



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

MICHELLE XAVIER GONÇALVES PEREIRA

Estudo da regulação das DNA topoisomerasas durante o desenvolvimento de resistência ao etoposídeo e do papel antitumoral de novos compostos em leucemias agudas

Orientadora: Prof. Dra. Raquel Ciuvalschi Maia

RIO DE JANEIRO

2017



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

MICHELLE XAVIER GONÇALVES PEREIRA

Estudo da regulação das DNA topoisomerasas durante o desenvolvimento de resistência ao etoposídeo e do papel antitumoral de novos compostos em leucemias agudas

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Oncologia

Orientadora: Prof. Dra. Raquel Ciuvalschi Maia

**RIO DE JANEIRO
2017**

**FICHA CATALOGRÁFICA SERÁ ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INCA
PARA A VERSÃO FINAL DA TESE**

(A ser impressa no verso da primeira folha de rosto)

Palavras-chave: Leucemia mielóide aguda, leucemia linfóide aguda, resistência a múltiplas drogas, ácido pomólico, LQB-118, LQB-223, Akt, microRNAs, DNA topoisomerasas, Topo I e Topo II α .



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

MICHELLE XAVIER GONÇALVES PEREIRA

Estudo da regulação das DNA topoisomerasas durante o desenvolvimento de resistência ao etoposídeo e do papel antitumoral de novos compostos em leucemias agudas

ORIENTADORA: Prof. Dra. Raquel Ciualschi Maia

Rio de Janeiro, 17 de novembro de 2017

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba- INCA - Presidente

Prof. Dra. Patricia Abraão Possik- INCA

Prof. Dra. Aurea Echevarria Aznar Neves Lima - UFRRJ

Prof. Dr. André Luiz Mencialha - UERJ

Prof. Dra. Barbara da Costa Reis Monte-Mor- INCA - Suplente I

Prof. Dra. Ana Carolina Rennó Soderó - UFRJ - Suplente II

RIO DE JANEIRO

2017

Àqueles que sempre me inspiraram, me apoiaram e me ensinaram que 'navegar é preciso, viver não é preciso': José Carlos, Tânia Maria, Jennifer e Egberto.

AGRADECIMENTOS

Ao longo dessa estrada científica fui me moldando à medida que fui conhecendo cada vez mais cientistas loucos. Loucos por aquilo que fazem, pelo amor à ciência e pela vontade de tornar o mundo melhor. Não à toa vim parar no grupo carinhosamente chamado de ‘hematoloucos’. A cada um deles tenho que agradecer imensamente por todo o conhecimento compartilhado, a começar pela chefe do laboratório Dra. Raquel Maia que me recebeu de braços abertos quando eu a procurei, vindo de outra instituição, com a ideia de desenvolver um trabalho com topoisomerasas e quimiorresistência. Muito obrigada por embarcar nessa empreitada comigo, pelo suporte e oportunidade para desenvolver esse trabalho dentro e fora do laboratório através das diversas colaborações, propiciando o meu desenvolvimento como pesquisadora em formação.

Muito obrigada também à Dra. Claudete Klumb pelas discussões científicas nas nossas reuniões semanais, nos fazendo sempre ‘sair da caixa’ com suas perguntas no estilo ‘advogado do diabo’ como ela mesma diz.

Também não posso deixar de agradecer a todos os companheiros do lab-hemato que tornaram os meus dias muito mais divertidos no laboratório. O que seria das manhãs (melhor mudar para os dias) sem as cantorias afinadíssimas da Dani, sem o café com piadas *nerds* do Marcos, sem o ‘bom dia galerinha’ da Paty, sem os comentários sarcásticos da Marcela, nossa Súria, sem os comentário da Paloma ‘Bracho’, a gêmea má, para jogar ainda mais lenha na fogueira (dizem que ela na verdade é que é a Súria), sem a tagarelice da Lauana ‘Bracho’, a gêmea boa que cativou a todos com seu sotaque do ‘interiôrrrrrrrr’, sem a bondade da Robs, sempre colocando o bem-estar do grupo a cima de tudo e trazendo chocolates para todos (embora com curto prazo de validade, na maioria das vezes, mas que a gente devora em uma manhã só), sem a praticidade e clareza de ideias da Fê que muitas vezes me orientou, trazendo foco para essa geminiana aqui que sempre acha que dará tempo de fazer tudo ao mesmo tempo, sem o “posso te explorar muito” da Paulinha sempre seguidos de um pedido nada explorador e de um “você é muito boa para mim”, sem os *embromations* das letras de músicas cantaroladas pela Gabi, sem os cortes sarcásticos da Frava no estilo “quem canta mesmo essa música? Tá, então deixa eu ouvir ELE cantar”, sem a ‘sagacidade’ do Gabriel que sempre arranja um jeito de implementar algo novo, sem os comentários criativos e mega originais da Thaís, sem o entusiasmo efervescente e contagiante do Gustavo na defesa de uma causa,

