via oral (DENINGER, 2005).

O desenvolvimento e avaliação de novas drogas tornaram-se uma prática cada vez mais necessária visando o tratamento e cura de várias doenças.

3.3 Leucemias agudas

As leucemias agudas (LA) são doenças heterogêneas, tanto sob o aspecto morfológico como sob o aspecto biológico. O processo neoplásico que dá origem ao clone leucêmico pode surgir em diversas fases do desenvolvimento das diferentes linhagens celulares da medula óssea. As tentativas de separar estas doenças de acordo com suas semelhanças resultaram na identificação de dois grandes grupos de LA com evolução clínica e resposta terapêutica distintas, as LMA e as LLA (ZERBINI et al., 2011).

Em 1975, pela primeira vez, o grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) propôs critérios para uniformizar a classificação das LA. Esta classificação inicial baseia-se na semelhança morfológica da célula normal com o seu equivalente leucêmico, reconhecendo subtipos que refletem o grau de maturação e a linhagem celular comprometida (BENNET et al., 1976; 1985).

3.3.1 Leucemia mieloide aguda

A incidência da LMA é de aproximadamente 4/100.000 pessoas por ano, é mais comum em adultos, cerca de 70%, enquanto que a LLA predomina em crianças (HEIM; MITELMAN, 2009). A LMA se caracteriza pelo crescimento desordenado dos blastos da linhagem mieloide e na maioria dos casos não existe uma causa evidente para a doença. Os sintomas geralmente são cansaço e dispnéia às atividades físicas, palidez, sinais de sangramento nas mucosas, manchas na pele, febre, infecções e dores ósseas (LUSIS, 2000; PEREIRA, 2006).

O diagnóstico e a classificação FAB são determinados pela análise morfológica e citoquímica das células (Quadro 1), imunofenotipagem e citogenética (HAMERSCHLAK, 2008).

Sub-tipo FAB	Nomenclatura	Morfologia e critérios para diagnóstico	Citoquímica
M0	LMA sem maturação	Blastos com elevado grau de imaturidade	MPO<3% dos blastos SBB – ENE – MPO + por Me e anticorpos monoclonais
M1	LMA sem maturação	Blastos com diferenciação parcial; <20% e células monocíticas; <50% de eritroblastos	MPO ou SBB>3% dos blastos + PAS –
M2	LMA com maturação	> 10% de células granulocíticas em maturação; < de 20% de células monocíticas; e <50% de eritroblastos	MPO + SBB + PAS –
M3	Leucemia promielocítica aguda	> 10% de promielócitos atípicos e hipergranulares; bastonetes de Auer	MPO + SBB + PAS –
M3 ve Variante hiperbasofílica	Leucemia promielocítica (variante microgranular e hiperbasofílica)	Promielócitos atípicos com granulações finas; o núcleo pode apresentar forma semelhante a rim; na variante hiperbasofílica o núcleo é lobulado, citoplasma com basofilia intensa e grânulos ausentes ou em pequeno número.	MPO+ SBB+ PAS –
M4	LMA mielomonocítica	> de 20% de células com morfologia monocítica; > de 20% de células granulocíticas; < de 50% de eritroblastos; sangue periférico com $>x 10^9$ e de	MPO + ENE +

		células monocíticas; lisozioma 3x> que o normal.	
M4E _o	LMA mielomonocítica com eosinofilia	Eosinófilos anormais com grânulos eosinofílicos e basofílicos; > 30% de blastos; < 50% de eritroblastos.	MPO + ENE + PAS + (Eosinófilos)
M5a	LMA monoblástica	> 80% das células representadas por monoblastos	ENE +
M5b	LMA monoblástica	< 80% das células são monoblastos, embora a maioria apresenta morfologia monocítica.	ENE +
M6	Eritroleucemia	> 50% das células representadas por eritroblastos, incluindo formas megaloblastoides e multinucleadas; blastos não eritróides > 30%.	PAS + Eritroblastos sideroblastos em anel
M7	Leucemia megacariocítica	Megacarioblastos com morfologia heterogênea podendo assemelhar-se à blastos de LLA-L2, LMA-M0 e M1; células com projeções citoplasmáticas – megacariócitos grandes e atípicos, blastos mononucleados ou multinucleados intensivamente basófilos. Mielofibrose.	Peroxidase plaquetária à microscopia eletrônica + MPO – SBB – ENE –

Quadro 1 – Classificação FAB das leucemias mieloides agudas

MPO – mieloperoxidase; SBB – sudan-black B; ENE – esterase não específica; PAS – ácido periódico de Schiff

A classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) para as neoplasias do tecido hematopoiético foi atualizada na sua 4ª edição em 2008. Considera o estudo das alterações cromossômicas e análise de mutações, em virtude dos resultados alcançados com propostas terapêuticas inovadoras nesses subgrupos de diferentes anormalidades genéticas (ZERBINI et al., 2011) (Quadro 2).

LMA com anormalidades genéticas recorrentes	LMA com t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> LMA com inv(16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Leucemia promielocítica aguda (LPMA) com t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i> LMA com t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-MLL</i> LMA com t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> LMA com inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i> LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i> LMA com mutação de <i>NPM1</i> LMA com mutação de <i>CEBPA</i>
LMA com alterações relacionadas com Síndrome Mielodisplásica (SMD)	Pós SMD ou doença mieloproliferativa sem antecedentes

Neoplasias mieloides relacionadas com terapia	LMA/SMD associada com agentes alquilantes LMA/SMD associada com inibidores da topoisomerasell
LMA não categorizadas nos itens anteriores	LMA com diferenciação mínima LMA sem maturação LMA com maturação Leucemia mielomonocítica aguda (LMMA) Leucemia monoblástica (LMoB) e leucemia monocítica (LMoC) Leucemia eritroide aguda (LEA) Leucemia megacarioblástica aguda (LMegA) Leucemia basofílica aguda (LBA) Panmielose aguda com mielofibrose (PMA-MF) Sarcoma mieloide (SM) Proliferações mieloides relacionadas com síndrome de Down

Quadro 2 – Classificação OMS das leucemias mieloides agudas

Fonte: Adaptado de ZERBINI, 2011.

3.3.2 Leucemia linfóide aguda

É a neoplasia mais comum em crianças menores de 15 anos, aproximadamente 25% dos casos de câncer infantil, sua incidência em crianças é de 3-4/100.000 crianças por ano com pico entre 2 a 5 anos (HEIM; MITELMAN, 2009).

A LLA ocorre devido a uma produção desordenada de blastos linfóides e bloqueio na produção dos demais componentes sanguíneos. Os sinais e sintomas são semelhantes aos da LMA e o diagnóstico é feito por meio de análise morfológica da medula óssea, imunofenotipagem e citogenética, sendo que o tratamento também deve considerar esses três tipos de análise (HAMERSCHLAK, 2008).

Durante mais de três décadas o grupo FAB, que se baseia na morfologia, foi o principal método de classificação das LLA. As principais são: L1 – Leucemia linfóide aguda, variante da infância, L2 – Leucemia linfóide aguda, variante de adultos e L3 – Leucemia linfóide aguda, tipo Burkitt.

A classificação mais recente da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2008 incluiu características moleculares e clínicas além das características morfológicas. Na classificação OMS das leucemias linfóides agudas de precursores das células B incluem-se os subgrupos citogenéticos como: $t(9;22)(q34;q11)BCR/ABL$; $t(?;11q23) MLL$; $t(1;19)(q23;p13) E2A/PBX1$, $t(12;21)(p13;q22) ETV6/RUNX1$ e $t(5;14)(q31;q32) IL3/IGH$ (ZERBINI et al., 2011).

A maioria dos casos de LLA expressa antígenos da linhagem B e podem dividir-se em várias categorias (Quadro 3).

	Imunoglobulina de Citoplasma	Frequência %	Imunoglobulina de superfície	Presença de CD10	Receptores de células T
LLA Pró B	-	4	-	-	-
LLA Pré B	+	13	-	+	-
LLA comum	-	64	-	+	-
LLA B	-	4	+ κ ou λ	±	-
LLA T	-	15	-	±	+
LLA transicional	+μ	<1	+μ	+ Em 80% dos pacientes	-

Quadro 3 – Classificação das LLA baseada em alguns marcadores diferenciais

Fonte: Adaptado de HEIM; MITELMAN, 2009.

Em cerca de 25% dos pacientes com LLA, as células leucêmicas também expressam antígenos mieloides, nestes casos há possibilidade da utilização desses marcadores no seguimento de doença residual. Casos mais raros de LA não apresentam evidências de comprometimento de linhagem. Esses casos são incluídos em um grupo de pacientes com leucemia aguda indiferenciada. Outros pacientes exibem características de comprometimento tanto mielóide como linfóide. Neste caso são chamados bifenotípicos. O prognóstico para os pacientes com leucemia aguda indiferenciada ou bifenotípica é pior (PIETERS; CARROLL, 2008).

3.3.3 Tratamento das leucemias agudas

Os agentes quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer são originalmente sintéticos, semi-sintéticos ou naturais, sendo divididos em classes diferentes: agentes alquilantes, antimetabólitos, alcalóides vegetais, antibióticos antitumorais, agentes hormonais e agentes diversos (KATZUNG, 2010). As principais drogas utilizadas em hematologia-oncologia quanto a especificidade no ciclo celular, fases no ciclo celular, classe e função estão descritas do Quadro 4.

Atualmente preconiza-se o uso de quimioterápicos em associação, a poliquimioterapia, ou seja, a utilização de duas ou mais drogas que combinadas

agem de forma complementar. Os esquemas combinados apresentam vantagens, pois as drogas quando combinadas, podem diminuir a resistência tumoral e causar efeitos sinérgicos. Além disso, os efeitos colaterais podem ser reduzidos já que as doses de cada medicamento serão menores e o efeito tóxico ocorrerá em locais distintos do organismo (LAZO; PARKER, 2006).

		Fase	Quimioterápico	Classe e função em nível celular
ESPECIFICIDADE NO CICLO CELULAR	CICLO- ESPECÍFICO	G1	Asparaginase	Agentes diversos - Hidrolisam a L-asparagina circulante em ácido aspártico e amônia com inibição da síntese de proteína.
		G2	Bleomicina	Antibióticos antitumorais - Atuam através da ligação ao DNA resultando em rupturas de filamentos simples e duplos com inibição da biossíntese do DNA.
			Etoposide	Plantas Alcaloides - Inibidores da topoisomerase II, enzima necessária a replicação do DNA.
		S	Hidroxiuréia	Agentes diversos - Inibem a enzima ribonucleotídeo redutase com inibição da síntese de DNA.
			Mercaptopurina	Antimetabólitos - Possuem a estrutura química que permite incorporar-se a célula competindo pela semelhança com os metabólitos naturais, como o ácido fólico, as purinas e pirimidinas. Bloqueiam a produção de substâncias fundamentais ou interpõe-se as cadeias de DNA e RNA celular.
			Metotrexato	
			Tioguanina	
			Citarabina	
		Fludarabina		
		M	Vincristina	Plantas alcaloides - Inibidores mitóticos, bloqueiam a divisão celular na metáfase ao ligarem-se às proteínas dos microtúbulos, destruindo-os e impedindo a polarização dos cromossomos
			Vimblastina	
		CICLO-INESPECÍFICO	Bussulfan	Agentes alquilantes - Causam alterações na cadeia de DNA e impedem sua replicação. Responsáveis pelo recrutamento das células quiescentes para o processo de divisão celular para ação das drogas ciclo-específicas
	Cisplatina			
	Ciclofosfamida			
	Ifosfamida			
	Melfalan			
	Dacarbazina			
	Carmustina			
	Daunoblastina		Antibióticos antitumorais - Agentes antimicrobianos produzidos pelo <i>Streptomyces</i> , atuam interferindo na síntese dos ácidos nucléicos.	
Doxorrubicina				
Idarrubicina				
Mitoxantrona				

Quadro 4 – Classificação das principais drogas utilizadas em Hematologia-Oncologia quanto a especificidade no ciclo celular, fases no ciclo celular, classe e função

Fonte: Adaptado de MAIA, 2010; KATZUNG, 2010.

Os protocolos de quimioterapia são divididos por ciclos. O primeiro ciclo é chamado de indução e possui o objetivo de promover a remissão completa ou parcial da doença. Entende-se como remissão completa uma taxa menor que 5% e como remissão parcial uma taxa menor que 20% de células neoplásicas na medula óssea (MAIA, 2010).

Os ciclos subseqüentes são denominados de consolidação e manutenção. São destinados a prevenir a recorrência da doença. Na maioria das vezes, a consolidação consiste em uma repetição da quimioterapia de indução ou na sua intensificação por meio de fármacos adicionais. A manutenção envolve a utilização de doses menores do que aquelas administradas durante a fase de indução. Apesar de a quimioterapia tradicional ser dirigida para certas macromoléculas ou enzimas, ela não discrimina de forma eficaz as células malignas das células normais com alta taxa de proliferação, resultando em inúmeros efeitos adversos, como náuseas, vômitos, mucosite, alopecia e mielotoxicidade (MAIA, 2010).

A ausência de resposta da doença ao tratamento acontece quando as células neoplásicas desenvolvem mecanismos de resistência à ação das drogas tendo como conseqüência a progressão da malignidade, chamada de recaída da doença de base. A recaída é denominada precoce, caso ocorra com menos de um ano de tratamento, e tardia, se ocorrer após um ano. O tratamento se reinicia sempre que ocorrer recaída da doença, geralmente com a mudança do protocolo padrão de quimioterapia para um alternativo. Quando vários protocolos são utilizados e a neoplasia continua resistente, é diagnosticada como doença refratária, e instituído o início do tratamento paliativo (MAIA, 2010).

A quimioterapia com drogas combinadas induz uma remissão completa na maioria dos pacientes com LLA e LMA. Após a remissão, o tratamento poderá depender dos resultados de identificação de doença residual mínima (DRM), citogenética e condições clínicas do paciente, intensificando-se as doses de quimioterápicos, modificando esquemas terapêuticos com protocolos alternativos ou instituindo outros tratamentos como os transplantes de medula óssea (MROZEK; HEEREMA; BLOOMFIELD, 2004). O uso de combinações de fármacos citotóxicos, concomitante ou não ao transplante de medula óssea, aumenta o percentual de cura em mais de 80% nas crianças e 50% em adultos jovens com LLA (BRENNER; PINKEL, 1999; HAMERSCHLAK, 2012).

Estudos recentes, com o objetivo de melhorar o índice terapêutico, demonstram que estão sendo explorados, em combinação com quimioterápicos, agentes modificadores epigenéticos que têm ação sobre enzimas como DNA metiltransferases (DNMT) e histona desacetilases (HDAC). Eles podem trazer benefícios clínicos modificando o epigenoma de células neoplásicas, inibindo as DNMT e HDAC, responsáveis pela metilação e acetilação do DNA, principalmente em doenças hematológicas como LMA e SMD (MULLER; PRADO, 2008; HATZIMICHAEL; CROOK, 2013).

3.3.3.1 Tratamento da LMA

O tratamento tem como objetivo induzir a remissão, ou seja, o desaparecimento dos blastos na medula óssea utilizando fármacos como a citarabina, daunorrubicina, metotrexato, 6-mercaptopurina e mitoxantrona (HAMERSCHLAK, 2008).

A citarabina é um fármaco classificado como antimetabólito e é o mais importante utilizado na terapia da LMA. Como existem mecanismos de resistência à citarabina, a concentração deste fármaco no plasma declina rapidamente e deve-se utilizar esquemas com doses cada vez mais altas para se alcançar melhores resultados e induzir a remissão completa da doença (HUBEEK et al., 2006; KATZUNG, 2010).

O índice de remissão após indução atinge até 80%, mas a taxa de cura permanece em torno de 35 a 60%, exceção feita à leucemia promielocítica (MORANDO et al., 2010). Os pacientes com LMA M3, a partir dos anos 90, têm sido tratados com esquemas que incluem o ácido transretinoico (ATRA), tendo elevada a taxa de remissão completa para mais de 80%, enquanto a sobrevida global e a sobrevida livre de doença para 80% e 90%, respectivamente (BAUDARD et al., 1999; HAMERSCHLAK, 2012).

É provável que vários fatores estejam implicados na falha terapêutica e no percentual relativamente baixo de cura da LMA. Entre os fatores responsáveis pela remissão não sustentada estão a própria heterogeneidade da doença, contagens de

leucócitos acima de 20.000, envolvimento de muitos rearranjos cromossômicos, e a resistência a antraciclina e à citarabina (BAUDARD et al., 1999).

Outro aspecto a ser considerado para a falha terapêutica é a resistência a múltiplas drogas (MDR). Vários estudos apontam que este seja um dos mecanismos que influenciam na falha ou ausência da resposta aos quimioterápicos, uma resistência adquirida pelas células neoplásicas que se caracteriza pela redução da concentração intracelular do fármaco. O principal fator relacionado com a MDR é a expressão aumentada da glicoproteína P(Pgp), que funciona como uma bomba de efluxo dependente de energia capaz de transportar drogas para o exterior da célula através da membrana plasmática (WAGNER-SOUZA et al., 2003; HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010).

3.3.3.2 Tratamento da LLA

O Protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância (GBTLI-99) preconiza os seguintes antineoplásicos para o tratamento das LLAs: prednisona, vincristina, L-asparaginase, daunorrubicina, citarabina, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina e tioguanina (CAZÉ; BUENO; SANTOS, 2010).

O tratamento deve ser selecionado de acordo com uma classificação com riscos padronizados (baixo ou alto risco), tais como índice de DNA, citogenética, resposta precoce à terapia, imunofenotipagem e presença de doença no sistema nervoso central (HAMERSCHLAK, 2008). A fase inicial de tratamento, a indução, deve incluir o tratamento ou prevenção da doença no sistema nervoso central, que inclui a quimioterapia profilática com metotrexato no liquor (intratecal). Quando a remissão é obtida, os pacientes são submetidos a ciclos de quimioterapia pós-remissão e, posteriormente, passam a usar medicamentos quimioterápicos por aproximadamente dois anos, geralmente via oral, como manutenção. Mais de 90% das crianças apresentam remissão completa com esta terapia, com toxicidade mínima (KATZUNG, 2010).

3.4 Leucemia mieloide crônica

A LMC é uma doença clonal da medula óssea caracterizada pela produção descontrolada de células, principalmente de granulócitos. Ocorre em aproximadamente 15-20% dos casos de leucemia, com uma incidência de 1/100.000 por ano, é mais comum em adultos, homens, com idade média de 65 anos ao diagnóstico. Há estudos que relatam que pessoas expostas a radiações ionizantes têm risco aumentado de desenvolver LMC (HEIM; MITELMAN, 2009).

Contagem elevada de leucócitos, basofilia, esplenomegalia, medula óssea com hiperplasia da série granulocítica e megacariocítica, mielofibrose são achados frequentes ao diagnóstico (BEUTLER, 2001).

O evento leucemogênico ocorre na célula tronco pluripotente, onde acontece uma alteração cromossômica: um segmento do cromossomo 9, contendo o oncogene *ABL* é translocado para o cromossomo 22 na região *BCR* formando um gene quimérico *BCR-ABL* que codifica uma proteína p210 com atividade tirosinoquinase, influenciando na proliferação e apoptose das células leucêmicas (HEIM; MITELMAN, 2009).

A terapia com mesilato de imatinibe, inibidor de tirosinoquinase (TKI) serve como modelo para a terapia alvo molecular do câncer. Estudos sugerem que o imatinibe é um inibidor potente na diferenciação de células tronco leucêmicas, mas não as extingue definitivamente (MICHOR et al., 2005).

O tratamento exige monitoramento citogenético aos 3, 6, 12 e 18 meses após o início da doença e controle molecular a cada 3 meses para monitoramento de doença residual mínima (DRM) (HAMERSCHLAK, 2008).

O monitoramento de DRM em LMC possibilita o diagnóstico precoce de eventuais recidivas, evolução e assim, a eficácia do tratamento. Atualmente, o monitoramento ideal deve ser realizado por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, que fornece resultados quantitativos permitindo avaliar a evolução cinética e quantificação dos transcritos *BCR-ABL*. A comparação da razão *BCR-ABL/ABL* em diferentes fases da doença possibilita monitorar flutuações significativas compatíveis com o desencadeamento de uma possível recidiva (ALMEIDA; SAADI, 2007).

A terapia com TKIs deve ser instituída indefinidamente com base na resposta citogenética e molecular. São recomendados TKIs de 2ª geração (dasatinibe, nilotinibe) quando há mutações de resistência ao imatinibe, e o transplante de medula óssea é preconizado somente quando não há resposta a estes TKIs (BACCARANI et al., 2009).

3.5 Citogenética das leucemias

A relação entre uma alteração genética e o câncer teve início em 1960, com a descoberta do cromossomo Philadelphia (Ph¹), em pacientes com LMC (BENNETT, et al., 1985). O Ph¹ é resultante da translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, transpondo o segmento 3' do gene *ABL* para o segmento 5' do gene *BCR*. O gene *BCR*, presente no cromossomo 22, não possui função conhecida, enquanto o gene *ABL*, presente no cromossomo 9, é um protooncogene. O gene resultante da translocação, *BCR-ABL*, é transcrito em um RNA-mensageiro (mRNA) quimérico e traduzido em uma proteína com localização citoplasmática e atividade aumentada de tirosinaquinase (LUSIS, 2000). O cromossomo Ph¹ está presente em 90% das LMC, 20% das LLA em adultos, 5% das LLA pediátricas e 1% das LMA (HEIM; MITELMAN, 2009).

Várias técnicas têm sido empregadas na avaliação genética das leucemias, incluindo a citogenética convencional, a citogenética molecular (hibridização *in situ* por fluorescência: FISH); hibridização genômica comparativa (CGH), além dos métodos de biologia molecular como *Southern blotting*, amplificação de DNA ou RNA por PCR e PCR em tempo real, entre outras (FITZGERALD; MORRIS, 1992; FUTREAL et al., 2004; NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010). As técnicas citogenéticas têm proporcionado de maneira fundamental a compreensão da biologia e do tratamento das leucemias (LOBO, 2008; MOORMAN et al., 2010).