inclusive suas tentativas em nos reunir em Cabo Frio (eu ainda espero que consigamos!), sem ter que subir e descer as escadas lentamente no ritmo da Debs, deixando o corrimão livre para ela, claro, sem os pedidos fofos de abraços da Tandy, sem os abraços “recusados” pelo Luciano como prova de sua virilidade máxima (só no início!), sem a positividade da Gis, sempre com mil ideias para desenvolver e editais de *grants* para solicitarmos e sem a Karina que mudou de grupo, mas nunca deixou o lab-hemato e sempre está disponível para nos auxiliar com o citômetro de fluxo? Só tenho a agradecer a vocês por todo carinho, receptividade e aprendizado.

Agradeço em especial as amigas mais próximas, Paula e Fernanda, por toda ajuda ao longo dessa caminhada, pelas inúmeras discussões científicas, correções e sínteses de textos, ajuda com desenho, planejamento e execução de experimentos (seja ao vivo ou por Skype), por caminharem junto comigo nessa vida intensa de ser cientista, tornando a trajetória muito mais suave, mas principalmente pela amizade que levo para a vida toda, vocês têm um lugar cativo no meu coração.

Agradeço aos meus colaboradores Dr. Paulo Costa e Dra. Camila Buarque por cederem os compostos LQBs avaliados nesse estudo, à Dra. Cerli Gattas pelo composto ácido pomólico, aos Dres. Ernesto Caffarena, Maurício Costa e à Dra. Amanda Sutter pela colaboração para os estudos computacionais, às Dras. Cíntia e Aline Rangel pela colaboração para as análises de citogenética e ao Dr. Eric Asselin por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa durante o meu doutorado sanduíche para desenvolver o estudo com as proteínas da família Akt. Muito obrigada a todos do *Groupe de Recherche en Signalisation Cellulaire*, em especial a Sophie Parent, François Fabi, Pascal Adam, Laurence Tardiff, Dadou Likonza e Christian Mayemba por me acolherem tão calorosamente em pleno inverno canadense, por compartilharem o laboratório, a bancada, os experimentos, os *journals club*, e também pelos momentos de descontração e inclusão na rotina *Québécois* nas noites de karaokê e de queijos e vinhos... foi uma experiência enriquecedora, tanto profissionalmente quanto culturalmente!

Obrigada também a querida Anabel Demers do escritório de recrutamento internacional da *Université du Québec à Trois-Rivières* (UQTR), uma pessoa tão carismática e ‘do bem’ que para facilitar a vida dos alunos internacionais até aprendeu a falar português (algo realmente raro por lá). Agradeço também aos amigos brasileiros que fiz em *Trois-Rivières*, em especial ao Rodrigo Oliveira, Erika Melo e Marcela Pereira por toda ajuda e solidariedade que foram imprescindíveis durante a minha estadia tão longe de casa, por me buscar e me levar na rodoviária, por ajudar

com as minhas malas enormes, pelas saídas turísticas nos finais de semana e por me apresentarem o badminton, um novo esporte tão divertido que eu virei fã.