Os avanços nos estudos citogenéticos contribuíram para a detecção de anomalias cromossômicas específicas associadas aos aspectos morfológicos e perfis imunofenotípicos das LLAs e LMAs. Além disso, estas anomalias cromossômicas adquiridas são a maior evidência de que mudanças genéticas e epigenéticas na transformação da célula normal para neoplásica poderiam ser os

primeiros passos nos mecanismos leucemogênicos (POMBO-DE-OLIVEIRA, 2008; MULLER; PRADO, 2008; OLIVEIRA et al., 2010).

A citogenética convencional permite a detecção de anomalias recorrentes, numéricas e/ou estruturais, alterações adicionais e complexas. Algumas alterações citogenéticas crípticas, ou seja, não visualizáveis pelo procedimento convencional, podem ser identificadas pela citogenética molecular (FISH) com o uso de sondas específicas direcionadas para as regiões alvo da análise (POMBO-DE-OLIVEIRA, 2008).

Muitas vezes, alterações cromossômicas como translocações resultam em rearranjos balanceados que inclui mudança da região regulatória de um gene para outro, localizado em um mesmo cromossomo ou em cromossomos diferentes, com consequente alteração do nível de expressão do gene translocado ou do gene quimérico. Outras modificações cromossômicas, como deleções (perda de um fragmento cromossômico) ou inversões (reorganização de um fragmento dentro do cromossomo), também estão envolvidas na gênese das leucemias (MCKENNA, 2000; LOBO, 2008).

O impacto prognóstico de subgrupos citogenéticos foi definido pelo *Medical Research Council* (MRC) como favorável, intermediário ou desfavorável, conforme as alterações cromossômicas presentes, entre elas, translocações, inversões, monossomias e trissomias (GRIMWADE et al., 2010).

Além de indicar o prognóstico, a análise citogenética das células da medula óssea pode fornecer várias informações, tais como: estabelecer a presença de um clone maligno, evidenciar a linhagem celular do clone leucêmico, indicar mecanismos de leucemogênese, confirmar o diagnóstico, auxiliar na escolha da estratégia terapêutica, evidenciar a regressão da doença e acompanhar a evolução nos transplantes de medula óssea (SWANSBURY, 2003; SILVA et al., 2006, MOORMAN et al., 2010).

3.5.1 Citogenética da LMA

A ocorrência de anomalias cromossômicas recorrentes na LMA é muito frequente, atingindo mais de 60% dos casos quando analisados pelos métodos

disponíveis. As principais alterações estruturais que são fatores prognósticos importantes, são consideradas de baixo risco quando presentes, entre elas, as translocações: $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q21)$, $t(16;16)(p13;q22)$ e $inv(16)(p13;q22)$. As alterações cromossômicas que indicam prognóstico de alto risco são as translocações $t(1;22)(p13;q13)$, $t(9;22)(q34;q11)$, cariótipos complexos e anormalidades envolvendo o cromossomo 11q23 (GRIMWADE; HILLS, 2009).

As principais alterações numéricas encontradas na LMA são a monossomia do cromossomo 7/del(7q) e monossomia ou deleção do cromossomo 5, conferindo prognóstico desfavorável quando presentes. Cariótipo normal e trissomia do cromossomo 8 indicam risco intermediário (GRIMWADE; HILLS, 2009).

Enquanto as alterações numéricas e deleções cromossômicas ocorrem em frequência maior com a elevação da idade, as translocações são ligeiramente mais comuns em jovens (POMBO-DE-OLIVEIRA, 2008). O Quadro 5 mostra as principais alterações cromossômicas na LMA, genes envolvidos nos pontos de quebra, associações aos subgrupos FAB e fator prognóstico destas alterações (HEIM; MITELMAN, 2009).

Rearranjo	Genes Envolvidos	Grupo FAB	Prognóstico
t(1;3)(p36;q21)	<i>RPN1;PRDM16</i>	M1 e M4	Desfavorável
der(1;7)(q10;p10)	?	Todos	Desfavorável
t(1;11)(q21;q23)	<i>MLLT11;MLL</i>	M4 e M5	Desfavorável
t(1;22)(p13;q13)	<i>RBM15;MKL1</i>	M7	Intermediário
inv(3), ins(3;3), t(3;3)	<i>EVI1;RPN1</i>	M1, M4 e M6	Desfavorável
t(3;5)(q25;q35)	<i>NPM1;MLF1</i>	M6	Desfavorável
t(3;21)(q26;q22)	<i>EV11/MDS1;RUNX1</i>	Todos	Desfavorável
+4	Mutação <i>KIT</i>	M2 e M4	Intermediário
-5/del(5q)	<i>IL9</i>	Todos	Desfavorável
t(6;9)(p23;q34)	<i>DEK;NUP214</i>	M2 e M4	Desfavorável
t(6;11)(q27;q23)	<i>MLLT4;MLL</i>	M4 e M5	Desfavorável
t(7;11)(p15;p15)	<i>HOXA9; NUP98</i>	M2 e M4	Desfavorável
-7/del(7q)	?	M2 e M4	Desfavorável
+8		M1, M2, M4 e M5	Intermediário
t(8;16)(p11;p13)	<i>MYST13; CREBBP</i>	M4 e M5	Desfavorável
t(8;21)(q22;q22)	<i>RUNX1;RUNX1T1</i>	M2	Favorável
t(9;11)(p21;q23)	<i>MLLT3; MLL</i>	M5	Intermediário
del(9q)	?	M5	Favorável
t(9;22)(q34;q11)	<i>ABL; BCR</i>	M1 e M2	Desfavorável
t(10;12)(p12;q14)	<i>PICALM;MLLT10</i>	M0,M1,Bifenotípica	Desfavorável
+11	<i>MLL e FLT3 ITD</i>	M2, M4 e M5	Desfavorável
t(11;17)(q23;q25)	<i>MLL; SEPT9</i>	M4 e M5	Desfavorável
t(11;17)(q23;q21)	<i>ZBTB1;RARA</i>	M3	Intermediário
t(11;19)(q23;p13)	<i>MLL; ELL</i>	M4 e M5	Desfavorável
t/del(11q23)	<i>MLL</i>	M5	Desfavorável
+13	Expressão <i>FLT3</i>	M0 e M1	Desfavorável
t(15;17)(q22;q21)	<i>PML; RARA</i>	M3	Favorável
inv(16), t(16;16), del(16)	<i>MYH11; CFBF</i>	M4E _o	Favorável
t(16;21)(p11;q22)	<i>FUS; ERG</i>	Todos	Desfavorável
i(17)(q10)	?	Todos	Desfavorável
del(20q)	?	Todos	Intermediário
+21	Mutação <i>RUNX1</i>	Todos	Intermediário
+22	<i>BCR</i>	M4	Intermediário
-Y	?	Todos	Intermediário

Quadro 5 – Principais anomalias cromossômicas na LMA

Fonte: Adaptado de HEIM; MITELMAN, 2009.

O critério para o impacto prognóstico dos subgrupos citogenéticos do MRC é amplamente aceito, porém recentemente foi proposto um novo modelo prognóstico baseado em 10 mutações moleculares. Foram identificados cinco subgrupos prognósticos distintos de acordo com o risco e sobrevida global, sendo classificados como: muito favorável: rearranjo *PML-RARA* ou mutação *CEBPA*; favorável: rearranjos *CBFB-MYH11* ou mutação *NPM1* sem *FLT3-ITD*; intermediário: ausência das mutações pesquisadas; desfavorável: mutações *MLL-PTD* e/ou mutação *RUNX1* e/ou mutação *ASXL1*; e muito desfavorável: mutação *TP53* (GROSSMANN et al., 2012).

3.5.2 Citogenética da LLA

Na LLA as células podem ter cariótipo normal (46 cromossomos sem anomalias estruturais evidentes), cariótipo pseudodiplóide (46 cromossomos com anomalias estruturais) e podem ser classificadas de acordo com o número cromossômico modal. Quanto ao número modal são divididas em hiperdiploides (>47 cromossomos) ou hipodiploides (<45 cromossomos). Ganhos e perdas de um cromossomo (trissomias ou monossomias) como únicas anomalias são menos comuns nas LLAs do que nas LMAs (4 e 17% respectivamente). As trissomias dos cromossomos 8 e 21 e a monossomia do cromossomo 20 são as mais frequentemente encontradas (SHAFFER; TOMMERUP, 2005; PULLARKAT, 2008).

Os cariótipos pseudodiploides correspondem a cerca de 40% do padrão cromossômico da LLA sendo que mais de 30 tipos diferentes de anomalias cromossômicas estruturais foram identificadas. Algumas das translocações cromossômicas estão associadas a imunofenótipos distintos e tem implicações no processo neoplásico devido à formação de genes anômalos (PUI et al., 2003; MOORMAN et al., 2010).

O Quadro 6 mostra as principais alterações cromossômicas na LLA, genes envolvidos nos pontos de quebra, associações imunofenotípicas e fator de risco destas alterações (HEIM; MITELMAN, 2009).

Rearranjo	Genes Envolvidos	Imunofenótipo Típico	Prognóstico
Hiperdiploidia(>50)		LLA-comum e Pró-B	Favorável
Hipodiploidia(<46)		LLA-Comum e Pré-B	Desfavorável
+5	?	Pré-B	Desfavorável
t(1;7)(p32;q34)	<i>TRB;TAL1</i>	Linhagem T	Melhor que outras LLA-T
t(1;7)(p34;q34)	<i>TRB; LCK</i>	Linhagem T	?
t(1;14)(p32-34;q11)	<i>TRAD TAL1</i>	Linhagem T	Melhor que outras LLA-T
t(1;19)(q23;p13)	<i>TCF3;PBX1</i>	Pré-B,CD10+clg+	Padrão
dup(1)(q12-21q31-32)	<i>B4GALT3,DAP3,RGS16</i>	Pré-B e Célula B	?
t(2;8)(p12;q24)	<i>IGK;MYC</i>	Célula B	Favorável
t(4;11)(q21;q23)	<i>AFF1;MLL</i>	Pró-B, Bifenotípica	Desfavorável
del(6q)	?	Linhagem B ou T	Padrão
dic(7;9)(p11-13;p11)	Deleção <i>PAX5</i> ?	Pré-B	Variável
t(7;9)(q34-36;q34)	<i>TRB;TAN1</i>	Linhagem T	?
t(7;9)(q34;q32)	<i>TRB;TAL2</i>	Linhagem T	?
t(7;10)(q34;q24)	<i>TRB;TLX1</i>	Linhagem T	Melhor que outras LLA-T
t(7;11)(q34-36;p13)	<i>TRB;LOM2</i>	Linhagem T	?
t(7;19)(q34;p13)	<i>TRB;LYL1</i>	Linhagem T	Desfavorável
t(8;14)(q24;q11)	<i>TCRA/D;MYC</i>	Linhagem T	?
t(8;14)(q24;q32)	<i>IGH;MYC</i>	Célula B	Favorável
t(8;22)(q24;q11)	<i>IGL;MYC</i>	Célula B	Favorável
t/dic(9;12)	<i>ETV6;PAX5</i>	LLA-Comum e Pré-B	Favorável
i(9q)	?	Pré-B	?
t(9;22)(q34;q11)	<i>ABL;BCR</i>	Linhagem B	Muito Desfavorável
t(10;11)(p12;q14)	<i>PICALM;MLLT10</i>	Linhagem T	Desfavorável
t(10;14)(q24;q11)	<i>TRAD;TLX1</i>	Linhagem T	Melhor que outras LLA-T
t(11;14)(p15;q11)	<i>TRAD;LMO1</i>	Linhagem T	?
t(11;14)(p13;q11)	<i>TRAD;LMO2</i>	Linhagem T	?
t(11;19)(q23;p13)	<i>MLL;MLLT1</i>	Bifenotípica	Desfavorável
t(12;17)(p13;q11)	<i>TAF15;ZNF384</i>	LLA-Comum e Pré-B	?
t/del(12p)	<i>ETV6</i>	Linhagem T ou B	?
t(12;21)(p13;q22)	<i>ETV6;RUNX1</i>	LLA-Comum	Favorável
t(14;18)(q32;q21)	<i>IGH;BCL2</i>	Linhagem B	Desfavorável
t(14;21)(q11;q22)	<i>TRA;OLIG2</i>	Linhagem T	?
t(17;19)(q22;p13)	<i>TCF3;HLF</i>	Pré-B	Muito Desfavorável
+21	?	Linhagem B	?

Quadro 6 – Principais anomalias cromossômicas na LLA

Fonte: Adaptado de HEIM; MITELMAN, 2009.

3.6 Infecções bacterianas: multirresistência aos antimicrobianos

Durante a primeira metade do século XX, o desenvolvimento das sulfonamidas e penicilinas revolucionaram o tratamento de infecções bacterianas, levando a uma drástica redução na morbidade e mortalidade. O advento de novas classes de agentes antimicrobianos, tais como, aminoglicosídeos (1944), tetraciclina (1945), cefalosporinas (1948), macrolídeos (1949), glicopeptídeos (1956), quinolonas (1961) e carbapenêmicos (1976) durante a chamada “era de ouro” da descoberta de fármacos antibacterianos, resultou em um uso terapêutico generalizado destes medicamentos (VON NUSSBAUM et al., 2006; SILVER, 2011).

Conseqüentemente, a quimioterapia antibacteriana tornou-se essencial na prática médica e tem contribuído significativamente para a saúde da sociedade moderna e uma maior expectativa de vida (WHITE, 2011; PIDDOCK, 2012). Apesar disso, as doenças infecciosas, tais como infecções respiratórias, doenças diarreicas, infecção pelo vírus HIV, tuberculose e malária, continuam entre as principais causas de morte segundo a OMS (OMS, 2008). Somente as infecções bacterianas são responsáveis por 17 milhões de óbitos no mundo, especialmente em crianças e idosos (BUTLER; BUSS, 2006).

O desenvolvimento de novos agentes antibacterianos não tem acompanhado o grande crescimento de casos de resistência bacteriana, fazendo-se necessário desenvolver novos antibióticos, com diferentes mecanismos de ação que não sejam reconhecidos pelas bactérias (BUTLER; BUSS, 2006; ROCHA et al., 2011).

A coordenação de metais a fármacos tem se mostrado uma boa estratégia de combate à resistência bacteriana. A interação entre um íon metálico e um ligante possibilita a obtenção de compostos com ampla variedade de números de coordenação, estados de oxidação e geometrias. Além disso, as características intrínsecas ao íon metálico, adicionadas aos aspectos cinéticos e termodinâmicos do composto sintetizado permitem obter estruturas moleculares que possuem um amplo espectro de reatividade e isto deve ser bem explorado (PANTCHEVA et al., 2008; ROCHA et al., 2011).

Como demonstrado por Rocha et al. (2011), vários compostos exibiram melhor atividade quando complexados a metais. Complexos de paládio(II), onde o íon Pd(II) foi coordenado a tetraciclina ou doxiciclina, apresentou maior atividade

antibacteriana contra a linhagem resistente *Escherichia coli* HB101/PBR322, mostrando-se mais potente que a droga livre, porém ainda não foi elucidado o modo de ação com que os complexos ativos conseguiram vencer os mecanismos de resistência aos antibióticos testados.

Embora novos fármacos estejam em desenvolvimento, existe uma carência que não satisfaz adequadamente as crescentes necessidades médicas. Além disso, na sua grande maioria, os antibióticos usados atualmente são derivados de classes mais antigas já utilizadas e, portanto, sujeitos aos mecanismos existentes de resistência bacteriana (APPELBAUM, 2012; CHOPRA, 2012).

A resistência crescente de patógenos hospitalares, como o *Staphylococcus aureus*, a diversos antibióticos de primeira escolha, bem como, a rápida emergência de multirresistência em bactérias gram-negativas, como a *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases (KPC) tem preocupado a comunidade médica (BUTLER; BUSS, 2006; SOARES, 2012).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são considerados microrganismos multirresistentes, aqueles que resistem a diferentes classes de antimicrobianos testados em exames microbiológicos de rotina. Dentre os principais patógenos multirresistentes causadores de infecções/colonizações estão: *Enterococcus* spp. resistente aos glicopeptídeos, *Staphylococcus* spp. resistente ou com sensibilidade intermediária à vancomicina, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos (ertapenem, meropenem ou imipenem) (BRASIL, 2010).

A metodologia padrão recomendada para a avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* é a de microdiluição em caldo, normatizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), com os antimicrobianos disponíveis comercialmente (CLSI, 2012). A CIM é definida como a menor concentração do composto capaz de inibir a multiplicação bacteriana (ação bacteriostática). A partir da CIM, pode-se determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM), que é a menor concentração capaz de matar a bactéria (ação bactericida). Geralmente, as concentrações testadas para produtos sintéticos puros ou fármacos variam em uma faixa de 0,125 a 512 µg/mL (CLSI, 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização da amostra

Foram avaliadas um total de 22 amostras de células mononucleares de medula óssea (MO). Destas, 21 amostras eram constituídas por células de pacientes com leucemia, no momento do diagnóstico ou da recidiva, sendo oito com LLA, nove com LMA, duas com LMC e duas com SMD em transformação leucêmica; e uma amostra de MO com células mononucleares normais de paciente atendido no Serviço de Hematologia-Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria.

O diagnóstico e a classificação das leucemias foram baseados em dados clínicos, hematológicos, critérios de classificação citomorfológica proposto pelo grupo FAB, imunofenotipagem e citogenética convencional.

As amostras de aspirado de MO foram coletadas pelos profissionais do Serviço de Hematologia-Oncologia e eram excedentes das rotinas de diagnóstico dos pacientes. Não foram coletadas amostras específicas para a pesquisa.

4.2 Compostos Triazenos

Foram testados os seguintes compostos triazenos sintetizados no Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos (NITriCo), Laboratório de Química Inorgânica da UFSM pelo aluno de doutorado Gustavo Luiz Paraginski, do curso de Pós-Graduação em Química, área Química Inorgânica/CCNE/UFSM, orientado pelo Professor Doutor Manfredo Hörner:

1 - Bis[1,3-bis(2-clorofenil)triazenido- $\kappa N^{11}, N^{13}$ - μ -O-metóxi-piridina- κN -cobre(II)]

$C_{36}H_{34}N_8O_2Cl_4Cu_2$

Peso molecular = 877,60 g/mol

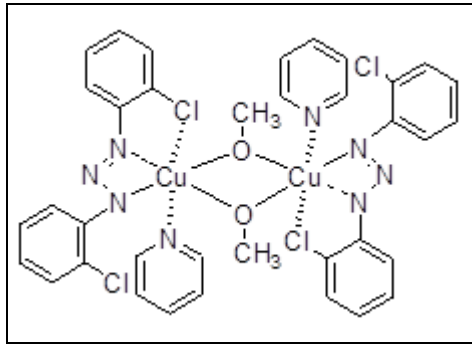


Figura 4 – Estrutura molecular do composto **1**

2 - Bis[1,3-bis(2-fluorfenil)triazenido- $\kappa N^{11}, N^{13}$ - μ -O-hidróxi-piridina- κN -cobre(II)]

$C_{34}H_{28}N_8O_2F_4Cu_2$

Peso molecular = 783,72 g/mol

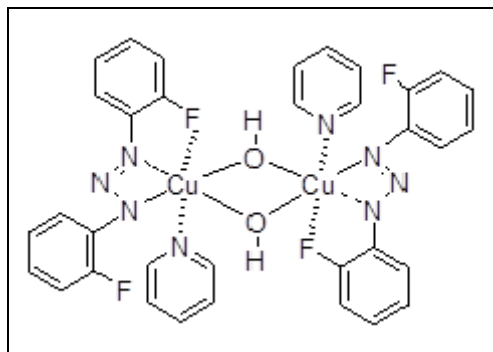


Figura 5 – Estrutura molecular do composto **2**

4.3 Separação de células mononucleares

Amostras de MO foram coletadas em seringa heparinizada e as células mononucleares separadas em gradiente de densidade (Ficoll-Paque PLUS – GE Healthcare). Após esse procedimento, as células foram lavadas três vezes e ressuspensas em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640-Sigma). Parte da amostra foi cultivada para citogenética e amostra excedente foi destinada a cultura para o ensaio MTT.

4.4 Teste de viabilidade celular

As células mononucleares foram adicionadas a solução de azul de tripan (Merck®) 0,5%, em solução salina tamponada com fosfatos (PBS, pH 7,4). Após homogeneização, a amostra foi observada ao microscópio óptico com objetiva de 40x para ajuste de concentração e verificação de viabilidade, sendo descartadas as amostras com viabilidade inferior a 80%.

4.5 Avaliação da citotoxicidade em células leucêmicas *in vitro*

A citotoxicidade foi analisada através do método do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), descrito por Mosmann (1983), utilizando células de LLA, LMA, LMC e SMD. O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal MTT (coloração amarela) para formazan (coloração púrpura), pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável, permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células vivas. Esta técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, avaliando assim a citotoxicidade.

As células leucêmicas foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF-Gibco®), por 24 h a 37 °C em 5% de CO₂.

As células em suspensão foram distribuídas em placas de 96 poços na concentração de 3×10^6 células/poço, incubadas com os compostos em diferentes concentrações por 20 horas a 37 °C em 5% de CO₂. Após foram acrescentados 10 µL da solução de MTT (5 mg/mL) às culturas tratadas, e estas incubadas por um período de 4 horas a 37 °C em 5% de CO₂. Após o período total de incubação, 24 horas, retirou-se o sobrenadante e foram adicionados 100 µL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO). A densidade óptica (DO) de cada poço foi obtida no comprimento de onda de 570 nm, em leitor de microplacas *Epoch*[®] possibilitando determinação do potencial citotóxico de cada substância testada em relação ao controle não tratado. Os ensaios foram realizados em triplicatas com os compostos nas concentrações de 12,5 µmol/mL, 50 µmol/mL e 100 µmol/mL.