Agradeço também aos amigos 'gremlins' que fiz durante o mestrado na Fiocruz e que carreguei comigo de lá para a vida (especialmente os mais próximos, Ciça, Naty, Luãna, Ana, Babi, Paloma, Bel, Thaysa, Marilúcia, Fatinha, William, Dani, Suzanna, Thati, Juju, André, Carol, Lívia e Neusa, minha primeira filha científica). Obrigada também as minhas irmãs sereias Bu, Naty, Calu, Lara e Cele que estão na minha vida desde a infância quando nos apaixonamos pelo nado sincronizado. Crescemos juntas, unidas pelo esporte e eu só tenho a agradecer pela amizade e por todos os momentos maravilhosos que dividimos dentro e fora das piscinas meninas. Aos meus amigos-irmãos que carrego comigo desde o Colégio Pedro II (Rodrigo, Marcelo, Mariah, Marianna, Bernardo, Theo, Maíra, Aline, Lívia, Júlia, Clarissa, Steffanie e aos recentemente adicionados, Felipe, Marília, Denis, Maria Victoria e Chiara), vocês são minha segunda família, a família do coração que escolhemos e sei que posso contar com vocês para o que der e vier! Obrigada pelos mais de 20 anos de amizade, por aturarem a minha falta de tempo, minha indisponibilidade para a vida social (principalmente nessa reta final de confecção da tese), por me apoiarem, por me darem força para não desistir no meio do caminho e por todos os momentos leves e divertidos que passamos juntos. Em breve teremos mais motivos para confraternizar e comemorar (assim espero!).

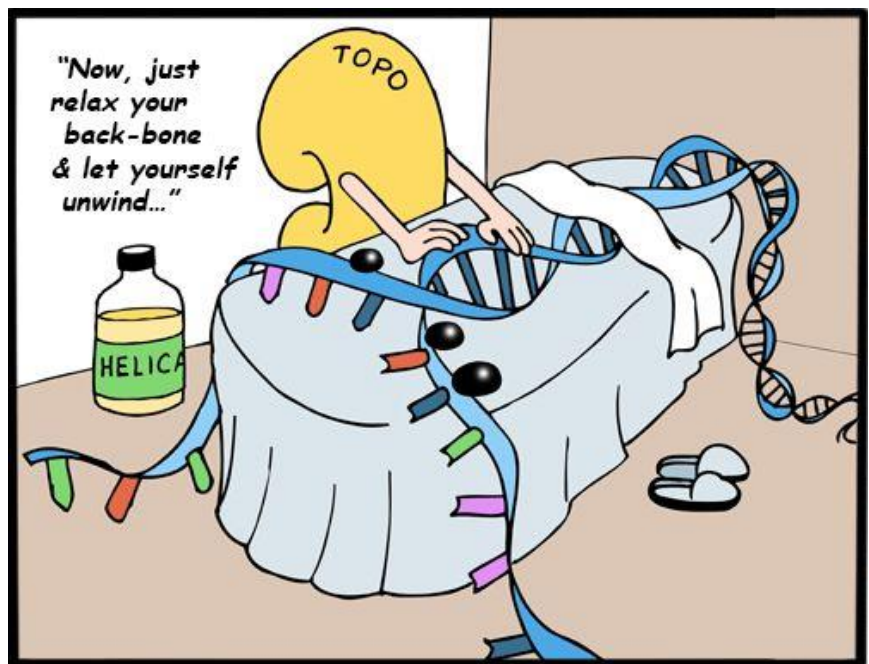
Agradeço a toda minha família, meus primos Wallace, Kelly, Nathália, Gabriela, Bruno, Bibiana e Nilda, meus tios Jorge, Ana, Sônia, Alexandre, Sílvio, Cláudia, Cristina e Wanda que sempre têm uma palavra de incentivo para me dar e sempre estão torcendo pelas minhas realizações. Obrigada a minha cunhada Alessandra que ao contribuir com a produção de um livro técnico me disse que admirava muito quem se dedicava à pesquisa! (é, não é fácil...). Obrigada ao meu concunhado Guilherme, sogros Earli e Nadson, sobrinhas Giovanna e Sophie (também minha afilhada) por todo apoio, incentivo, carinho e amor. Obrigada também ao meu 'cunhadinho' Vinícius que acabou de chegar, mas já passou por um mestrado e compreende bem o meu momento de tensão! (rsrs). Só tenho a agradecer também aos meus avós João e Isaura que estão sempre torcendo por mim e quando eu perguntei se eles sentiram muitas saudades durante a minha estadia fora do país, eles me responderam que sim, mas que desejavam o melhor para mim, que eu fosse feliz (realmente não tem como não ser feliz com avós tão fofos assim!!!)

Agradeço imensamente aos meus pais José Carlos e Tânia, minha irmã Jennifer e meu marido Egberto por estarem sempre ao meu lado me dando apoio incondicional às aventuras profissionais que eu decidi seguir, mesmo não entendendo muito bem o que eu pesquiso. Obrigada por estarem presentes em todas as apresentações me dando suporte, mesmo sabendo que essas costumam ser entediantes para quem não é da área científica. Obrigada pelo incentivo e estímulo para seguir na profissão que eu escolhi, obrigada por todo carinho e amor que vocês me dão todos os dias, eu não seria nada sem vocês! Pai, obrigada pelo ‘paitrocínio’ em inúmeros momentos desde que eu comecei a iniciação científica e por nunca deixar de acreditar em mim. Ninha, obrigada por ser minha companheira de todas as horas, minha cúmplice e confidente e por não ficar chateada com as minhas negativas de convites a saídas nos finais de semana, sempre tendo que ouvir “eu não posso, deixa para depois que eu defender”. Obrigada por me aguentar, isso está acabando... te amo! Também tenho que agradecer ao Beto pela formatação das referências bibliográficas dessa tese, um trabalho hercúleo que acabou sobrando para o marido (você disse ‘sim’ na alegria e na tristeza)! Obrigada amor por toda dedicação, companheirismo, carinho e compreensão, mesmo tendo que passar as últimas férias em casa por conta da doutoranda aqui que tinha que escrever e não tinha tempo para viajar! Obrigada por tornar a minha vida mais colorida, te amo imensamente! Obrigada também mãe pela ajuda para imprimir, encadernar e entregar todas as cópias (mãe sempre salva os filhos... obrigada mamis, pela preocupação comigo e por todo zelo. Vocês são meus maiores tesouros!

Agradeço aos membros da banca por terem aceitado o convite, por ler e avaliar esse documento, contribuindo para a minha formação.

Por último, mas de suma importância, agradeço as agências de fomento Capes, CNPq, Faperj, Ministério da Saúde, Inca, Programa de Oncobiologia/UFRJ pelo financiamento e apoio que propiciou a execução deste trabalho.

Não tenho como chegar ao final desse trabalho sem agradecer a tantas pessoas. Espero que minha memória (que não é muito boa) tenha me ajudado a não esquecer ninguém, minha intenção foi a melhor possível. *Como dito por Isaac Newton, ‘se cheguei até aqui foi porque me apoiei nos ombros de gigantes’, a todos vocês meus gigantes queridos, meu MUITO OBRIGADA!*



(Clontech Cartoons "DNA Therapy")

Estudo da regulação das DNA topoisomerasas durante o desenvolvimento de resistência ao etoposídeo e do papel antitumoral de novos compostos em leucemias agudas