A viabilidade celular foi calculada pela seguinte fórmula: DO das células tratadas/DO das células não tratadas x 100 = %

4.5.1 Determinação da IC₅₀

Os resultados dos valores de absorvância foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular onde as células sem os compostos corresponderam a 100% de viabilidade. A análise de regressão não linear foi realizada nos resultados de viabilidade, utilizando-se o programa estatístico *GraphPad Prizm 5*, resultando em uma equação usada para calcular a concentração do composto necessária para produzir 50% de redução de viabilidade celular (IC₅₀).

4.6 Análise citogenética das amostras de medula óssea

Para a obtenção dos cromossomos metafásicos em amostras de MO, foi utilizado o método descrito por Swansbury (2003) com modificações, conforme descrito a seguir:

O cariótipo foi realizado através de cultura de curta duração sem mitógenos. Incubou-se as células mononucleares da MO em meio de cultura RPMI

suplementado com 10% de soro fetal bovino por 16 a 24 h a 37°C. Após foi adicionado Colchicina (0,1µg/mL) por 1 h a 37°C. Em seguida, as células foram tratadas com solução hipotônica (KCl 0,075mol/L), por 45 minutos a 37°C, e ressuspensas em fixador de *Carnoy* (metanol: ácido acético 3:1), por três vezes. Esse material foi distribuído sobre lâminas, encaminhado para bandeamento G por tripsina-Giemsa e posterior análise cromossômica (Figura 6). Vinte metáfases foram analisadas e capturadas pelo sistema de imagem *Applied Imaging CytoVision*[®]. As anormalidades cromossômicas foram descritas de acordo com o *International System for Human Cytogenetic Nomenclature: ISCN 2005*.

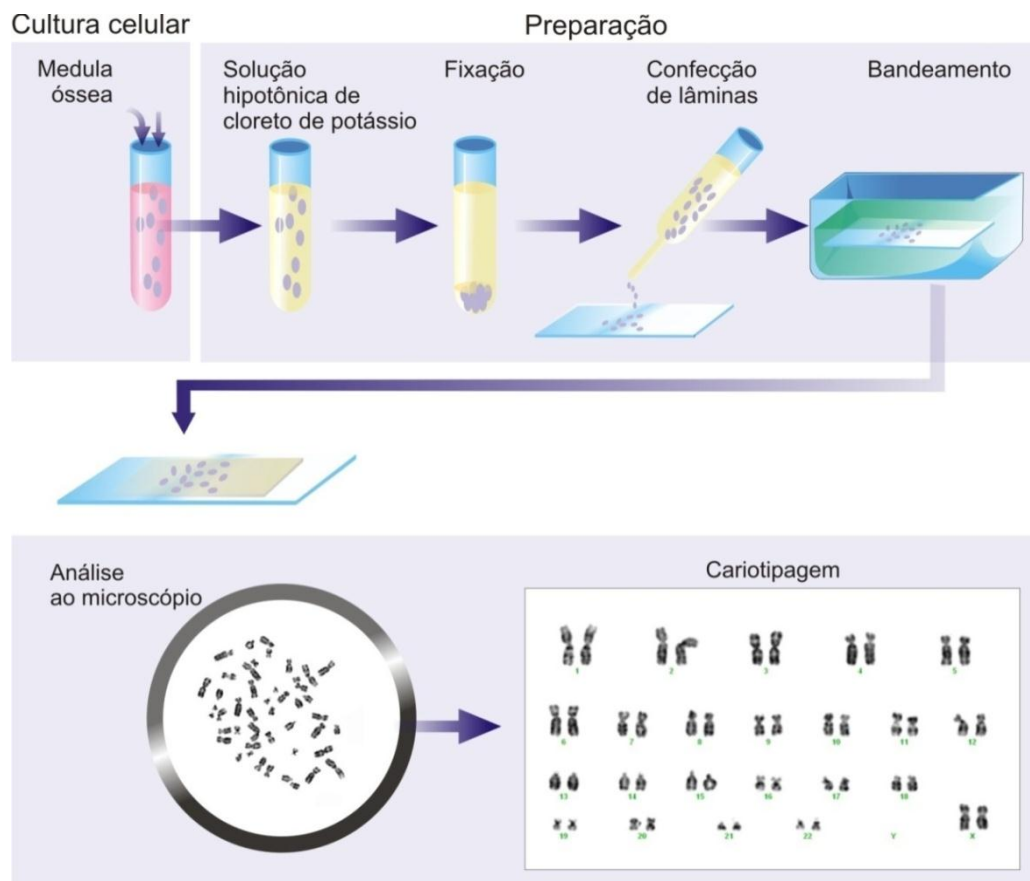


Figura 6 – Método para análise citogenética.

Fonte: Adaptado de PASSARGE, 2004.

4.7 Análise estatística

O procedimento metodológico adotado foi o de uma pesquisa exploratória e descritiva, a apresentação dos resultados envolveu a estatística descritiva com a distribuição de frequências simples e relativa, bem como medidas de tendência central e de variabilidade (média e desvio-padrão).

Na avaliação da comparação do cariótipo normal e alterado em relação às demais variáveis, foi testada a normalidade de cada variável e analisado o tipo de teste a ser utilizado. Como eram dois grupos independentes, quando os dados demonstraram-se normais foi aplicado teste t, e quando não seguiam uma distribuição normal, foi aplicado o teste Mann Whitney. A mesma análise foi feita para comparar as demais variáveis em relação ao diagnóstico (LLA e LMA) e em relação ao *status* (diagnóstico ou recidiva).

Para avaliar os dados referentes às diferentes concentrações do composto 1 foi aplicado o teste de normalidade dos dados, sendo que todos demonstraram-se normais, sendo aplicado o teste t pareado. O mesmo procedimento foi realizado para o composto 2.

Quando avaliada a comparação da viabilidade celular nas mesmas concentrações de cada um dos compostos, foi aplicado novamente o teste t pareado para verificar a eficiência de cada composto nessas concentrações. Foi estabelecido o nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

Os dados referentes ao presente estudo foram processados e analisados de forma eletrônica a partir da construção de um banco de dados (Excel[®] 2007) e de um programa de análise específico para o cumprimento dos objetivos da pesquisa, o software *Statistical Package for Social Science 15.0* (SPSS).

4.8 Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro*

4.8.1 Cepas bacterianas

A atividade antimicrobiana dos complexos **1** e **2** foi avaliada *in vitro* frente aos seguintes microrganismos padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos resistentes a múltiplos antimicrobianos (MDR): cepas bacterianas gram positivas: *Micrococcus luteus* 7468, *Enterococcus faecalis* 51299, *Enterococcus faecalis* 29212, *Staphylococcus saprophyticus* 15305, *Staphylococcus aureus* 25923, *Staphylococcus epidermidis* 12228, *Bacillus cereus* 14579; e gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa* 27859, *Klebsiella pneumoniae* 700603, *Escherichia coli* 35218, *Salmonella thyphymurium* 14028.

Os isolados clínicos MDR foram oriundos de amostras de sangue periférico (1, 2, 4, 5, 9 e 10), escarro (3), urina (6) e secreção traqueal (7 e 8) (Quadro 7). Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram realizados seguindo os padrões do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), mostrando que a maioria das bactérias foram sensíveis a apenas um a três antimicrobianos. Testes genotípicos mostraram expressão dos genes *mecA* (1, 2, 9 e 10), *icaD*, produtor de biofilme (9 e 10), *ermI* (1) e fenótipo de betalactamase de espectro estendido (ESBL) (4), em algumas bactérias.

As cepas bacterianas e os isolados clínicos foram armazenados a -20°C no banco de microrganismos do Laboratório de Bacteriologia no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFSM.

Antimicrobiano	1. <i>S.aureus</i>	2. <i>S.aureus</i>	3. <i>P.aeruginosa</i>	4. <i>K.pneumoniae</i>	5. <i>K. pneumoniae</i>	6. <i>E. coli</i>	7. <i>A.baumannii</i>	8. <i>A.baumannii</i>	9. <i>S. epidermidis</i>	10. <i>S. epidermidis</i>
Amicacina	-	-	R	R	I	R	R	I	-	-
Amoxicilina/Clavulonato	R	R	-	R	R	R	-	-	-	-
Ampicilina/Sulbactam	R	R	-	R	R	R	R	I	-	-
Ampicilina	Blac	Blac	-	R	R	R	-	R	-	-
Aztreonam	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-
Cefazolina	R	R	-	-	-	-	R	R	-	-

Cefalotina	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-
Cefepime	-	-	-	R	R	R	-	-	-	-
Ceftazidime	-	-	R	R	R	R	R	R	-	-
Ceftriaxona	R	R	-	R	-	-	-	-	-	-
Cefoxitina	-	-	-	-	-	-	R	R	R	R
Cefuroxime	-	-	-	-	R	R	-	-	-	-
Ciprofloxacino	-	-	R	R	R	R	R	R	S	S
Clindamicina	R	R	-	-	-	-	-	-	S	S
Daptomicina	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritromicina	R	R	-	-	-	-	R	R	S	R
Ertapenem	-	-	R	S		R	-	-	-	-
Gentamicina	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
Imipenem	R	R	R	S	S	S	R	I	-	-
Levofloxacino	R	R	-	-	R	R	R	R	S	S
Linezolida	S	S	-	-	-	-	-	-	S	S
Meropenem	R	R	R	S	S	-	R	R	-	-
Nitrofurantoína	-	-	-	-	-	R	-	-	S	S
Norfloxacino	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S
Oxacilina	R	R	-	-	-	-	-	-	R	R
Penicilina G	Blac	Blac	-	-	-	-	-	-	R	R
Piperacilina/Tazobactam	-	-	-	-	R	R	-	-	-	-
Polimixina B	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-
Rifampicina	R	R	-	-	-	-	-	-	S	S
Sulfametoxazol/trimetropina	R	S	-	R	R	R	R	R	R	S
Teicoplanina	-	S	-	-	-	-	-	-	S	S
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R
Ticarcilina/Clavulonato	-	-	R	-	R	S	R	R	-	-
Tigeciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	R	S
Tobramicina	-	-	R	-	R	R	S	S	-	-
Vancomicina	S	-	-	-	-	-	-	-	S	S

Quadro 7– Perfil de sensibilidade dos isolados clínicos MDRs

R: resistente, S: sensível, I: intermediário, Blac:Beta-lactamase positiva; -: não testado

4.8.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM, definida como a menor concentração do composto que impede o crescimento visível do microrganismo, foi determinada em caldo Mueller Hinton (Difco) seguindo-se o método padrão de microdiluição em caldo, recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Os compostos foram dissolvidos em quantidades equivalentes de água ultrapura estéril e etanol (1:1) e testados nas concentrações de 0,25 a 128 µg/mL. Placas de 96 poços, contendo meio de cultura inoculado com bactérias e diferentes concentrações dos compostos, foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas. Em paralelo, foram realizados os controles positivo e negativo. O primeiro contendo apenas o meio de cultura e o microrganismo de interesse, e o segundo contendo o composto sem o microrganismo.

Os testes foram realizados em duplicata e a leitura visual realizada para determinação da CIM como a menor concentração do composto que inibiu completamente o crescimento dos microrganismos nos poços.

4.9 Considerações Éticas

Este estudo foi avaliado pelo Comitê de Ética, Protocolo CEP – UFSM: 23081.012084/2008-32; Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE): 0169.0.243.000-08.

A garantia de proteção dos sujeitos de pesquisa e confidencialidade em relação a todas as informações pessoais advindas do presente estudo foi assegurada através do Termo de Confidencialidade (Apêndice), assinado pelos pesquisadores.

O trabalho foi realizado juntamente com o setor de Hematologia-Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria e teve o apoio do CNPq, processo número 483902/2011.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da atividade citotóxica dos compostos 1 e 2

No presente estudo avaliamos o potencial citotóxico *in vitro* dos compostos **1** e **2** em células leucêmicas de medula óssea. Os resultados aqui apresentados demonstraram que os compostos induziram citotoxicidade nas células testadas. O perfil das amostras estudadas, a descrição dos cariótipos das células, a viabilidade celular frente aos compostos **1** e **2**, e a IC_{50} dos compostos estão descritos no Quadro 8.

Caso	S	Idade	Diag	Status	Citogenética	Progn	% Viabilidade Celular						IC ₅₀ (µM)	
							Composto 1			Composto 2			1	2
							100	50	12,5	100	50	12,5		
1	M	35	LMA M3	diag	46,XY,t(15;17)(q22;q12)	Fav	15	38	77	77	75	74	30.03	211.5
2	F	57	Normal	diag	46,XX	NA	71	70	100	82	85	98	192.0	396.2
3	M	55	SMD t	diag	46,XY	Int	36	44	46	74	69	69	26.0	161.0
4	F	13	LLA-B	rec	62~65,XXX,dup(1)(q12q44)[5],+5[4],+7[4],+7[4]+8[2],+9[4],t(9;22)(q34;q11)[6],+12[2],+13[4],+14[4],+15[2],+der(16)t(1;16)(q23;q24)[6],+18[4],+21[4],+22[3],+der(22)t(9;22)[5],+der(22)t(9;22)[4][cp07]	Desf	21	16	93	100	90	77	28.64	1406
5	F	26	LMC	diag	46,XX,t(9;22)(q34;q11)	SVP	24	25	36	53	50	55	10.43	51.90
6	M	82	SMD t	diag	mn(40~44)[14]/mn(70~80)[09]/mn(81~87)[02]	Desf	30	25	38	76	69	75	11.97	179.8
7	M	64	LLA-T	diag	Pobre em metáfases	NA	81	72	80	96	89	98	236.7	1170
8	M	66	LMA M2	diag	44~45,XY,del(4)(q24),-7[5],-15[9],-16[4],-18[8],+r[7],+mar[6][cp10]	Desf	30	45	58	68	100	100	31.05	334.8
9	M	51	LMA M5	rec	46,XY	Int	45	48	47	63	52	88	35.57	99.12
10	F	49	LMA M5	diag	46,XX	Int	63	74	72	89	73	66	135.7	294.3
11	M	52	LMA M2	diag	46,XY	Int	62	79	72	100	81	80	146.6	867.1
12	M	53	LMA M2	diag	46,XY	Int	18	34	88	58	67	100	33.93	130.2
13	F	70	LMA M4	diag	46,XX,16qh+	Int	32	43	53	73	80	87	27.78	230.0
14	F	61	LLA-B	diag	45,XX,-10	Desf	04	14	21	27	18	31	3.857	7.919
15	M	13	LLA-T	rec	45~47,XY,del(4)(q31)[4],+8[4],del(11)(q23)[3],-22[3],+mar[4][cp05]/46,XY[06]	Desf	30	28	72	77	74	65	28.4	192.0
16	M	8	LLA-B	rec	51,XY,+1[3],+3[8],+10[6],add(14)(q32)[8],del(14)(q32)[8],+i(17)(q10)[8],+mar1[8],+mar2[7],+mar3[5][cp09]/46,XY[1]	Desf	25	21	64	60	54	71	20.33	81.84
17	M	12	LLA-T	diag	46,XY	Int	53	69	60	82	63	74	85.96	187.5
18	F	18	LLA-B	rec	46,XX	Int	25	23	77	100	79	72	26.51	711.6
19	M	45	LMC	Fase aceler	48,XY,+8,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)	Desf	18	16	45	50	45	44	10.96	34.12
20	F	4	LLA-B	diag	46,XX	Int	26	29	60	76	67	68	21.95	161.9
21	M	73	LMA M4	diag	46,XY,del(16)(q23)	Fav	20	22	64	65	65	67	19.51	112.9
22	M	77	LMA M4	diag	46,XY	Int	69	62	62	100	89	60	111.8	994.7

Quadro 8 – Perfil das amostras, citogenética, viabilidade celular e IC₅₀

S: Sexo M: Masculino F: Feminino LMA: Leucemia Mieloide Aguda LLA: Leucemia Linfoide Aguda SMD t: Síndrome Mielodisplásica transformada LMC: Leucemia Mieloide Crônica Diag: Diagnóstico Prog: Prognóstico Fav: Favorável Int: Intermediário Desf: Desfavorável SVP: Sem valor prognóstico NA: Não se aplica.

A Tabela 1 mostra o perfil das células estudadas. Os resultados demonstram que a maioria das amostras analisadas foi oriunda de pacientes do sexo masculino (63,6%). Em relação a idade, verificou-se que média de idade foi de 44,73 anos (DP=24,53), com idade mínima de 4 anos e máxima de 82 anos, apresentando mediana de 51,50 anos.

Verificou-se que 72,8% (16/22) das amostras foram de células ao diagnóstico, isto é, sem tratamento quimioterápico prévio; 22,7% (5/22) células de pacientes em recidiva, sendo três amostras na vigência do tratamento, e duas amostras, de pacientes com recidiva tardia de LLA e LMA, que se encontravam há um ano e um mês, e um ano e quatro meses fora de tratamento, respectivamente. As recidivas de LLA durante o tratamento, em fase de manutenção, estavam em uso dos quimioterápicos metotrexato, mercaptina, prednisona e vincristina, e a amostra de LMC em fase acelerada (1/22), mesilato de imatinibe.

Tabela 1 – Análise descritiva dos dados do perfil das amostras estudadas

	Frequência	Percentual (%)
Sexo		
Feminino	8	36,4
Masculino	14	63,6
Status		
Diagnóstico	16	72,8
Recidiva	5	22,7
Fase acelerada	1	4,5
Cariótipo		
Alterado	10	45,5
Normal	12	54,5
Prognóstico		
Favorável	2	9,1
Desfavorável	7	31,8
Intermediário	10	45,5
SVP	3	13,6
Diagnóstico		
LLA	8	36,4
LMA	9	40,9
LMC	2	9,1
SMD	2	9,1
Normal	1	4,5

O diagnóstico mais frequente foi de LMA, com 40,9%, seguido de LLA com 36,4%. O prognóstico intermediário foi o que mais predominou, 45,5% dos casos, todos com cariótipo normal.

A descrição dos cariótipos, alterados em 10 pacientes, representando 45,5% dos casos, encontram-se no Quadro 8. As alterações cromossômicas encontradas foram as seguintes: hiperdiploidia (número superior a 47 cromossomos), hipodiploidia (número cromossômico inferior a 45), trissomia, monossomia, translocação (t), deleção (del), isocromossomo (i), duplicação (dup), fragmento adicional (add), cromossomo em anel (r) e cromossomo marcador (mar). Em alguns casos verificou-se cariótipo complexo (mais de três alterações) nas células analisadas.

A análise citogenética pode identificar grupos biologicamente distintos, requerendo, muitas vezes, uma abordagem terapêutica diferenciada (PULLARKAT, 2008). As anormalidades genéticas podem representar um dos primeiros eventos de processo leucêmico, tendo forte influência na patogênese das leucemias (GRIMWADE; HILLS, 2009).

A frequência de cariótipos normais nas leucemias varia na literatura, mesmo quando o estudo é prospectivo e incluído um grande número de pacientes (POMBO DE OLIVEIRA, 2008).

Em estudo de Moorman et al (2010), com 1725 pacientes com LLA-B na infância (1-18 anos), foi demonstrado que 15% apresentaram cariótipo normal. Em 200 casos de LLA em adultos (15-65 anos), Pullarkat et al. (2008) encontraram 22% das amostras sem anormalidades cariotípicas.

Nas LMAs, aproximadamente 60% dos pacientes ao diagnóstico revelam análise citogenética com cariótipo alterado (GRIMWADE; HILLS, 2009). Velloso et al. (2011) em uma revisão e descrição de casos, verificaram que em LMA, 36% apresentaram cariótipo normal. Quando relacionados ao subtipo FAB, Bacher et al. (2005), demonstraram que 37,8% apresentaram cariótipo normal, excluindo M3.

No HUSM, em estudo de Oliveira et al (2012), 90% dos pacientes pediátricos e 56% dos pacientes adultos com LMA, apresentaram alterações cromossômicas.

Nossos resultados encontram-se um pouco abaixo dos percentuais citados, pois este trabalho foi efetuado com amostras de células mononucleares de MO que excederam da rotina, não sendo, portanto, um estudo da prevalência, como nos estudos referidos, porém, poderão ser analisados com outras técnicas, como FISH

e/ou PCR, para identificação de rearranjos moleculares, crípticos à citogenética convencional.

Ao avaliarmos os compostos e concentrações testadas em relação aos cariótipos das células (Tabela 2), podemos verificar que existiu diferença significativa no percentual de viabilidade celular entre células com cariótipo alterado e normal, em relação ao composto **1**, na concentração de 50 e 100 μM . Sendo que nestas concentrações (50 e 100 μM), a menor média de viabilidade celular foi encontrada para o cariótipo alterado.

Para o composto **2**, em todas concentrações (12,5, 50 e 100 μM) e na concentração de 12,5 μM do composto **1**, não existiu diferença significativa em relação ao cariótipo normal ou alterado. Nota-se ainda que quase todas as concentrações têm a menor média de viabilidade celular para o cariótipo alterado. Então podemos referenciar que as células com alterações cromossômicas são mais sensíveis, isto é, apresentaram menor viabilidade que as células sem alterações cariotípicas, nas concentrações de 50 e 100 μM do composto **1**.

Tabela 2 – Análise comparativa dos compostos e concentração em relação à viabilidade celular (%) e IC_{50} (μM) com os cariótipos analisados

Composto Concentração (μM)	Cariótipo		p-valor
	Alterado VC % Média (DP)	Normal VC % Média (DP)	
1/12,5	58,91 (21,80)	67,00 (16,85)	0,342
1/50	29,27 (17,01)	52,27 (19,44)	0,008
1/100	27,09 (19,48)	45,45 (19,15)	0,037
2/12,5	68,82 (20,53)	78,55 (13,60)	0,205
2/50	66,27 (23,58)	73,18 (10,85)	0,388
2/100	68,09 (20,82)	81,55 (14,62)	0,095
IC_{50} 1	39,29 (66,13)	76,71 (60,81)	0,182
IC_{50} 2	343,88 (478,98)	384,87 (320,75)	0,816

VC- Viabilidade celular

Avaliando os resultados da Tabela 3, onde comparou-se a citotoxicidade (IC_{50}) em relação aos diferentes tipos de leucemia, podemos verificar que não existiu diferença estatística significativa de diagnóstico (LLA e LMA) em relação ao IC_{50} dos compostos **1** e **2**, mostrando que tanto as células de origem linfóide quanto mieloide

apresentaram resposta antiproliferativa semelhante diante dos compostos, quando analisados individualmente. Porém ao compararmos os dois compostos verificamos grande diferença na IC₅₀. O composto **1** foi 8,6 vezes mais ativo que o composto **2** em células de LLA e 5,7 vezes mais ativo que o composto **2** em células de LMA, refletindo maior capacidade citotóxica do composto **1**.

Tabela 3 – Comparação da citotoxicidade (IC₅₀) em relação aos diferentes tipos de leucemia

Compostos	Diagnóstico		p-valor
	LLA	LMA	
	IC ₅₀ Média (DP)	IC ₅₀ Média (DP)	
1	56,54 (76,60)	63,58 (51,80)	0,826
2	489,84 (539,51)	363,85 (332,73)	0,566

Avaliando os resultados de viabilidade celular do composto **1** (Tabela 4) nas células analisadas verificou-se que existe diferença significativa de percentual de viabilidade celular entre as diferentes concentrações. Então entre as concentrações do composto **1**, a melhor atividade antiproliferativa foi encontrada na concentração de 100 µM, pois apresentou um menor percentual de viabilidade, demonstrando alto potencial citotóxico.

Tabela 4 – Análise da viabilidade celular frente ao composto **1** nas diferentes concentrações 12.5, 50 e 100 µM, utilizando o teste t-pareado

Composto	Viabilidade %		p-valor
	12.5	50	
1	12.5	50	0,0001
Média (DP)	62,95 (19,46)	40,77 (21,36)	
1	12.5	100	0,0001
Média (DP)	62,95 (19,46)	36,27 (21,09)	
1	50	100	0,031
Média (DP)	40,77 (21,36)	36,27 (21,09)	

Efetuada a mesma análise descrita acima para o composto **2** (Tabela 5), podemos notar que houve diferença significativa apenas entre as concentrações de 50 e 100 μM , com percentuais que demonstram fraco potencial citotóxico.

Tabela 5 – Análise da viabilidade celular frente ao composto **2** nas diferentes concentrações 12.5, 50 e 100 μM , utilizando-se o teste t-pareado

Composto	Viabilidade %		p-valor
2	12.5	50	
Média (DP)	73,68 (17,71)	69,73 (18,26)	0,206
2	12.5	100	
Média (DP)	73,68 (17,71)	74,82 (18,86)	0,790
2	50	100	
Média (DP)	69,73 (18,26)	74,82 (18,86)	0,048

Na Tabela 6 comparamos os compostos **1** e **2** nas diferentes concentrações. Observamos que em todas as concentrações houve diferença estatística significativa entre **1** e **2**. Para a concentração 12.5 μM , o menor percentual de viabilidade foi encontrada para o **1**, o que também ocorreu na concentração 50 e 100 μM .

Ainda verificou-se que na comparação entre a menor concentração de **1** (12.5) e a maior concentração de **2** (100), existiu diferença estatística significativa, sendo que o percentual de viabilidade do **1** na concentração de 12.5 μM é menor do que o **2** na concentração de 100 μM , portanto, o composto **1** tem uma capacidade maior de inibir o crescimento das células do que o composto **2**.

Tabela 6 – Comparação entre os compostos **1** e **2** nas diferentes concentrações

Variáveis	Viabilidade%		p-valor
	1	2	
12.5 μM			
Média (DP)	62,95 (19,46)	73,68 (17,71)	0,006
50 μM			
Média (DP)	40,77 (21,36)	69,73 (18,26)	0,0001
100 μM			
Média (DP)	36,27 (21,06)	74,82 (18,86)	0,0001
	1 12.5 μM	2 100 μM	
Média (DP)	62,95 (19,46)	74,82 (18,86)	0,003

Os compostos estudados possuem dois núcleos triazenos (bistriazenos) complexados com Cobre (Cull). As principais diferenças entre os compostos **1** e **2** são os radicais introduzidos a eles. Este resultado sugere que a substituição do átomo de fluor (F) pelo cloro (Cl), e/ou o grupo hidróxi (H) pelo metóxi (CH₃) confere maior atividade antileucêmica do composto **1** nas células testadas. Estes achados se assemelham ao estudo com compostos triazenos realizado por Domingues et al. (2010), em que compostos com cloro também foram mais ativos que compostos com fluor, em células leucêmicas mielóides. Ainda em relação aos átomos Cl e F, Cimbora-Zovko et al. (2011) estudaram uma nova classe de 1,3 diaryltriazenos, testando-os como agente antitumoral. Neste estudo, vários radicais foram substituídos para avaliação da atividade antiproliferativa frente a células tumorais HeLa, entre outras; os compostos tiveram a citotoxicidade aumentada quando foram introduzidos grupos acyl (R'C-O) juntamente com grupos doadores de elétrons bromo(Br), cloro(Cl) e trifluorometil (CF₃), enquanto o grupo fluor (F) foi menos ativo.

Segundo Fontes, César e Beraldo (2005), no mecanismo de ação da cisplatina, os complexos, antes de alcançar as células, passam por reações de substituição, sendo a mais importante a reação de hidrólise. Do lado externo da célula, no plasma sangüíneo, a concentração de cloreto é alta (cerca de 100 mmol/L), o que impede a hidrólise dos ligantes cloretos, e mantém a cisplatina no estado neutro. Após entrar na célula, a redução na concentração de cloreto (cerca de 4 mmol/L) permite a hidrólise do complexo, formando outras espécies que podem reagir mais prontamente podendo atingir alvos moleculares, como o DNA, RNA e proteínas (FONTES; CÉZAR e BERALDO, 2005).

Portanto, sugere-se que a atividade antiproliferativa de novos compostos depende do tipo de substituinte introduzido a determinadas posições da molécula para potencializar sua ação citotóxica.

Na Tabela 7 analisamos os compostos **1** e **2** em relação ao *status*: diagnóstico e recidiva. Podemos verificar que houve diferença estatística significativa entre células ao diagnóstico e recidiva, para o composto **1**, na concentração 50 µM, onde o percentual de viabilidade celular na recidiva foi menor que no diagnóstico e para a IC₅₀ do composto **1**, onde o percentual de viabilidade também foi menor na recidiva que no diagnóstico. Para as demais variáveis não houve diferença significativa entre diagnóstico e recidiva.

Tabela 7 – Análise da viabilidade celular e IC₅₀ dos compostos **1** e **2** em relação ao *status*: diagnóstico x recidiva.

Composto Concentração μM	<i>Status</i>		p-valor
	Diagnóstico VC% Média (DP)	Recidiva VC% Média (DP)	
1 12,5	61,69 (20,27)	70,60 (16,92)	0,350
1 50	46,56 (21,44)	27,20 (12,39)	0,027
1 100	39,63 (23,38)	29,20 (9,39)	0,386
2 12,5	75,25 (18,91)	74,60 (8,62)	0,592
2 50	71,25 (18,75)	69,80 (16,41)	0,879
2 100	74,75 (18,66)	80,00 (19,35)	0,942
1 IC ₅₀	70,35 (37,63)	27,89 (5,45)	0,034
2 IC ₅₀	343,23 (349,35)	498,11 (569,21)	0,465

5.1.1 Comparação da atividade citotóxica dos compostos **1** e **2** com antineoplásicos em relação aos tipos celulares testados.

Na comparação dos compostos **1** e **2** com etoposide, carboplatina, vinorelbine e daunorrubicina em diferentes tipos celulares, consideramos que valores menores que 40% de viabilidade celular apresentaram alta citotoxicidade em relação ao composto testado, valores entre 41 e 59%, moderada citotoxicidade e, acima de 60%, fraca citotoxicidade (FINN et al., 2007).

Em células leucêmicas mieloides de LMA (Figura 7), o composto **1** mostrou-se com maior atividade antiproliferativa do que o composto **2** e os antineoplásicos testados, sendo altamente citotóxico (22 e 20% de viabilidade nas concentrações de 50 e 100 μM). O composto **2** apresentou fraca citotoxicidade (ambas concentrações com 65% de viabilidade) e os antineoplásicos etoposide - 99 e 100% , carboplatina - 92 e 90%, vinorelbine - 100 e 60%, fraca citotoxicidade ; e daunorrubicina - 60 e 48%, moderada citotoxicidade (Figura 8).

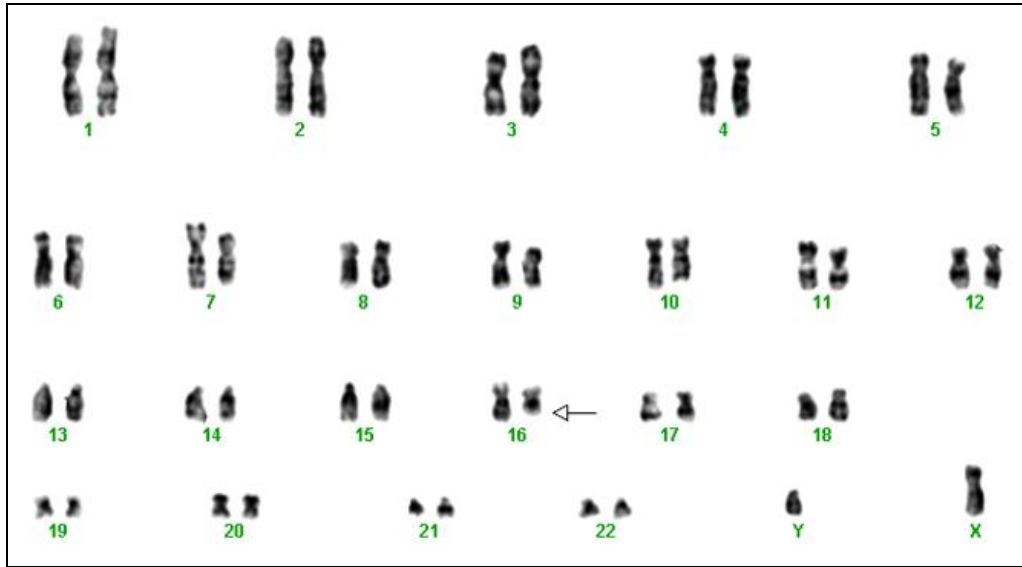


Figura 7 – Cariótipo (caso 21): 46,XY,del(16)(q23)

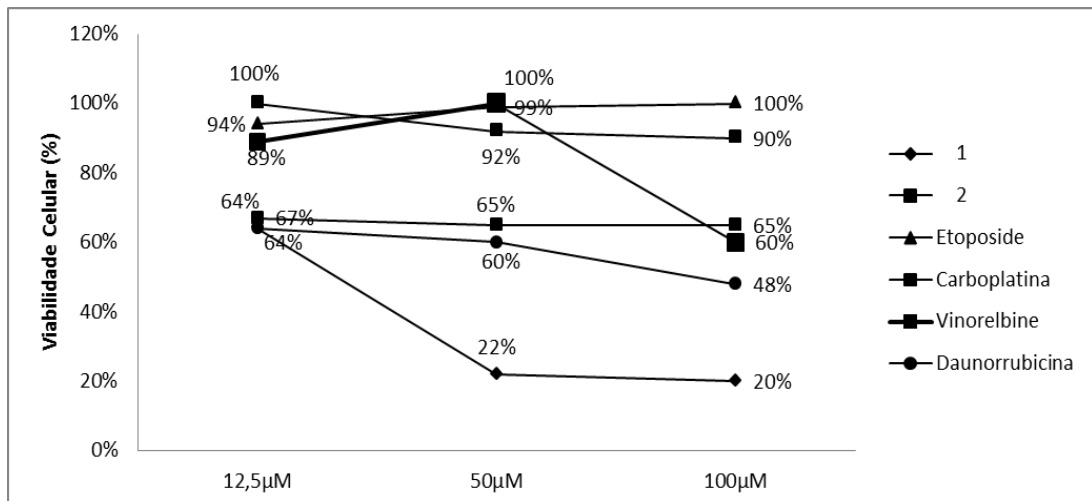


Figura 8 – Viabilidade celular de células mieloides de MO (caso 21) frente a diferentes concentrações dos compostos **1**, **2** e antineoplásicos etoposide, carboplatina, vinorelbine e daunorrubicina pelo ensaio MTT

Em células leucêmicas linfoides de LLA (Figura 9), o composto **1** também mostrou-se com maior atividade antiproliferativa, sendo altamente citotóxico (29 e 26% de viabilidade nas concentrações de 50 e 100 μM), quando comparado com o composto **2** (67 e 76%), com fraca citotoxicidade e com o antineoplásico etoposide (58 e 48%), que apresentou moderada citotoxicidade (Figura 10).

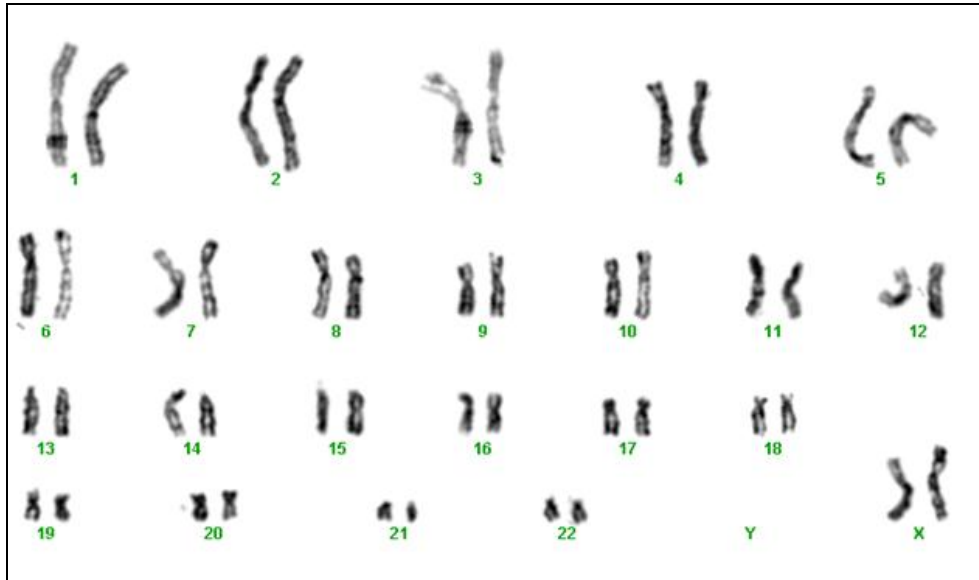


Figura 9 – Cariótipo (caso 20): 46,XX

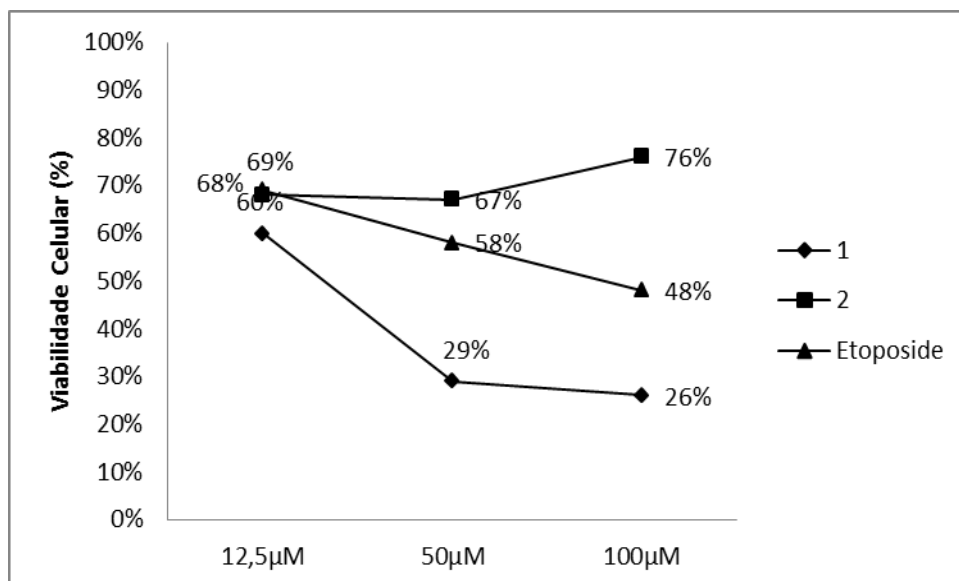


Figura 10 – Viabilidade celular de células linfoides de MO (caso 20) frente a diferentes concentrações dos compostos **1**, **2** e antineoplásico etoposide pelo ensaio MTT

Em células leucêmicas mieloides de LMC em fase acelerada (Figura 11), o composto **1** mostrou uma das melhores atividades antiproliferativas (16 e 18%), altamente citotóxico; o composto **2** (45 e 50%) moderada citotoxicidade, bem como o antineoplásico etoposide (61 e 56%) (Figura 12).

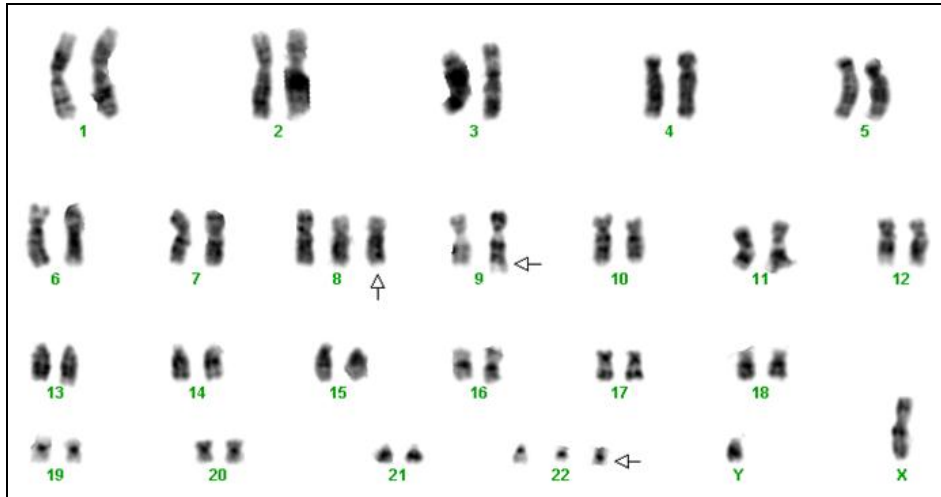


Figura 11 – Cariótipo (caso 19): 48,XY,+8,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)

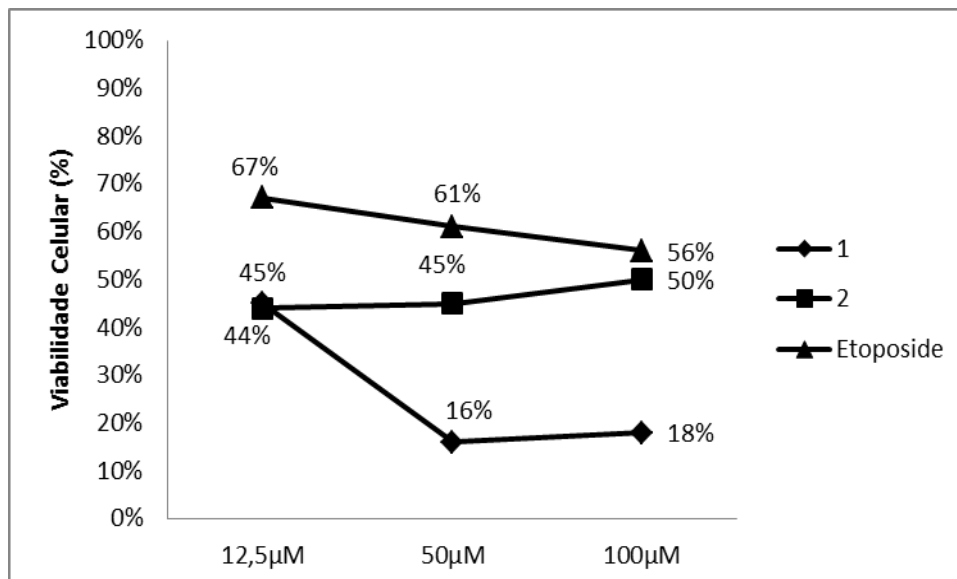


Figura 12 – Viabilidade celular de células mieloides de MO de LMC (caso 19) frente a diferentes concentrações dos compostos **1**, **2** e antineoplásico etoposide pelo ensaio MTT

5.1.2 Avaliação da atividade citotóxica dos compostos **1** e **2** em células leucêmicas de LLA, LMA, LMC, SMD e células mononucleares normais.

No estudo das células linfoides (LLA), subtipo T com cariótipo normal, verificou-se que ambos compostos mostraram-se fracamente citotóxicos. Porém em

células LLA-T com alterações cromossômicas numéricas e estruturais, o composto **1** foi altamente citotóxico. Estas células apresentaram cariótipo complexo: 45~47,XY,del(4)(q31)[04],+8[04],del(11)(q23)[03],-22[03],+mar[04][cp05]/46,XY[06], a deleção da região 11q23, onde ocorre rearranjo do gene *MLL*, confere prognóstico desfavorável ao paciente, portanto, de difícil tratamento quando usado protocolo padrão (HEIM; MITELMAN, 2009; MOORMANN et al., 2010; GROSSMANN et al., 2012).

Em células leucêmicas LLA subtipo B, os compostos **1** e **2** apresentaram alta e fraca citotoxicidade respectivamente, com exceção às células com monossomia do cromossomo 10 (Figura 13), onde ambos apresentaram alta citotoxicidade (IC_{50} 3.8 e 7.9 μ M) (Figura 14). Até o momento, não há relatos na literatura que indiquem fator prognóstico desta monossomia, porém é de grande valor no acompanhamento da remissão da doença, para verificar erradicação do clone leucêmico.

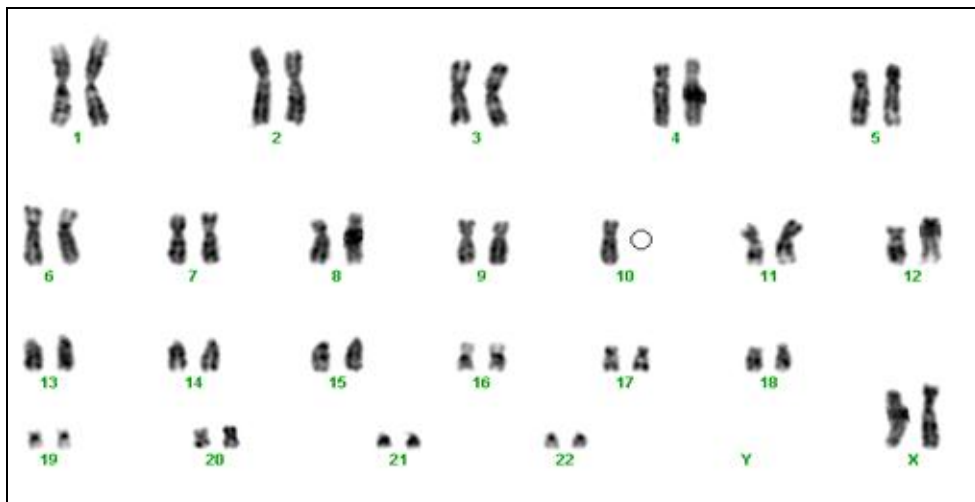


Figura 13 – Cariótipo (caso 14): 45,XX,-10

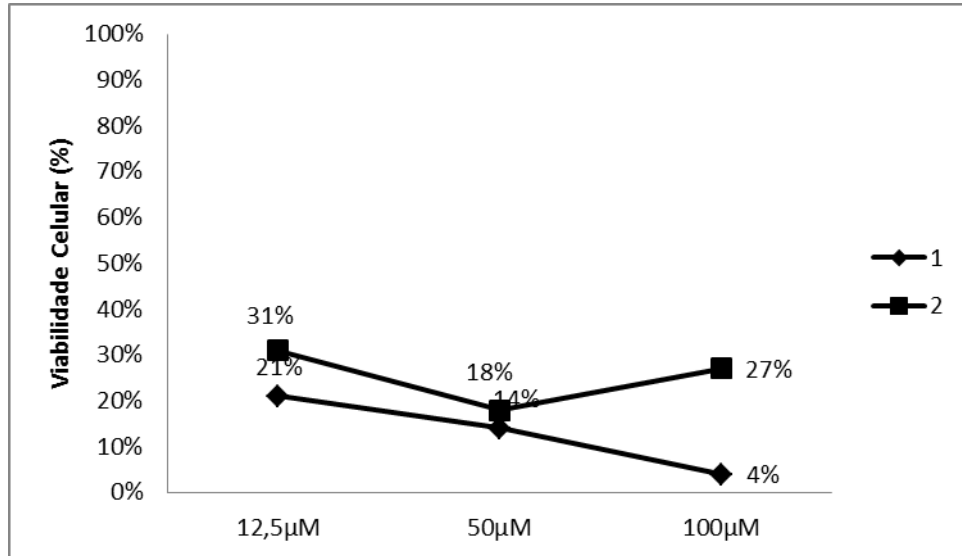


Figura 14 – Viabilidade celular de células linfóides de MO (caso 14) frente a diferentes concentrações dos compostos **1** e **2** pelo ensaio MTT

Em estudo com 237 amostras de células B e T de pacientes com recidiva de LLA foi demonstrado que a sensibilidade das células não diferiu significativamente frente a 16 antineoplásicos de uso clínico, incluindo glicocorticóides, alcalóides da vinca, antraciclina e epidofilotoxinas. Exceção feita à ifosfamida e cisplatina, em que células T foram mais resistentes que células B, e mercaptopurina e tioguanina, em que foram mais sensíveis (KASPERS et al., 2005).

Reetz (2009) demonstrou que compostos triazenos foram altamente citotóxicos em células de LLA com trissomia do cromossomo 21, com IC₅₀ 6.40 µM.

As amostras com células de LMC, com cariótipo apresentando translocação t(9;22)(cromossomo Philadelphia), demonstraram alta e moderada citotoxicidade frente aos compostos **1** e **2**, respectivamente, independente da fase da doença (ao diagnóstico ou fase acelerada) e alterações cromossômicas. As alterações cromossômicas adicionais: trissomia do cromossomo 8 e duplo Philadelphia, indicam evolução clonal, isto é, avanço no curso da doença, onde as células podem apresentar resistência ao mesilato de imatinibe (HEIM; MITELMAN, 2009).

Os compostos **1** e **2**, em células de SMD com cariótipo alterado mn(40~44)[14]/mn(70~80)[09]/mn(81~87)[02] (Figura 15), apresentaram alta e fraca atividade antiproliferativa, respectivamente (Figura 16), enquanto em células de SMD com cariótipo normal, a citotoxicidade foi moderada (**1**) e fraca (**2**), mostrando novamente maior atividade do composto **1** em células com alterações

cromossômicas. Wang et al. (2010) relataram que alterações cromossômicas clonais são observadas em 30-50% nas SMDs e avaliando 85 casos, 21% apresentaram evolução citogenética conferindo prognóstico desfavorável, com menor tempo de sobrevida.

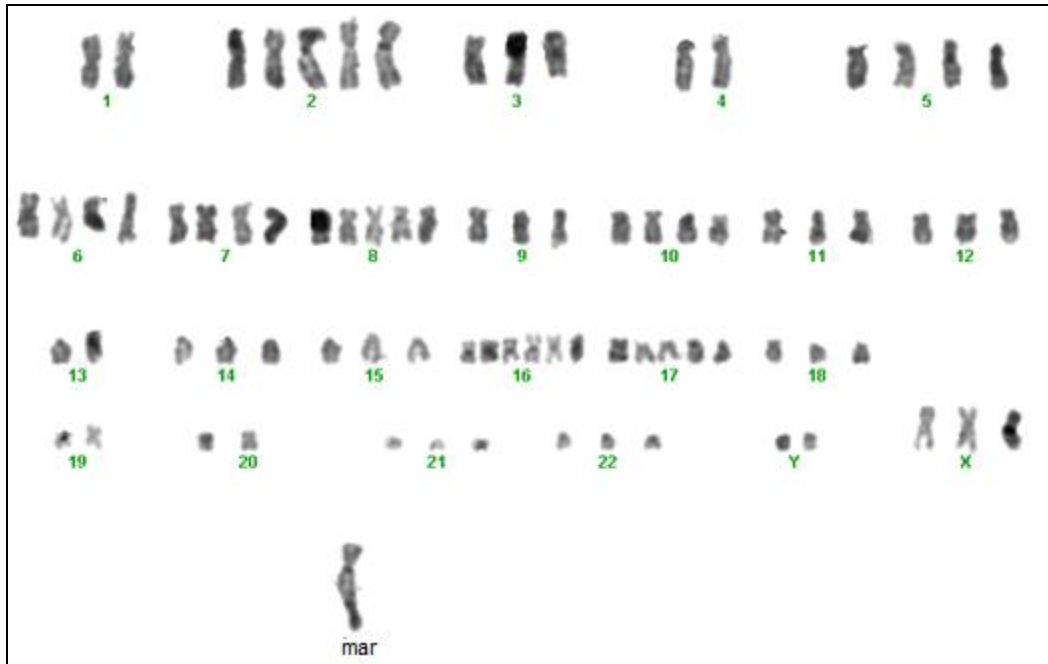


Figura 15 – Cariótipo (caso 6): mn(40~44)[14]/mn(70~80)[09]/mn(81~87)[02]

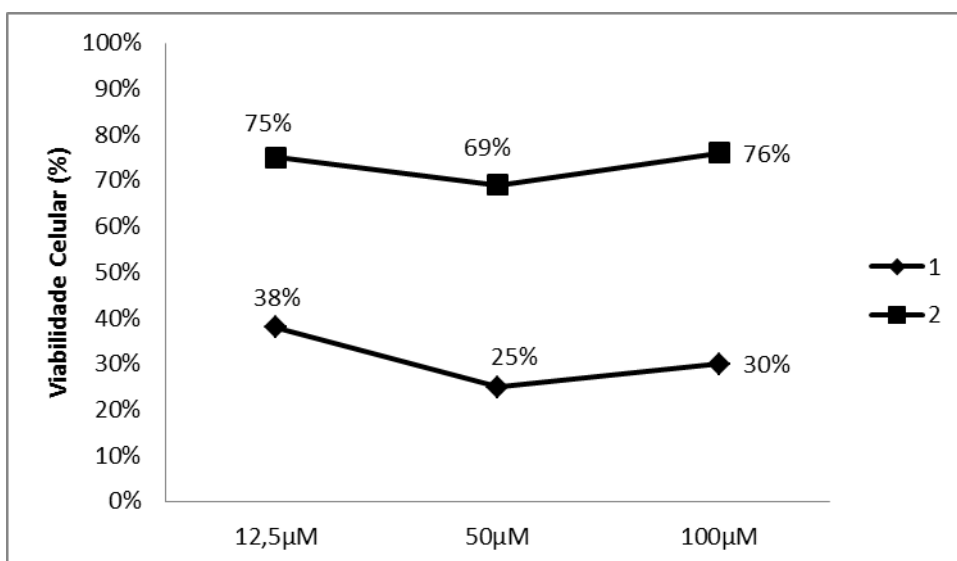


Figura 16 – Viabilidade celular de células de SMD de MO (caso 6) frente a diferentes concentrações dos compostos 1 e 2 pelo ensaio MTT

Em células de LMA o composto **1** mostrou-se altamente citotóxico na maioria das amostras, tendo a melhor atividade antiproliferativa em células com deleção no cromossomo 16 (46,XY,del(16)(q23)), com IC₅₀: 19.5 µM. Em células com cariótipo complexo, com alterações numéricas e estruturais: 44~45,XY,del(4)(q24),-7[5],-15[9]-16[4],-18[8],+r[7],+mar[6][cp10] (Figura 17), o composto **1** também apresentou atividade antiproliferativa, enquanto o composto **2** foi fracamente citotóxico para todas amostras de LMA (Figura 18).

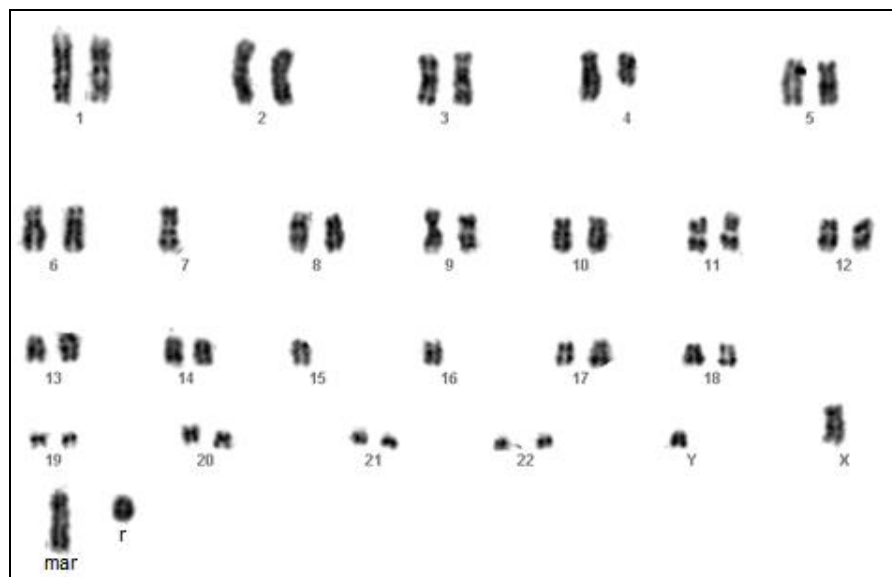


Figura 17 – Cariótipo (caso 8): 44~45,XY,del(4)(q24),-7[5],-15[9]-16[4],-18[8],+r[7],+mar[6][cp10]

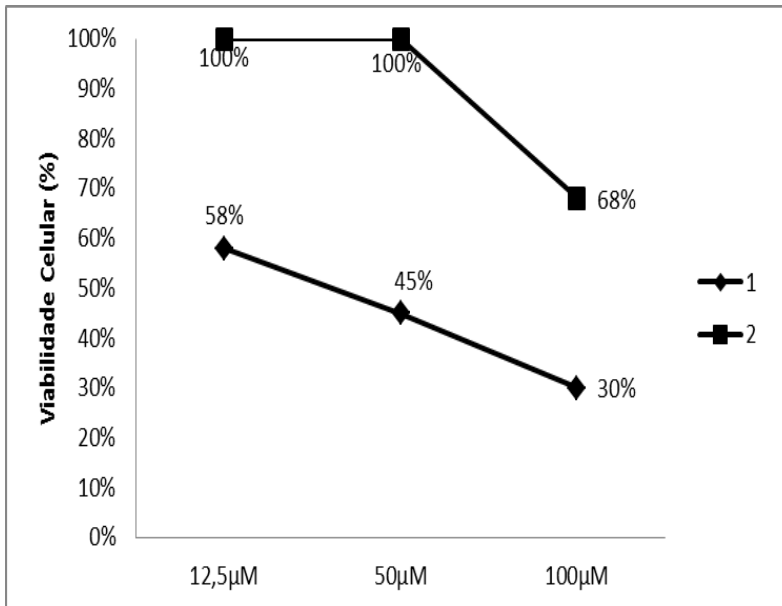


Figura 18 – Viabilidade celular de células mieloides de MO (caso 8) frente a diferentes concentrações dos compostos 1 e 2 pelo ensaio MTT

Os compostos 1 e 2 mostraram-se fracamente citotóxicos em células mononucleares normais de medula óssea (Figura 19 e 20).

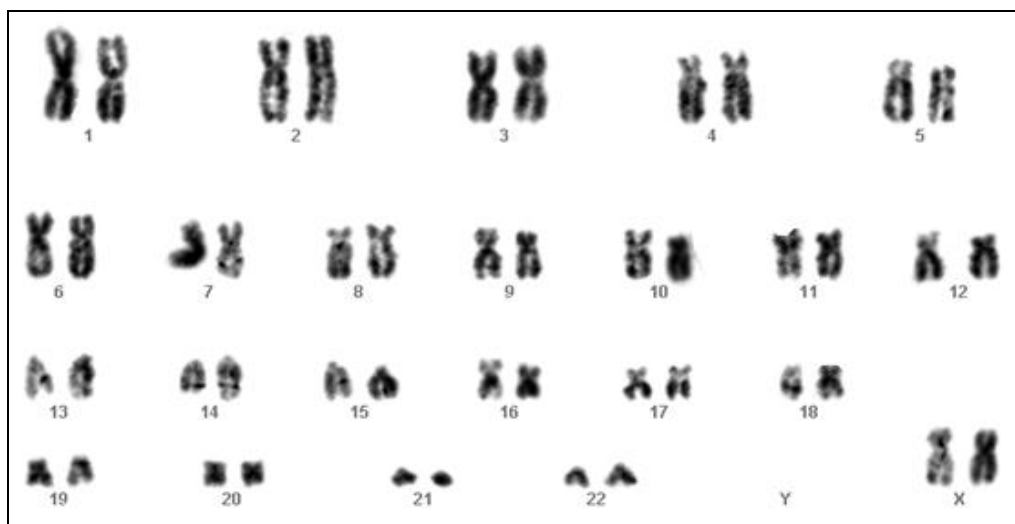


Figura 19 – Cariótipo (caso 2): 46,XX

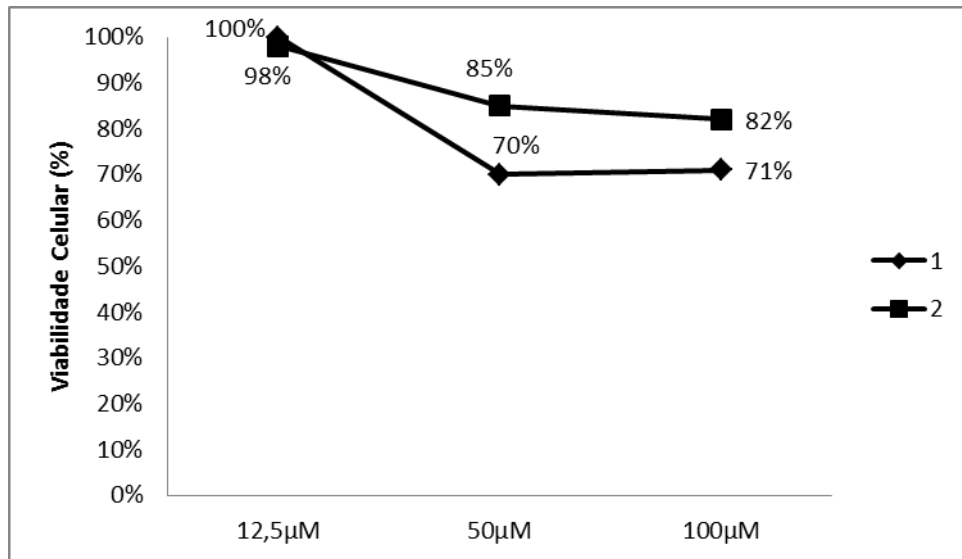


Figura 20 – Viabilidade celular de células mononucleares normais de MO (caso 2) frente a diferentes concentrações dos compostos 1 e 2 pelo ensaio MTT

Novos compostos diaryltriazenos, estudados por Cimborá-Zovko et al. (2011), também foram mais citotóxicos em linhagens tumorais do que em linhagens de células normais. Já Domingues et al. (2010) relataram que compostos triazenos não complexados tiveram alta toxicidade em leucócitos normais.

Katzung (2010) refere que células neoplásicas em fase de replicação mostram-se mais suscetíveis à ação citotóxica dos agentes alquilantes, por conseguinte, as células normais, com índice de replicação mais baixo, são menos afetadas. O principal local de alquilação no interior do DNA é a posição N7 da guanina. A alquilação da guanina pode resultar em codificação defeituosa, levando à ruptura do filamento da DNA.

Considerando que os fármacos antineoplásicos devem erradicar as células neoplásicas sem danificar as células normais, e não existem, no momento atual, fármacos disponíveis totalmente desprovidos de toxicidade (KATZUNG, 2010), os compostos triazenos aqui estudados são compostos promissores para análises complementares no desenvolvimento de futuros fármacos.

5.2 Avaliação da atividade antibacteriana dos compostos 1 e 2

Os resultados da atividade antibacteriana dos compostos triazenos estão apresentados nas Tabelas 8 e 9, com as CIMs obtidas em cepas ATCC e MDR respectivamente.

Tabela 8 – Atividade antibacteriana *in vitro* dos compostos triazenos 1 e 2 frente a cepas bacterianas ATCCs

Cepas bacterianas ATCC	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
	Composto 1	Composto 2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27859	>128	>128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 700603	>128	>128
<i>Micrococcus luteus</i> 7468	=64	>128
<i>Enterococcus faecalis</i> 51299	>128	>128
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 15305	>128	>128
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	=128	>128
<i>Escherichia coli</i> 35218	>128	>128
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228	>128	>128
<i>Salmonella thyphimurium</i> 14028	>128	>128
<i>Bacillus cereus</i> 14579	>128	>128
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	>128	>128

Tabela 9 – Atividade antibacteriana *in vitro* dos compostos triazenos **1** e **2** frente a isolados clínicos MDRs

Isolados clínicos MDR	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
	Composto 1	Composto 2
1. <i>Staphylococcus aureus</i>	=64	=128
2. <i>Staphylococcus aureus</i>	>128	>128
3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>128	>128
4. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	>128	>128
5. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	>128	>128
6. <i>Escherichia coli</i>	>128	>128
7. <i>Acinetobacter baumannii</i>	>128	>128
8. <i>Acinetobacter baumannii</i>	>128	>128
9. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	>128	>128
10. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	>128	>128

Dos compostos testados, o composto **1** apresentou atividade antibacteriana de estreito espectro frente as cepas ATCC *Micrococcus luteus* 7468 com CIM = 64 $\mu\text{g/mL}$ e *Staphylococcus aureus* 25923 com CIM = 128 $\mu\text{g/mL}$, e cepas MDR *Staphylococcus aureus* (1) com CIM = 64 $\mu\text{g/mL}$. O composto **2** apresentou atividade antibacteriana apenas frente a cepas MDR *Staphylococcus aureus* (1) com CIM = 128 $\mu\text{g/mL}$.

Os valores de CIM sugerem que o composto **1** apresentou maior atividade que o composto **2**, frente as cepas analisadas. Para a maioria das bactérias a CIM destes compostos foi maior que 128 $\mu\text{g/mL}$.

Estes achados são semelhantes a estudos de Domingues et al. (2010), em que três compostos triazenos apresentaram fraca atividade frente a bactérias gram positivas e gram negativas, com exceção de um deles que apresentou CIM de 32 $\mu\text{g/mL}$ frente a *Bacillus cereus*. Já Hörner et al. (2008) demonstraram que de quinze compostos triazenos estudados, doze apresentaram algum tipo de atividade antibacteriana, fato que justifica a pesquisa da atividade antibacteriana de novos compostos triazenos.

CONCLUSÕES

Os compostos **1** e **2** apresentaram semelhante potencial citotóxico em células mieloides e linfoides, quando analisados individualmente, porém o composto **1** mostrou-se 8,6 vezes e 5,7 vezes mais ativo em células de LLA e LMA, respectivamente, que o composto **2**.

O composto **1** apresentou maior potencial citotóxico que o composto **2**, sendo que, para a maioria das células leucêmicas de LMA, a IC_{50} variou de 19.51 a 33.93 μ M; em células linfóides, apresentou melhor IC_{50} no subtipo LLA-B, com IC_{50} variando de 3.85 a 28.64 μ M. Em células de LMC o composto **1** apresentou ótima citotoxicidade (IC_{50} 10.43 e 10.96 μ M), bem como em células leucêmicas de SMD (IC_{50} 11.97 e 26.0 μ M).

O composto **2** não apresentou citotoxicidade significativa frente as células leucêmicas estudadas.

Na análise citogenética das células submetidas ao ensaio MTT, foram encontrados 45,5% (10/22) das amostras com alterações cromossômicas, destas, 50% (5/10) com alterações numéricas e estruturais, como hiperdiploidia, translocação, deleção, isocromossomo, duplicação e cariótipos complexos. Em 30% (3/10), alterações estruturais (translocação e deleção) e em 20% (2/10), alterações numéricas como hiperdiploidia e hipodiploidia. Os percentuais destas alterações, neste estudo, não refletem a prevalência das mesmas em pacientes atendidos no HUSM, pois somente parte das amostras foram submetidas aos testes deste estudo.

O composto **1**, nas concentrações de 50 e 100 μ M, apresentou maior citotoxicidade em células leucêmicas com alterações cromossômicas do que em células sem alterações cromossômicas.

Quando comparados a fármacos antineoplásicos de uso clínico, o composto **1** apresentou citotoxicidade 84,4, 41,5, 12,3 e 3,4 vezes maior que etoposide, carboplatina, vinorelbine e daunorrubicina, respectivamente, quando testado com células mieloides; citotoxicidade 3,1 vezes maior que etoposide quando testado com células linfoides; e citotoxicidade 7,6 vezes maior que etoposide quando testado com células de LMC.

Quanto à atividade antibacteriana, os valores de CIM demonstraram que o composto **1** apresentou maior atividade que o composto **2**, apresentando atividade antibacteriana de estreito espectro frente a cepas bacterianas gram positivas.

Os compostos trizenos aqui estudados demonstraram ser uma classe promissora com atividade citotóxica, propriedade que pode ser explorada no tratamento de doenças neoplásicas.

Modificações estruturais podem ser uma importante estratégia para a produção de novas moléculas com maior atividade contra as células tumorais e menor toxicidade para as células normais.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, P. S. R.; SADDI, V. A. Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 29, n.4, out./dez. 2007.

APPELBAUM, P. C. 2012 and beyond: potential for the start of a second pre-antibiotic era? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 2062-2068, 2012.

BACCARANI, M.; et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendation of European Leukemia Net. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, p. 6041-6051, Dec. 2009.

BAIN, B. J. Classification of acute leukaemia: the need to incorporate cytogenetic and molecular genetic information. **Journal of Clinical Pathology**, v. 51, n. 6, p. 420-423, June 1998.

BARAN, E. J.; BERALDO, H. Suplementação de elementos-traços. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, p. 4-6, jul. 2005.

BARAN, E. J. Trace Elements supplementation: recent advances and perspectives. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 1-9, 2004.

BAUDARD, M.; et al. Has the prognosis of adult patients with acute myeloid leukemia improved over years? A single institution experience of 784 consecutive patients over a 16 year. **Leukemia**, v. 13, p. 1481-1490, 1999.

BENNETT, J. M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **British Journal of Haematology**, v. 33, n. 4, p. 451-458, Aug. 1976.

_____. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. **Annals of Internal Medicine**, v. 103, n. 4, p. 626-629, Oct. 1985.

BEUTLER, E. et al. **Williams Hematology**, 6th ed., New York: McGraw-Hill, 2001.

BOBOLA, M. S. et al. Role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in resistance of human brain tumor cell lines to the clinically relevant methylating agents temozolomide and streptozotocin. **Clinical Cancer Research**, v. 2, n. 4, p. 735-741, Apr. 1996.

BONMASSAR, L. et al. Triazene compounds in the treatment of acute myeloid leukemia: a short review and a case report. **Current Medicinal Chemistry**. v. 20, n. 19, p. 2389-2401, June 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes**. Brasília, 2010.

BRENNER, M. K.; PINKEL, D. Cure of leukemia. **Seminars in Hematology**, v. 36, n. 4, s. 7, p. 73-83, Oct. 1999.

BROCH, F. **Supramolecularidade de triazenos assimétricos dissubstituídos 4-(etoxicarbonilfenil)-2-(halofenil) e complexos de Ni (II), Cu (II) e Hg (II)**. 2008. 141 f. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

BURCHENAL, J. H. et al. Chemotherapy of leukemia. VII. Effect of substituted triazenes on transplanted mouse leukemia. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 91, n. 3, p. 398-401. Mar. 1956.

BUTLER, M. S.; BUSS, A. D. Natural products - The future scaffolds for novel antibiotics? **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 919-929, 2006.

CAPORASO, P. et al. Novel role of triazenes in haematological malignancies: pilot study of Temozolomide, Lomeguatrib and IL-2 in the chemo-immunotherapy of acute leukaemia. **DNA Repair (Amsterdam)**, v. 6, n. 8, p. 1179-1186, Aug. 2007.

CAPUCHA, V. et al. Development of triazene prodrugs for ADEPT strategy: New insights into drug delivery system based on carboxypeptidase G2 activation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 6903-6908, 2012.

CARNERO GÓMEZ, R. Calidad de vida relacionada com la salud de Temodal® em el tratamiento del glioblastoma multiforme. **Revista Española de Economía de la Salud**, v. 4, n. 3, p. 154-160, 2005.

CAZÉ, M. O.; BUENO, D.; SANTOS, M. E. F. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, v. 30, n. 1, p. 5 -12, 2010.

CHABNER, B. A.,ROBERTS, T. G., Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 65-72, Jan. 2005.

CHOPRA, I. The 2012 Garrod Lecture: Discovery of antibacterial drugs in the 21st century. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [Epub ahead of print], 2012.

CIMBORA-ZOVKO, T. et al. Synthesis and biological evaluation of 4-nitro-substituted 1,3-diaryltriazenes as a novel class of potent antitumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 2971-2983, Apr. 2011.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standart – Ninth Edition**. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standarts Institute, 2012.

D'ATRI, S. et al. Chemosensitivity to triazene compounds and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase levels: studies with blasts of leukaemic patients. **Annals of Oncology**, v. 6, n. 4, p. 389-393, Apr. 1995.

DANSON, S. J.; MIDDLETON, M. R. Temozolomide: a novel oral alkylating agent. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 1, n. 1, p. 13-19, June 2001.

DEININGER, M.; BUCHDUNGER, E.; DRUKER, B. J. The development of imatinib as therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 105, p. 2640-2653, 2005.

DOMINGUES, V. O. *et al.* In vitro evaluation of triazenes: DNA cleavage, antibacterial activity and citotoxicity against acute myeloid leukemia cells. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 00. n. 00, p. 1-12, 2010.

EPSTEIN, L. M.; ROSENBERG, J. I. **Química Geral**, (Coleção Schaum), Porto Alegre: Bookman, 2003.

FETT-CONTE, A. C. et al. Estudo cromossômico no sangue periférico de pacientes com diferentes tipos de leucemia do Hospital de Base, São José do Rio Preto - SP. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, p. 374-386, 2000.

FINN, R. S. et al. Dasatinib, an orally active small molecule inhibitor of both the src and abl kinases, selectively inhibits growth of basal-type/"triple-negative" breast cancer cell lines growing in vitro. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 105, n. 3, p. 319-326, Nov. 2007.

FITZGERALD, P. H., MORRIS, C. M. Ph-Negative chronic myeloid leukemia: The nature of the breakpoint junctions and mechanism of ABL transposition. **Leukemia & Lymphoma**, v. 6, n. 4-5, p. 277-287, 1992.

FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. A química inorgânica na terapia do câncer. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, jul. 2005.

FUTREAL, P. A. et al. A census of human cancer genes. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 3, p. 177-183, 2004.

GRIMWADE, D.; HILLS, R. K. Independent prognostic factors for AML outcome. **Hematology**, n. 1, p. 385-395, Jan. 2009.

_____.; _____.; MOORMAN, A. V. et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. **Blood**, v. 116, n.3, p. 354-365, 2010.

GROSSMANN, V. et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. **Blood**, v. 120, n. 15, p. 2963-2972, Oct. 2012.

HAFNER, A.; BRÄSE, S. Ortho-trifluoromethylation of functionalized aromatic triazenes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 15, p. 3713-3715, Apr. 2012.

HAMERSCHLAK, N. As leucemias no Brasil. **Onco&**, p. 20-23, nov/dez. 2012.

_____. Leucemia: fatores prognósticos e genética. **Jornal de Pediatria**, v. 84, s.4, p. 52-57, 2008.

HATZIMICHAELI, E. ; CROOK, T. Cancer epigenetics: new therapies and new challenges **Journal of Drug Delivery**, v. 2013, p. 1-9. Jan. 2013.

HEGI, M. E. et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 10, p. 997-1003, Mar. 2005.

HEIM, S.; MITELMAN, F. **Cancer Cytogenetics**. 3rd ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2009.

HÖRNER, M. et al. 3-(4-Acetylphenyl)-1-(4-nitrophenyl)triazene. **Acta Crystallographica Section C**, v. 60, p. 303-304, May 2004.

HÖRNER, M. et al. Triazenos e atividade antibacteriana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 3, p. 441-449, jul./set. 2008.

HRUSAK, O., PORWIT-MACDONALD, A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. **Leukemia**, v. 16, n. 7, p. 1233-1258. July 2002.

HUBEEK, I. et al., *In vitro* sensitivity and cross-resistance to deoxynucleoside analogs in childhood acute leukemia. **Haematologica**, v. 91, n. 1, p. 17-23, 2006.

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2148-2154, 2010.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

KIMBALL, D. B.; HERGES, R.; HALEY, M. M. Two unusual, competitive mechanisms for (2-ethynylphenyl)triazene cyclization: pseudococarcate versus pericyclic reactivity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 8, p. 1572-1573, Feb. 2002.

LACAL, P. M. et al. In vitro inactivation of human O6-alkylguanine DNA alkyltransferase by antitumor triazene compounds. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 279, n.1, p. 416-422, Oct. 1996.

LAZO, J. S. et al. **Manual de farmacologia e terapêutica**, New York: McGraw-Hill, 2006.

LINDER, M. C. The relationship of copper to DNA damage and damage prevention in humans. **Mutation Research**, v. 733, p. 83-91, 2012.

LOBO, I. Chromosome abnormalities and cancer cytogenetics. **Nature Education**, v.1, n. 1. 2008.

LUSIS, M. K. P. Classificação FAB das leucemias mielóides agudas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22,s. 2, p. 175-178, 2000.

MAIA, V, M. Administração de quimioterapia antineoplásica no tratamento de hemopatias malignas. **Protocolos de enfermagem**. 1. ed., HEMORIO, 2010.

MARCHESI, F.et al. Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. **Pharmacology Research**, v. 56, n. 4, p. 275-287, Oct. 2007.

MAYER, R. J., et al. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. **New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 14, p. 896-903, Oct. 1994.

MCKENNA, R. W. Multifaceted approach to the diagnosis and classification of acute leukemias. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 1252-1259, Aug. 2000.

MICHOR, F. et al. Dynamics of chronic myeloid leukaemia. **Nature**, v. 435, n. 7046, p. 1267-1270, June 2005.

MORANDO, J. et al. Transplante de células tronco hematopoéticas em crianças e adolescentes com leucemia aguda. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32 ,n. 5, p. 350-357, nov. 2010.

MOORMAN, A. V. et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. **The Lancet Oncology**. v. 11, n. 5, p.429-438, May 2010.

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

MROZEK, K., HEEREMA,N. A., BLOOMFIELD, C. D.Cytogenetics in acute leukemia. **Blood Reviews**, v. 18, n. 2, p. 115-36, June 2004.

MULLER, H. R., PRADO, K. B. Epigenética: um novo campo da genética. **Revista Unicenp de Biologia & Saúde**, Curitiba, v. 1 n. 3, p. 61-69, set./dez. 2008.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. Especial Oncologia. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, p. 7-19, nov. 2010.

NEWLANDS, E. S., et al. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. **Cancer Treatment Reviews**, v. 23, n. 1, p. 35-61, Jan. 1997.

OLIVEIRA, L. Z. et al. Avaliação cromossômica, molecular e imunofenotípica em 79 casos de leucemia mielocítica aguda. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 34, s. 2, p. 248, nov. 2012.

OLIVEIRA, N. F. P. et al. Metilação de DNA e câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 4, p. 493-499, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **The 10 leading causes of death by broad income group (2008)**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>>. Acesso em: 02 dez. 2012

PANTCHEVA, I. N. et al. First divalent metal complexes of the polyether ionophore Monensin A: X-Ray structures of [Co(Mon)₂(H₂O)₂] and [Mn(Mon)₂(H₂O)₂] and their bactericidal properties. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 5, n. 2, p.154-161, June 2008.

PARAGINSKI, G. et al. Avaliação da atividade de clivagem do DNA plasmidial por cinco compostos triazenos inéditos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS, 33; CONGRESSO BRASILEIRO DE CITOLOGIA CLÍNICA, 6., 2006, Curitiba: **Anais...** Curitiba: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, 2006. p. 90B.

PASSARGE, E. **Genética texto e atlas**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

PENG, B.; LLOYD, P.; SCHRAM, H. Clinical pharmacokinetics of imatinib. **Clinical Pharmacokinet**, v. 44, n. 9, p. 879-894, 2005.

PEREGRINE, A. S.; MAMMAN, M. Pharmacology of diminazene: a review. **Acta Tropica**, v. 54, n. 3-4, p. 185-203, Sept. 1993.

PEREIRA, W. V. Leucemia Mielóide Aguda na Infância e Adolescência In: A. C. Lopes (Ed.). **Tratado de Clínica Médica**. São Paulo: Roca, v. II, p. 3056-3067, 2006.

PEREIRA, M. M.; MORENO, M. J. M. Complexos de metais de transição em química fina e medicinal aplicações na indústria farmacêutica química. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 116, p. 35-41, out./dez. 2010.

PIDDOCK, L. J. V. The crisis of no new antibiotics—what is the way forward? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 12, p. 249–253, 2012.

PIETERS, R.; CARROLL, W. L. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Clinics of North America**, v. 55, n. 1, p. 1-20, Feb. 2008.

POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. **Leucemias agudas abordagem imunomolecular no diagnóstico e na pesquisa**. Rio de Janeiro: INCA, 2008.

PUI, C. H., et al. Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. **Leukemia**, v. 17, n. 4, p. 700-706, Apr. 2003.

PULLARKAT, V. et al. Impact of cytogenetics on the outcome of adult acute lymphoblastic leukemia: results of Southwest Oncology Group 9400 study. **Blood**, v. 111, n. 5, p. 2563-2572, Mar. 2008.

RAJSKI, S. R.; WILLIAMS, R. M. DNA Cross-Linking agents as antitumor drugs. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 8, p. 2723-2796, Dec. 1998.

RAMAKRISHNAN, S. et al. Ternary dinuclear copper(II) complexes of a hydroxybenzamide ligand with diimine coligands: the 5,6-dmp ligand enhances DNA binding and cleavage and induces apoptosis. **Inorganic Chemistry**, v. 50, p. 6458-6471, 2011.

REETZ, L. G. B. **Avaliação da atividade de nuclease química, antibacteriana e citotoxicidade de compostos triazenos**. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

RIJT, S. H van; SADLER, P. J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 23-24, p. 1089-1097, 2009.

ROCHA, D. P. et al. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 111-118, 2011.

ROONEY, D. E.; CZEPULKOWSKI, B. **Human cytogenetics**, New York: Oxford, v.II, 1992.

SEITER, K. et al. Temozolomide and cisplatin in relapsed/refractory acute leukemia. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 2, n. 21, 2009.

_____. et al. Phase I study of temozolomide in relapsed/refractory acute leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 15, p. 3249-3253, Aug. 2002.

SHAFFER, L. G.; TOMMERUP, N. **ISCN 2005**: An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel, Switzerland: S. Karger, 2005.

SHEALY, Y. F.; KRAUTH, C. A.; MONTGOMERY, J. A. Imidazoles. I. coupling reactions of 5-diazoimidazole-4-carboxamide. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 2150-2154, 1962.

SILVA, G. C. et al. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 2, p. 77-84, abr. 2006.

SILVA, P. P. et al. Two new ternary complexes of copper(II) with tetracycline or doxycycline and 1,10-phenanthroline and their potential as antitumoral: cytotoxicity and DNA cleavage. **Inorganic Chemistry**, v. 50, p. 6414-6424, 2011.

SILVER, L. L. Challenges of antibacterial discovery. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 71-109, Jan. 2011.

SOARES, V. M. Emergência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) em um hospital terciário. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 4, p. 251-253, ago. 2012.

STEVENS, M. F. et al. Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8 - carbamoyl-3-methyl-imidazo [5,1-d] - 1,2,3,5-tetrazin-4 (3H) - one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. **Cancer Research**, v. 47, n. 22, p. 5846-5852, Nov. 1987.

SWANBURY, J. (Ed). **Cancer cytogenetics: methods and protocols**, New Jersey: Human Press, 2003.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D Trace elements in human. physiology and pathology. Copper. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 57, p. 386-398, 2003.

TAVERNA, P.; et al. Influence of O6-methylguanine on DNA damage and cytotoxicity of temozolomide in L1210 mouse leukemia sensitive and resistant to chloroethylnitrosoureas. **Anticancer Drugs**, v. 3, n. 4, p. 401-405, Aug. 1992.

THOMPSON, K. H; ORVIG, C. Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design. **Dalton Transactions**, n. 6, p. 761-764, Feb. 2006.

VELLOSO, E. D. R. P. et al. Alterações citogenéticas e moleculares em leucemia mieloide aguda. **Einstein**, v.9, n. 2, p. 184-189, 2011.

VENDITTI, J. M. Antitumor activity of DTIC (NSC-45388) in animals. **Cancer Treatment Reports**, v. 60, n. 2, p. 135-140, Feb 1976.

VON NUSSBAUM, F. et al. Antibacterial natural products in medicinal chemistry—exodus or revival? **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, p. 5072-5129, 2006.

WAGNER-SOUZA, K. et al. Ciclosporina A e seus análogos como reversores da resistência a múltiplas drogas em células tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 2, p.103-112, 2003.

WANG, G.;et al. Retrovirus-mediated transfer of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene into a murine hematopoietic stem cell line and resistance to the toxic effects of certain alkylating agents. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, n. 9, p. 1221-1228, May 1996.

WANG, H. et al. Cytogenetic evolution correlates with poor prognosis in myelodysplastic syndrome **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 196, n. 2, p. 159-166, Jan. 2010.

WHITE, A. R. Effective antibacterials: at what cost? The economics of antibacterial resistance and its control. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 1948-1953, 2011.

ZERBINI, M. C. M.; et al. Classificação dos tumores hematopoéticos e linfoides de acordo com a OMS: padronização da nomenclatura em língua portuguesa, 4 ed. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 6, p. 643-648, dez. 2011.

Apêndice 1 – Termo de confidencialidade

Título do projeto: Correlação entre citotoxicidade, alterações cromossômicas e atividade antibacteriana de compostos triazenos em células de medula óssea

Pesquisadores responsáveis: Rosmari Hörner e Virgínia Maria Cóser

Mestranda: Jacqueline Nunes Rodrigues

Instituição / Departamento: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e Serviço de Hematologia-Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria -UFSM - RS

Telefone para contato: (55) 3220 8591

Local da coleta de dados: Serviço de Hematologia-Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria - RS

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos participantes do estudo, alguns dados serão coletados através de revisão dos prontuários médicos.

Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima e serão mantidas em uma base de dados, no setor de Hematologia-Oncologia do HUSM, por um período de cinco anos sob a responsabilidade da co-orientadora Dra. Virgínia Maria Cóser. Após este período, os dados serão destruídos.

Este projeto de pesquisa foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM em/...../....., com o número do CAAE.....

Santa Maria, / /2012.

Virgínia Maria Cóser

Rosmari Hörner

Apêndice 2 – Manuscrito

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Current Medicinal Chemistry*

Correlação entre citotoxicidade, alterações cromossômicas e atividade antibacteriana de compostos triazenos complexados com Cu(II) em células de medula óssea

***Jacqueline Nunes Rodrigues^a, Virgínia Maria Cóser^a,
Rosmari Hörner^{*b}, Gustavo Luiz Paraginski^c, Manfredo Hörner^{*c}***

^aDepartamento de Hematologia-Oncologia, Hospital Universitário de Santa Maria, 97105-970 Santa Maria – RS, Brasil

^bDepartamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria – RS, Brasil

^cDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria – RS, Brasil

*Autores para correspondência:

Rosmari Hörner - E-mail: rosmari.ufsm@gmail.com

T: +55 55 3220 8751; F: +55 55 3220 8018

Manfredo Hörner - E-mail: hoerner.manfredo@gmail.com

T: +55 55 3220 8645; F: +55 55 3220 8031

Resumo

Neste estudo nós relatamos os resultados dos testes da atividade citotóxica realizados em células leucêmicas, com e sem alterações cromossômicas, e células mononucleares normais de medula óssea, bem como a atividade antibacteriana de dois compostos triazenos complexados com Cu(II) **1** - **Bis[1,3-bis(2-clorofenil)triazenido-κN¹¹,N¹³-μ-O-metóxi-piridina-κN-cobre(II)]** - C₃₆H₃₄N₈O₃Cl₄Cu₂ e **2** - **Bis[1,3-bis(2-fluorfenil)triazenido-κN¹¹,N¹³-μ-O-hidróxi-piridina-κN-cobre(II)]** - C₃₆H₃₄N₈O₃F₄Cu₂. A avaliação citotóxica foi realizada frente a células leucêmicas de leucemia linfóide aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), síndrome mielodisplásica (SMD) e células mononucleares normais de medula óssea *in vitro* pelo do ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). A atividade antibacteriana dos compostos foi determinada pela concentração inibitória mínima (CIM) frente a cepas bacterianas padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) e bactérias multirresistentes. As alterações cromossômicas foram analisadas pela técnica de citogenética convencional. O composto **1** apresentou maior potencial citotóxico que o composto **2**. Para a maioria das células leucêmicas de LMA, a IC₅₀ variou de 19.51 a 33.93 μM; em células linfóides, apresentou melhor IC₅₀ no subtipo LLA-B, com IC₅₀ variando de 3.85 a 28.64 μM. Em células de LMC o composto **1** apresentou ótima citotoxicidade (IC₅₀ 10.43 e 10.96 μM), bem como em células leucêmicas de SMD (IC₅₀ 11.97 e 26.0 μM). Quando comparados a antineoplásicos de uso clínico, o composto **1** apresentou maior atividade antiproliferativa que o etoposide, daunorrubicina, carboplatina e vinorelbina. As células leucêmicas com alterações cromossômicas foram mais sensíveis ao composto **1** nas concentrações de 50 e 100 μM do que células leucêmicas com cariótipo normal. Foi demonstrado que o composto **1** apresentou maior atividade antibacteriana que o composto **2**, apresentando atividade de estreito espectro frente a cepas bacterianas gram positivas.

Palavras-chave: Triazenos; MTT; Citotoxicidade; Leucemia; Citogenética; Atividade antibacteriana.

1 Introdução

As leucemias formam um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas sendo que seu tratamento constitui um desafio à comunidade científica devido à diversidade genética nas células leucêmicas. Alterações cromossômicas adquiridas e modificações da expressão gênica estão envolvidas na gênese das leucemias [1].

Neste tipo de doença hematológica, fatores como a heterogeneidade com envolvimento de múltiplos rearranjos cromossômicos, bem como o surgimento da resistência nas células malignas aos agentes antitumorais em uso clínico e a ausência de resposta imune eficaz contra as células leucêmicas, constituem, isoladamente ou em conjunto, obstáculos ao resultado terapêutico desejado. Estes fatores têm estimulado o interesse no desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos eficazes que atinjam alvos moleculares específicos [2, 3].

Dacarbazina (5-(3,3-dimetil-1-triazeno)imidazol-4-carboxiamida e temozolamida (3-metil-4-oxo-3,4-dihidroimidazol[5,1-d][1,2,3,5]tetrazina-8-carboxiamida) são compostos da classe triazeno (TZC) utilizados na prática clínica em diversos tipos de neoplasias, incluindo glioma, leucemia e melanoma, sendo o grupo triazeno o responsável por suas propriedades farmacológicas [4, 5, 6, 7, 8].

Os TZC possuem também atividade antibacteriana, contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e de nuclease, uma vez que são aptos a clivar o DNA plasmidial [9, 10].

No presente estudo são apresentados os resultados dos testes da atividade citotóxica *in vitro* de dois compostos triazenos inéditos, realizados em células leucêmicas, com e sem alterações cromossômicas, analisadas pela técnica de citogenética convencional, e células mononucleares normais de medula óssea, bem como a atividade antibacteriana frente a cepas bacterianas padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) e bactérias multirresistentes (MDR). Comparamos a citotoxicidade dos compostos estudados com o etoposide, daunorrubicina, carboplatina e vinorelbine, e correlacionamos as alterações cromossômicas com atividade antineoplásica.

2 Resultados e Discussão

2.1 Compostos

Os compostos trizenos Bis[1,3-bis(2-clorofenil)triazenido- $\kappa N^{11}, N^{13}$ - μ -O-metóxi-piridina- κN -cobre(II)], $C_{36}H_{34}N_8O_2Cl_4Cu_2$, peso molecular = 877,60 g/mol (composto **1**) e o Bis[1,3-bis(2-fluorfenil)triazenido- $\kappa N^{11}, N^{13}$ - μ -O-hidróxi-piridina- κN -cobre(II)], $C_{34}H_{28}N_8O_2F_4Cu_2$, peso molecular = 783,72 g/mol (composto **2**) foram sintetizados conforme metodologia descrita na literatura, a partir de uma solução contendo o composto trizeno e o sal em questão, em proporções estequiométricas [11]. As diferenças entre os dois complexos foram nos radicais introduzidos a eles: um com dois átomos de cloro (Cl) e dois grupos metóxi (CH_3) e outro com dois átomos de fluor (F) e dois grupos hidróxi (H) (Figuras 1 e 2). Os compostos foram dissolvidos em etanol:água (1:1).

Para a caracterização dos compostos foi utilizado um aparelho Mel-Temp II para determinação dos pontos de fusão, um espectrofotômetro Nicolet – Magna IR 760 para os espectros de absorção no infravermelho, um espectrofotômetro 1650 PC Shimadzu para os espectros UV/Visível e um difratômetro Bruker X8 Kappa Apex II para a elucidação das estruturas moleculares utilizando o método de difração de Raios-X em monocristal.

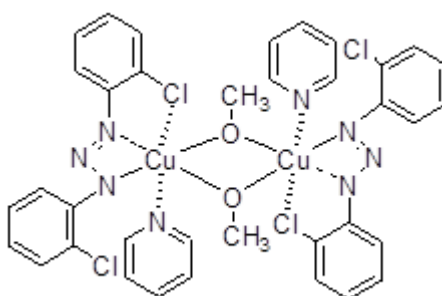


Figura 1 – Estrutura molecular do composto **1**: Bis[1,3-bis(2-clorofenil)triazenido- $\kappa N^{11}, N^{13}$ - μ -O-metóxi-piridina- κN -cobre(II)]

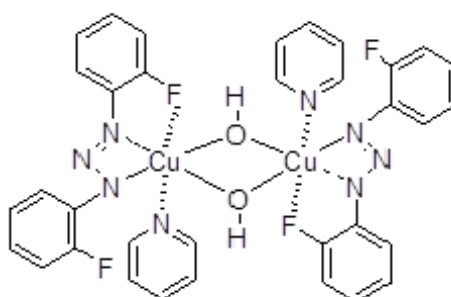


Figura 2 – Estrutura molecular do composto **2**: Bis[1,3-bis(2-fluorfenil)triazenido- $\kappa N^{11}, N^{13}$ - μ -O-hidróxi-piridina- κN -cobre(II)]

2.2 Atividade citotóxica *in vitro*

Os compostos triazenos **1** e **2** foram testados quanto a sua capacidade citotóxica frente a células leucêmicas de LLA, LMA, LMC, SMD e células mononucleares normais de medula óssea. Os antineoplásicos etoposide, daunorrubicina, carboplatina e vinorelbine foram testados com a finalidade de comparação em células de LMA.

O perfil das amostras, citogenética das células e resultados da IC_{50} encontram-se descritos nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Perfil das amostras, citogenética e IC_{50} dos compostos **1** e **2**

Caso	Diag	Status	Citogenética	IC_{50} (μM)	
				1	2
1	Normal	diag	46,XX	>100	>100
2	LLA-B	diag	45,XX,-10	3.85	7.91
3	LLA-B	diag	46,XX	21.95	>100
4	LLA -B	rec	62~65,XXX,dup(1)(q12q44)[5],+5[4],+7[4],+7[4]+8[2],+9[4],t(9;22)(q34;q11)[6],+12[2],+13[4],+14[4],+15[2],+der(16)t(1;16)(q23;q24)[6],+18[4],+21[4],+22[3],+der(22)t(9;22)[5],+der(22)t(9;22)[4][cp07]	28.64	>100
5	LLA-B	rec	51,XY,+1[3],+3[8],+10[6],add(14)(q32)[8],del(14)(q32)[8],+i(17)(q10)[8],+mar1[8],+mar2[7],+mar3[5][cp09]/46,XY[1]	20.33	81.8 4
6	LLA-B	rec	46,XX	26.51	>100
7	LLA-T	diag	Pobre em metáfases	>100	>100
8	LLA-T	diag	46,XY	85.96	>100
9	LLA-T	rec	45~47,XY,del(4)(q31)[4],+8[4],del(11)(q23)[3],-22[3],+mar[4][cp05]/46,XY[06]	28.4	>100
10	LMA M2	diag	44~45,XY,del(4)(q24),-7[5],-15[9],-16[4],-18[8],+r[7],+mar[6][cp10]	31.05	>100
11	LMA M2	diag	46,XY	>100	>100

12	LMA M2	diag	46,XY	33.93	>100
13	LMA M3	diag	46,XY,t(15;17)(q22;q12)	30.03	>100
14	LMA M4	diag	46,XX,16qh+	27.78	>100
15	LMA M4	diag	46,XY,del(16)(q23)	19.51	>100
16	LMA M4	diag	46,XY	>100	>100
17	LMA M5	diag	46,XX	>100	>100
18	LMA M5	rec	46,XY	35.57	99.1 2
19	LMC	diag	46,XX,t(9;22)(q34;q11)	10.43	51.9 0
20	LMC	Fase aceler	48,XY,+8,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)	10.96	34.1 2
21	SMD t	diag	46,XY	26.0	>100
22	SMD t	diag	mn(40~44)[14]/mn(70~80)[09]/mn(81~87)[02]	11.97	>100

Diag: Diagnóstico, LMA: Leucemia Mieloide Aguda, LLA: Leucemia Linfoide Aguda, SMD t: Síndrome Mielodisplásica transformada, LMC: Leucemia Mieloide Crônica, rec: recidiva, IC₅₀: Concentração do composto necessária para reduzir 50% da viabilidade celular.

Tabela 2 – Análise descritiva do perfil das amostras estudadas

	Frequência	Percentual (%)
Sexo		
Feminino	8	36,4
Masculino	14	63,6
Status		
Diagnóstico	16	72,8
Recidiva	5	22,7
Fase acelerada	1	4,5
Cariótipo		
Alterado	10	45,5
Normal	12	54,5
Diagnóstico		
LLA	8	36,4
LMA	9	40,9
LMC	2	9,1
SMD	2	9,1
Normal	1	4,5

O composto **1**, frente a todas as células analisadas nesse estudo, apresentou maior citotoxicidade que o composto **2**, demonstrado pela IC₅₀ (Tabela 1). Como exemplo disso citamos o caso 15, células com cariótipo 46,XY,del(16)(q23) e IC₅₀: 19.51 µM. O TZC **1** também demonstrou maior citotoxicidade que os antineoplásicos testados: etoposide (IC₅₀: >100 µM), daunorrubicina (IC₅₀: 66.27 µM), carboplatina

(IC₅₀: >100 µM) e vinorelbine (IC₅₀: >100 µM) em células de LMA (Figuras 3 e 4).

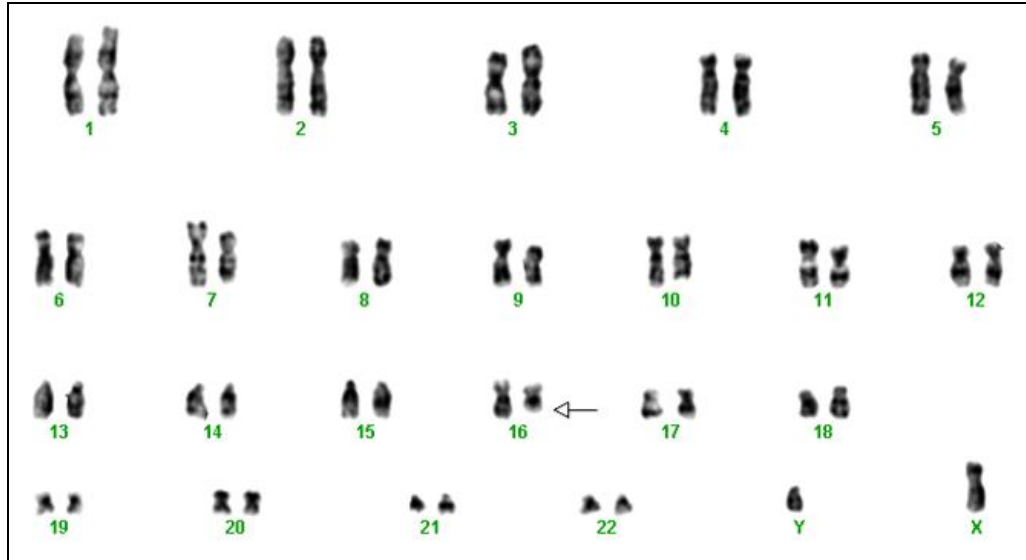


Figura 3 – Cariótipo (caso 15): 46,XY,del(16)(q23)

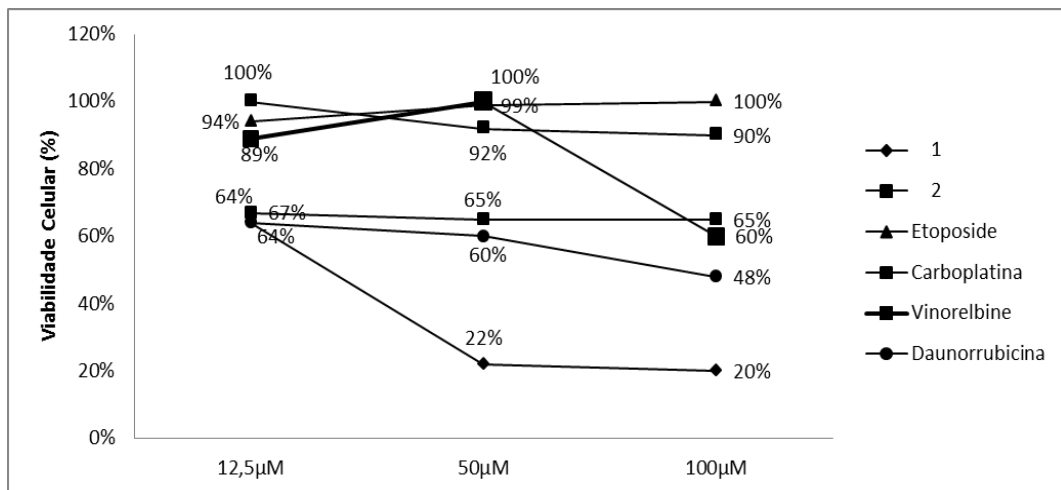


Figura 4 – Viabilidade celular de células mieloides de medula óssea (caso 15) frente a diferentes concentrações dos compostos 1, 2 e antineoplásicos etoposide, carboplatina, vinorelbine e daunorrubicina pelo ensaio MTT

Em células leucêmicas LLA subtipo B, os compostos 1 e 2 apresentaram alta e fraca citotoxicidade, respectivamente, com exceção às células com monossomia do cromossomo 10 (caso 2), onde ambos apresentaram alta citotoxicidade (IC₅₀ 3.8 e 7.9 µM). Até o momento, não há relatos na literatura que indiquem fator prognóstico desta monossomia, porém é de grande valor no acompanhamento da remissão da doença, para verificar erradicação do clone leucêmico [1].

No estudo das células linfoides (LLA), subtipo T com cariótipo normal (caso 8), verificou-se que ambos compostos mostraram-se fracamente citotóxicos. Porém em células LLA-T com alterações cromossômicas numéricas e estruturais (caso 9), o composto **1** foi altamente citotóxico. Estas células apresentaram cariótipo complexo: 45~47,XY,del(4)(q31)[04],+8[04],del(11)(q23)[03],-22[03],+mar[04][cp05]/46,XY[06], a deleção da região 11q23, onde ocorre rearranjo do gene *MLL*, confere prognóstico desfavorável ao paciente, portanto, de difícil tratamento quando usado protocolo padrão [3, 12, 13].

Em células de LMA o composto **1** mostrou-se altamente citotóxico na maioria das amostras (casos 10, 12, 13, 14 e 15), tendo a melhor atividade antiproliferativa em células com deleção no cromossomo 16 (46,XY,del(16)(q23)), com IC₅₀: 19.5 µM (caso 15). Em células com cariótipo complexo, com alterações numéricas e estruturais: 44~45,XY,del(4)(q24),-7[5],-15[9],-16[4],-18[8],+r[7],+mar[6][cp10] (caso10), o composto **1** também apresentou significativa atividade antiproliferativa, enquanto o composto **2** foi fracamente citotóxico para todas amostras de LMA.

Os compostos **1** e **2**, frente às amostras com células de LMC, com cariótipo apresentando translocação t(9;22) (cromossomo Philadelphia) (casos 19 e 20), demonstraram alta e moderada citotoxicidade frente aos compostos **1** e **2**, respectivamente, independente da fase da doença (ao diagnóstico ou fase acelerada) e alterações cromossômicas. As alterações cromossômicas adicionais: trissomia do cromossomo 8 e duplo Philadelphia (caso 20), indicam evolução clonal, isto é, avanço no curso da doença, onde as células podem apresentar resistência ao mesilato de imatinibe, antineoplásico utilizado correntemente no tratamento desse tipo de leucemia [12].

Os compostos **1** e **2**, em células de SMD com cariótipo alterado mn(40~44)[14]/mn(70~80)[09]/mn(81~87)[02] (caso 22), apresentaram alta e fraca atividade antiproliferativa, respectivamente, enquanto em células de SMD com cariótipo normal (caso 21), a citotoxicidade foi moderada (**1**) e fraca (**2**), mostrando novamente maior atividade do composto **1** em células com alterações cromossômicas. Wang et al. relataram que alterações cromossômicas clonais são observadas em 30-50% nas SMDs e avaliando 85 casos, 21% apresentaram evolução citogenética conferindo prognóstico desfavorável, com menor tempo de sobrevida aos pacientes [14].

Ao compararmos os compostos **1** e **2** nas diferentes concentrações (Tabela 3) observamos que em todas as concentrações houve diferença estatística significativa entre eles ($p < 0.05$). Ainda verificou-se que entre a menor concentração de **1** (12.5 μM) e a maior concentração de **2** (100 μM), existiu diferença estatística significativa, sendo que o percentual de viabilidade celular do composto **1** na concentração de 12.5 μM é menor do que o composto **2** na concentração de 100 μM , portanto, o composto **1** tem maior capacidade de inibir o crescimento das células do que o composto **2**.

Tabela 3 – Comparação entre os compostos 1 e 2 nas diferentes concentrações

Variáveis	Viabilidade celular%		p-valor
	1	2	
12.5 μM Média (DP)	62,95 (19,46)	73,68 (17,71)	0,006
50 μM Média (DP)	40,77 (21,36)	69,73 (18,26)	0,0001
100 μM Média (DP)	36,27 (21,06)	74,82 (18,86)	0,0001
	1 12.5 μM	2 100 μM	
Média (DP)	62,95 (19,46)	74,82 (18,86)	0,003

DP: desvio padrão

Os compostos estudados possuem dois núcleos triazenos (bistriazenos) complexados com Cobre (CuII). As principais diferenças entre os compostos **1** e **2** são os radicais introduzidos a eles. Os resultados que obtivemos nas análises citotóxicas frente às células leucêmicas nos permitem sugerir que a substituição do átomo de fluor (F) pelo cloro (Cl), e/ou o grupo hidróxi (H) pelo metóxi (CH₃) conferiu maior atividade antileucêmica ao composto **1**. Estes resultados se assemelham ao estudo com compostos triazenos realizado por Domingues et al., nos quais os compostos com cloro também foram mais ativos que compostos com fluor, em células leucêmicas mieloides [10]. Cimborá-Zovko et al. analisaram uma nova classe de 1,3 diaryltriazenos como agentes antineoplásicos frente a diversas linhagens de células tumorais (HeLa e outras), substituíram vários radicais e relataram que os compostos apresentaram atividade citotóxica aumentada quando foram introduzidos grupos acyl (R'C-O) juntamente com grupos doadores de elétrons bromo (Br), cloro (Cl) e trifluorometil (CF₃), enquanto o grupo fluor (F) foi menos ativo [15].

Estes resultados permitem atribuir ao tipo de substituinte introduzido a determinadas posições das moléculas, o aumento da atividade antiproliferativa dos compostos TZCs.

Ao compararmos os compostos e concentrações testadas em relação aos cariótipos das células, se normal ou alterado (Tabela 4), podemos verificar que existiu diferença significativa no percentual de viabilidade celular entre células com cariótipo alterado e células com cariótipo normal, em relação ao composto **1**, nas concentrações de 50 e 100 μM , onde a menor média de viabilidade celular foi encontrada para o cariótipo alterado.

Para o composto **2**, em todas as concentrações (12,5, 50 e 100 μM) e na concentração de 12,5 μM do composto **1**, não existiu diferença significativa em relação ao cariótipo normal ou alterado. Nota-se ainda que em todas as concentrações a menor média de viabilidade celular ocorreu para células com o cariótipo alterado. Então podemos referenciar que células com alterações cromossômicas são mais sensíveis, isto é, apresentaram menor viabilidade que células sem alterações cariotípicas, quando testadas nas concentrações de 50 e 100 μM do composto **1**.

Tabela 4 – Análise comparativa dos compostos e concentração em relação à viabilidade celular (%) e IC50 (μM) com os cariótipos analisados

Composto	Cariótipo		p-valor
	Alterado	Normal	
Concentração (μM)	VC % Média (DP)	VC % Média (DP)	
1/12,5	58,91 (21,80)	67,00 (16,85)	0,342
1/50	29,27 (17,01)	52,27 (19,44)	0,008
1/100	27,09 (19,48)	45,45 (19,15)	0,037
2/12,5	68,82 (20,53)	78,55 (13,60)	0,205
2/50	66,27 (23,58)	73,18 (10,85)	0,388
2/100	68,09 (20,82)	81,55 (14,62)	0,095

VC- Viabilidade celular

Entretanto, quando os compostos **1** e **2** foram testados em células mononucleares normais de medula óssea mostraram-se fracamente citotóxicos (Figura 5).

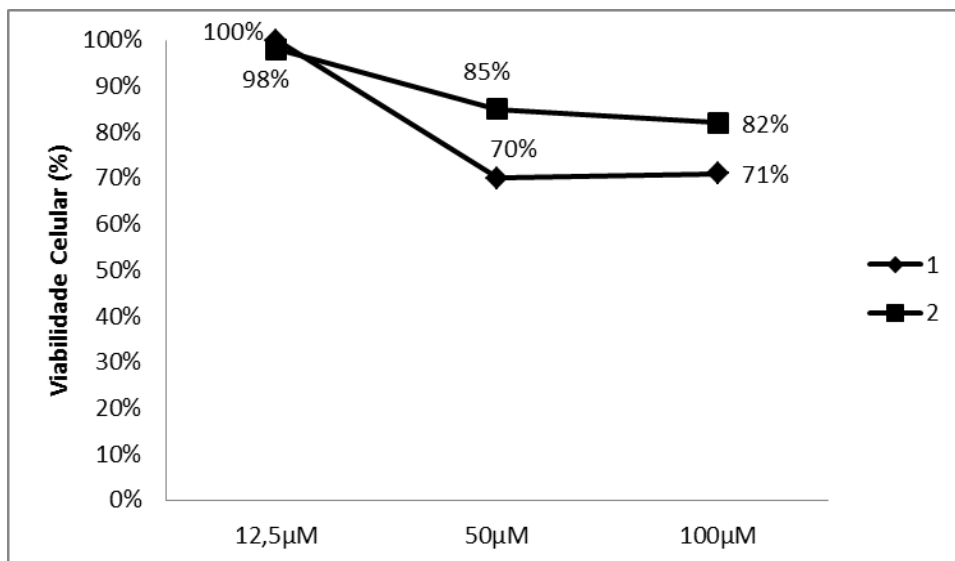


Figura 5 – Viabilidade celular de células mononucleares normais de MO (caso 1) frente a diferentes concentrações dos compostos 1 e 2 pelo ensaio MTT

Nossos resultados assemelham-se aos de Cimborá-Zovko et al., que demonstraram que novos compostos diaryltriazenos foram mais citotóxicos em linhagens tumorais do que em linhagens de células normais [15]. Já Domingues et al. relataram que compostos triazenos não complexados tiveram alta toxicidade em leucócitos normais [10].

As células neoplásicas em fase de replicação mostram-se mais suscetíveis à ação citotóxica dos agentes alquilantes do que as células normais, as quais possuem índice de replicação mais baixo e são menos afetadas. O principal local de alquilação no interior do DNA é a posição N7 da guanina. A alquilação da guanina pode resultar em codificação defeituosa, levando à ruptura do filamento da DNA [7].

Considerando que os fármacos antineoplásicos devem erradicar as células neoplásicas sem danificar as células normais, e não existem, no momento atual, fármacos disponíveis totalmente desprovidos de toxicidade [7], os compostos triazenos os quais realizamos a nossa pesquisa possuem potencial atividade como agentes antineoplásicos.

2.3 Atividade antibacteriana

Dos compostos testados, o composto 1 apresentou atividade antibacteriana de estreito espectro frente as cepas ATCC *Micrococcus luteus* 7468 com CIM =

64µg/mL, *Staphylococcus aureus* 25923 com CIM = 128 µg/mL, e cepas MDR *Staphylococcus aureus* com CIM = 64 µg/mL. O composto **2** apresentou atividade antibacteriana apenas frente a cepas MDR *Staphylococcus aureus* com CIM = 128 µg/mL.

O *S. aureus* MDR no qual os compostos **1** e **2** apresentaram atividade antimicrobiana, isolado da corrente sanguínea de paciente com septicemia internado no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), mostrou resistência à meticilina (MRSA), gene *mecA* positivo, o qual foi confirmado por metodologia genotípica pela reação em cadeia da polimerase (PCR), e apresentou sensibilidade somente à daptomicina, linezolida e vancomicina, todos antimicrobianos de uso intravenoso.

Os valores de CIM sugerem que o composto **1** apresentou maior atividade antibacteriana que o composto **2**, frente as cepas analisadas. Para a maioria das bactérias, a CIM destes compostos foi maior que 128 µg/mL.

Estes achados são semelhantes a estudos de Domingues et al., em que três compostos trizenos não complexados apresentaram fraca atividade frente a bactérias gram positivas e gram negativas, com exceção de um deles que apresentou CIM de 32 µg/mL frente a *Bacillus cereus* [10]. Já Hörner et al. demonstraram que de quinze compostos trizenos estudados, doze apresentaram algum tipo de atividade frente às bactérias gram positivas *Streptococcus agalactie*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Corynebacterium sp* e gram negativa *Enterobacter cloacae* [9].

O mecanismo envolvido na atividade antibacteriana apresentada pelos dois compostos testados em nosso estudo pode ser o mesmo citado por outros autores, que devido a sua capacidade quelante, os TZCs formariam quelatos com constituintes da parede celular bacteriana, impedindo sua síntese [9, 16]. Esse mecanismo pode ser reforçado uma vez que o referido isolado apresentou sensibilidade à vancomicina, antimicrobiano de uso clínico, e cujo mecanismo de ação ocorre pela inibição da síntese da parede celular das bactérias gram positivas [7]. O mecanismo de ação exato da daptomicina não é totalmente elucidado, mas atribui-se a sua capacidade de ligação à membrana celular do microrganismo e consequente despolarização, produzindo rápida morte celular [7]. A linezolida constitui-se em um antimicrobiano de estreito espectro, com atividade somente em gram positivas, da classe das oxazolidinonas, a qual atua inibindo a síntese proteica [7].

Os resultados obtidos na nossa pesquisa mais uma vez justificam a pesquisa da atividade antibacteriana de novos compostos triazenos.

3 Conclusão

A atividade citotóxica dos compostos sintetizados foi determinada em células de LLA, LMA, LMC, SMD e células mononucleares normais de medula óssea. O composto **1** demonstrou alta citotoxicidade frente a todos os tipos celulares estudados. O composto **1**, complexado com Cu(II), com radicais CH₃ e átomos de Cl foi mais citotóxico que o composto **2**, o qual contém radicais H e átomos de F em sua estrutura. Células leucêmicas com alterações cromossômicas foram mais sensíveis ao composto **1** nas concentrações de 50 e 100 µM do que células leucêmicas com cariótipo normal. Esta propriedade deve ser explorada tendo em vista a busca por agentes com atividade farmacológica direcionada a alvos celulares específicos e reduzida toxicidade em células normais.

4 Seção Experimental

4.1 Materiais

Todos os reagentes e solventes utilizados no estudo foram de grau reagente e utilizados sem purificação adicional. Para ensaios biológicos, a água foi purificada por sistema de purificação de água Millipore Ω com resistência de 18 MW e esterilizados por autoclave.

4.2 Atividade Biológica

4.2.1 Atividade citotóxica in vitro

4.2.1.1 Cultura de células

As células leucêmicas de LLA, LMA, LMC, SMD e células mononucleares normais foram obtidas de amostras de medula óssea, excedentes de exames de

pacientes em diagnóstico de leucemias, sem tratamento prévio, e amostras de pacientes em recidiva, atendidos no HUSM.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética CCAA sob o número do processo 23081.012084/2008-32.

As amostras foram coletadas em seringa heparinizada e as células foram separadas por centrifugação por gradiente de densidade com Histopaque®(Sigma). As células foram lavadas e ressuspensas com *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640-Sigma). A concentração celular foi ajustada pela contagem em Câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi verificada pelo corante azul de tripan.

4.2.1.2 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade *in vitro* dos compostos estudados frente a células leucêmicas de LLA, LMA, LMC, SMD e células mononucleares normais de medula óssea foi analisada através do método do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), descrito por Mosmann [17]. O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal MTT (coloração amarela) para formazan (coloração púrpura), pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável, permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células vivas. Esta técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, avaliando assim a citotoxicidade.

As células leucêmicas foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF-Gibco®), 100 UI/ml de penicilina G e 100mg/ml de estreptomicina, por 24 h a 37 °C em 5% de CO₂.

As células em suspensão foram distribuídas em placas de 96 poços na concentração de 3x10⁶ células/poço, incubadas com os compostos nas concentrações de 12,5 µmol/mL, 50 µmol/mL e 100 µmol/mL, por 20 horas a 37 °C em 5% de CO₂. Após foram acrescentados 10 µL da solução de MTT (5 mg/mL) às culturas tratadas, e estas incubadas por um período de 4 horas a 37 °C em 5% de CO₂. Após o período total de incubação, 24 horas, retirou-se o sobrenadante e foram adicionados 100 µL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO). A densidade óptica (DO) de cada poço foi obtida no comprimento de onda de 570 nm, em leitor de microplacas *Epoch*® possibilitando determinação do potencial citotóxico de cada substância testada em relação ao controle não tratado. Os ensaios foram realizados

em triplicatas. A viabilidade celular foi calculada pela seguinte fórmula: DO das células tratadas/DO das células não tratadas x 100 = %.

Os valores de IC₅₀ que correspondem à concentração do composto capaz de inibir o crescimento de 50% das células, foi estimado pelo programa *GraphPad Prizm 5*.

4.2.2 Atividade antibacteriana *in vitro*

4.2.2.1 Cepas bacterianas

A atividade antimicrobiana dos complexos **1** e **2** foi avaliada *in vitro* frente 21 microrganismos padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos MDR: cepas bacterianas gram positivas: *Micrococcus luteus* 7468, *Enterococcus faecalis* 51299, *Enterococcus faecalis* 29212, *Staphylococcus saprophyticus* 15305, *Staphylococcus aureus* 25923, *Staphylococcus epidermidis* 12228, *Bacillus cereus* 14579; e gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa* 27859, *Klebsiella pneumoniae* 700603, *Escherichia coli* 35218, *Salmonella thyphymurium* 14028.

Os isolados clínicos MDR foram oriundos de amostras de sangue periférico, escarro, urina e secreção traqueal de pacientes atendidos no HUSM. Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram realizados seguindo os padrões do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), mostrando que a maioria das bactérias foram sensíveis a apenas um a três antimicrobianos. Testes genotípicos mostraram expressão dos genes *mecA*, *icaD*, produtor de biofilme, *erm_i* e fenótipo de betalactamase de espectro estendido (ESBL) em algumas bactérias.

As cepas bacterianas e os isolados clínicos foram armazenados a -70°C no banco de microrganismos do Laboratório de Bacteriologia no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFSM.

4.2.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A atividade antibacteriana dos compostos foi avaliada pela determinação da CIM, definida como a menor concentração do composto que impede o crescimento visível do microrganismo, seguindo-se o método padrão de microdiluição em caldo,

recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) [18]. Os compostos foram dissolvidos em quantidades equivalentes de água ultrapura estéril e etanol (1:1) e testados nas concentrações de 0,25 a 128 µg/mL. O meio de cultura inoculado com bactérias e diferentes concentrações dos compostos foram incubados em placas de 96 poços a 35 ± 2 °C por 24 horas. Em paralelo, foram realizados controles positivo e negativo. O primeiro contendo apenas o meio de cultura e o microrganismo de interesse, e o segundo contendo o composto sem o microrganismo. Os testes foram realizados em duplicata e a leitura visual realizada para determinação da CIM, como a menor concentração do composto que inibiu completamente o crescimento dos microrganismos nos poços.

4.2.3 Análise citogenética

Para a obtenção dos cromossomos metafásicos em amostras de medula óssea, foi utilizado o método descrito por Swansbury com modificações, através de cultura de curta duração sem mitógenos [19]. Após separação das células mononucleares da medula óssea, por gradiente de densidade com Histopaque[®] (Sigma), as células foram incubadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF (Gibco[®]) por 16 a 24 h a 37°C. Após foi adicionado colchicina (0,1µg/mL) por 1 h a 37°C. Em seguida, as células foram tratadas com solução hipotônica (KCl 0,075mol/L) e ressuspensas em fixador de Carnoy (metanol: ácido acético 3:1). Esse material foi distribuído sobre lâminas, submetido ao bandeamento G por tripsina-Giemsa e posterior análise cromossômica. Vinte metáfases foram analisadas e capturadas pelo sistema de imagem *Applied Imaging CytoVision*[®]. As anormalidades cromossômicas foram descritas de acordo com a *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN) [20].

4.3 Análise estatística

O procedimento metodológico adotado foi o de uma pesquisa exploratória e descritiva. A apresentação dos resultados envolveu a estatística descritiva com a distribuição de frequências simples e relativa, bem como medidas de tendência central e de variabilidade (média e desvio-padrão). Para avaliar os dados referentes às diferentes concentrações dos compostos **1** e **2** foi aplicado o teste de

normalidade dos dados, sendo que todos demonstraram-se normais, sendo aplicado o teste t pareado. Na avaliação da comparação do cariótipo normal e alterado em relação às demais variáveis, foi testada a normalidade de cada variável e analisado o tipo de teste a ser utilizado. Como eram dois grupos independentes, quando os dados demonstraram-se normais foi aplicado teste t, e quando não seguiam uma distribuição normal, foi aplicado o teste Mann Whitney. Foi estabelecido o nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

Os dados referentes ao presente estudo foram processados e analisados de forma eletrônica a partir da construção de um banco de dados (Excel® 2007) e de um programa de análise específico, o software Statistical Package for Social Science 15.0 (SPSS).

Material Suplementar

Tabela 5 – Atividade antibacteriana *in vitro* dos compostos triazenos **1** e **2** frente a cepas bacterianas ATCCs

Cepas bacterianas ATCC	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
	Composto 1	Composto 2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27859	>128	>128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 700603	>128	>128
<i>Micrococcus luteus</i> 7468	=64	>128
<i>Enterococcus faecalis</i> 51299	>128	>128
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 15305	>128	>128
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	=128	>128
<i>Escherichia coli</i> 35218	>128	>128
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228	>128	>128
<i>Salmonella thyphymurium</i> 14028	>128	>128
<i>Bacillus cereus</i> 14579	>128	>128
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	>128	>128

Tabela 6 – Atividade antibacteriana *in vitro* dos compostos trizenos 1 e 2 frente a isolados clínicos MDRs

Isolados clínicos MDR	CIM (µg/mL)	
	Composto 1	Composto 2
1. <i>Staphylococcus aureus</i>	=64	=128
2. <i>Staphylococcus aureus</i>	>128	>128
3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>128	>128
4. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	>128	>128
5. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	>128	>128
6. <i>Escherichia coli</i>	>128	>128
7. <i>Acinetobacter baumannii</i>	>128	>128
8. <i>Acinetobacter baumannii</i>	>128	>128
9. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	>128	>128
10. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	>128	>128

Tabela 7– Perfil de sensibilidade dos isolados clínicos MDRs

Antimicrobiano	1. <i>S.aureus</i>	2. <i>S.aureus</i>	3. <i>P.aeruginosa</i>	4. <i>K.pneumoniae</i>	5. <i>K.pneumoniae</i>	6. <i>E. coli</i>	7. <i>A.baumannii</i>	8. <i>A.baumannii</i>	9. <i>S. epidermidis</i>	10. <i>S. epidermidis</i>
Amicacina	–	–	R	R	I	R	R	I	–	–
Amoxicilina/Clavulonato	R	R	–	R	R	R	–	–	–	–
Ampicilina/Sulbactam	R	R	–	R	R	R	R	I	–	–
Ampicilina	Blac	Blac	–	R	R	R	–	R	–	–
Aztreonam	–	–	–	R	–	–	–	–	–	–
Cefazolina	R	R	–	–	–	–	R	R	–	–
Cefalotina	–	–	–	R	–	–	–	–	–	–
Cefepime	–	–	–	R	R	R	–	–	–	–
Ceftazidime	–	–	R	R	R	R	R	R	–	–
Ceftriaxona	R	R	–	R	–	–	–	–	–	–
Cefoxitina	–	–	–	–	–	–	R	R	R	R
Cefuroxime	–	–	–	–	R	R	–	–	–	–
Ciprofoxacino	–	–	R	R	R	R	R	R	S	S
Clindamicina	R	R	–	–	–	–	–	–	S	S
Daptomicina	S	S	–	–	–	–	–	–	–	–
Eritromicina	R	R	–	–	–	–	R	R	S	R
Ertapenem	–	–	R	S	–	R	–	–	–	–
Gentamicina	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
Imipenem	R	R	R	S	S	S	R	I	–	–
Levofloxacino	R	R	–	–	R	R	R	R	S	S

Linezolida	S	S	-	-	-	-	-	-	S	S
Meropenem	R	R	R	S	S	-	R	R	-	-
Nitrofurantoína	-	-	-	-	-	R	-	-	S	S
Norfloxacino	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S
Oxacilina	R	R	-	-	-	-	-	-	R	R
Penicilina G	Blac	Blac	-	-	-	-	-	-	R	R
Piperacilina/Tazobactam	-	-	-	-	R	R	-	-	-	-
Polimixina B	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-
Rifampicina	R	R	-	-	-	-	-	-	S	S
Sulfametoxazol/trimetropina	R	S	-	R	R	R	R	R	R	S
Teicoplanina	-	S	-	-	-	-	-	-	S	S
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R
Ticarcilina/Clavulonato	-	-	R	-	R	S	R	R	-	-
Tigeciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	R	S
Tobramicina	-	-	R	-	R	R	S	S	-	-
Vancomicina	S	-	-	-	-	-	-	-	S	S

R: resistente, S: sensível, I: intermediário, Blac: Beta-lactamase positiva; -: não testado

Agradecimentos

Este estudo teve apoio do CNPq (proc. 305254/2009-0), CAPES e Departamento de Hematologia-Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria.

Referências

- [1] M. S. Pombo-de-Oliveira, Leucemias agudas abordagem imunomolecular no diagnóstico e na pesquisa, INCA, Rio de Janeiro, 2008.
- [2] D. Grimwade, R.K. Hills, Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology*, 1 (2009) 385-395.
- [3] V. Grossmann, S. Schnittger, A. Kohlmann, C. Eder, A. Roller, F. Dicker, C. Schmid, C. M. Wendtner, P. Staib, H. Serve, K. A. Kreuzer, W. Kern, T. Haferlach, C. Haferlach, A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations, *Blood* 120 (2012) 2963-2972.
- [4] F. Marchesi, M. Turriziani, G. Tortorelli, G. Avvisati, F. Torino, L. De Vecchis, Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems, *Pharmacol. Res.*, 56 (2007) 275-287.
- [5] P. Caporaso, M. Turriziani, A. Venditti, F. Marchesi, F. Buccisano, M.C. Tirindelli, E. Alvino, A. Garbin, G. Tortorelli, L. Toppo, E. Bonmassar, S. D'Atri, S. Amadori, Novel role of triazenes in haematological malignancies: Pilot study of temozolomide, lomeguatrib and IL-2 in the chemo-immunotherapy of acute leukaemia, *DNA Repair* 6 (2007) 79-86.
- [6] K. Seiter, S. Katragadda, D. Ponce, M. Rasul, N. Ahmed, Temozolomide and cisplatin in relapsed/refractory acute leukemia, *J. Hematol. Oncol.* 2 (2009) 21.

- [7] B.G. Katzung, *Farmacologia Básica e Clínica*, 10^a ed., Mcgraw-hill, São Paulo, 2010.
- [8] L. Bonmassar, F. Marchesi, E. Pascale, O. Franzese, G. P. Margison, A. Bianchi, S. D'Atri, S. Bernardini, D. Lattuada, E. Bonmassar, A. Aquino, Triazene compounds in the treatment of acute myeloid leukemia: a short review and a case report, *Curr. Med. Chem.* 20 (2013) 2389-2401.
- [9] M. Hörner, V. F. Giglio, A. J. R. W. A. dos Santos, A.B. Westphalen, B.A. Iglesias, P.R. Martins, C.H. do Amaral, T.M. Michelot, L.G.B. Reetz, C. de M. Bertoncheli, G.L. Paraginski, R. Horner, Triazenos e atividade antibacteriana, *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 44 (2008) 441-449.
- [10] V.O. Domingues, R. Hörner, L.G.B. Reetz, F. Kuhn, V.M. Coser, J.N. Rodrigues, R. Bauchspiess, W.V. Pereira, G.L. Paraginski, A. Locatelli, J. de O. Fank, V.F. Gigli, M. Hörner, In vitro evaluation of triazenes: DNA cleavage, antibacterial activity and cytotoxicity against acute myeloid leukemia cells, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 2226-2237.
- [11] M. Hörner, G. M. Oliveira, V. F. Giglio, L. C. Visentin, F. Broch, J. Beck, Bidimensional self-assembling of [HgII(RPhNNNPhR')₂] (R = acetyl, R' = F) through metal-η⁴-arene π-interactions and non-classical C–H···O bonding: Synthesis and X-ray characterization of a bis diaryl asymmetric-substituted triazenide complex polymer of Hg(II), *Inorg. Chim. Acta* 359 (2006) 2309-2313.
- [12] S. Heim, F. Mitelman, *Cancer Cytogenetics*, 3rd ed, Wiley-Blackwell, New Jersey, 2009.
- [13] A. V. Moorman, H. M. Ensor, S.M. Richards, L. Chilton, C. Schwab, S.E. Kinsey, A. Vora, C. D. Mitchell, C. J. Harrison, Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial, *The Lancet Oncol.* 11 (2010) 429-438.
- [14] H. Wang, X. Q. Wang, X.P. Xu, G.W. Lin, Cytogenetic evolution correlates with poor prognosis in myelodysplastic syndrome, *Cancer Genet.Cytogenet.* 196 (2010) 159-166.
- [15] T. Cimborá-Zovko, A. Brozovic, I. Piantanida, G. Fritz, A. Virag, B. Ali, V. Majce, M. Kocevar, S. Polanc, M. Osmak, Synthesis and biological evaluation of 4-nitro-substituted 1,3-diaryltriazenes as a novel class of potent antitumor agents, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 2971-2983.
- [16] A.K. Goswami, D.N. Purohit, Synthesis and antimicrobial activities of some hydroxytriazenes: a new class of biologically active compounds, *Anal. Sci.* 17 (2001) 1789-1791.
- [17] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55-63.

[18] CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

[19] J. Swansbury, (Ed). Cancer cytogenetics: methods and protocols, Human Press, New Jersey, 2003.

[20] L. G. Shaffer, N. Tommerup, ISCN 2005: An international system for human cytogenetic nomenclature, S. Karger, Switzerland, 2005.