RESUMO

**TESE DE DOUTORADO
Michelle Xavier Gonçalves Pereira**

Entre as neoplasias hematológicas, as leucemias agudas configuram o maior número de mortes a cada ano. A quimioterapia para estas neoplasias envolve inibidores de topoisomerase, como as antraciclinas, associados a outros fármacos. Entretanto, alguns pacientes não respondem ao tratamento devido ao desenvolvimento do fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR), considerada a principal causa de refratariedade e falha no tratamento. Devido à alta taxa de proliferação celular, os tumores superexpressam as DNA topoisomerasas I e II α humana (hTopo I e II α), tornando essas enzimas bons alvos para o desenvolvimento de novos fármacos. Neste contexto, a procura por novos compostos capazes de aumentar a taxa de sobrevivência global em pacientes com leucemias agudas e que sejam eficazes em células com fenótipo MDR se faz necessária. Os objetivos deste trabalho foram: a) desenvolver linhagens celulares de leucemias agudas resistentes ao etoposídeo (VP-16); b) caracterizar o fenótipo de resistência, mediado por alterações nas enzimas hTopo I e II α ; c) avaliar o mecanismo de ação dos novos compostos LQBs (LQB-118, -192, -223, -266, -268 e -326) e ácido pomólico (PA), como potenciais inibidores de hTopo I e/ou II α ; e d) investigar a atividade antitumoral dos compostos mais promissores nas linhagens de leucemias agudas resistentes em comparação às parentais. Foi demonstrado que dentre os compostos LQBs avaliados apenas LQB-118 e LQB-223 foram efetivos e específicos em inibir hTopo II α . PA demonstrou ser um composto dual inibindo hTopo I e II α . Os três compostos ativos não intercalam no DNA e atuam como inibidores catalíticos, não apresentando afinidade de interação ao sítio de ligação entre o DNA e camptotecina ou VP-16. Os estudos de modelagem molecular também sugeriram que LQB-118 e LQB-223 apresentam alta afinidade de ligação à região ATPase de hTopo II α . Foram desenvolvidas as linhagens celulares CEM-R (leucemia linfóide aguda) e U937-R (leucemia mielóide aguda) a partir da exposição a concentrações crescentes de VP-16. Todas as linhagens apresentam a proteína BCRP funcional e expressam glicoproteína-P (Pgp), sendo esta superexpressa nas linhagens resistentes. Um aumento da expressão do microRNA-143, cujo alvo é hTopo II α , foi observado nas linhagens resistentes. Além disso, baixos níveis de proteínas hTopo II α e II β foram detectados nas células resistentes que também apresentaram um aumento do nível de hTopo I em comparação com a linhagem parental. Níveis aumentados de proteínas da família Akt, também foram encontrados nas células resistentes comparadas às parentais. O tratamento com PA, LQB-118 e LQB-223 reduziu a viabilidade celular das linhagens resistentes e parentais, mostrando que esses compostos são eficazes na superação do mecanismo de resistência. Além disso, o tratamento com estes compostos alterou a distribuição do ciclo celular e induziu morte celular. Ainda, o tratamento com LQB-118 reduziu o nível proteico de Akt e isso não foi associado à indução de apoptose. Em conclusão, nossos resultados sugerem que PA, LQB-118 e LQB-223 apresentam atividade antitumoral em células de leucemias agudas, incluindo células com fenótipo MDR. Seu mecanismo de ação envolve a inibição catalítica das enzimas DNA topoisomerasas humana, destacando esses compostos como agentes antineoplásicos, com potencial para aprimorar o esquema terapêutico das leucemias agudas. **Palavras-chave:** Leucemia mielóide aguda, leucemia linfóide aguda, resistência a multiplas drogas, ácido pomólico, LQB-118, LQB-223, Akt, microRNAs, DNA topoisomerasas, Topo I e Topo II α .

DNA topoisomerases's regulation study during resistance development to etoposide and antitumor role of new compounds in acute leukemias

ABSTRACT

Michelle Xavier Gonçalves Pereira

Acute leukemias represent the largest number of annual deaths from hematologic malignancy. The chemotherapy for these neoplasms involves topoisomerase inhibitors, such as anthracyclines, associated with other drugs. However, some patients do not respond to this treatment scheme because of the development of multiple drug resistance (MDR) phenotype. MDR phenotype is the main cause of refractoriness and treatment failure in acute leukemias. Due to the high rate of cell proliferation, tumors overexpress human DNA topoisomerases I and II α (hTopo I and II α), leading these enzymes as good targets for the development of new anticancer drugs. In this context, the searching for novel compounds capable of increase the overall survival rate in patients with acute leukemias and be effective on cells with MDR phenotype is urgent. The objectives of this research are: *a)* to develop acute leukemia cell lines resistant to etoposide (VP-16); *b)* to characterize the resistance phenotype mediated by changes on hTopo I and II α ; *c)* to evaluate the mechanism of action of new compounds LQBs (LQB-118, -192, -223, -266, -268 and -326) and pomolic acid (PA), as potential inhibitors of hTopo I and/or II α ; and *d)* to investigate the antitumor activity of the most promising compounds on parental or resistant acute leukemia cell lines. It was demonstrated that among the LQBs evaluated only LQB-118 and LQB-223 were effective and specific to hTopo II α and that PA inhibited both hTopo I and II α . They did not intercalate into DNA and acted as catalytic inhibitors with poor affinity to interact with camptothecin or VP-16 binding site. The molecular modeling studies also suggested that LQB-118 and LQB-223 presented a high affinity to bind to ATPase region of hTopo II α . Acute lymphoid CEM-R and myeloid leukemia U937-R cell lines were developed by exposition to increasing concentrations of VP-16. All lineages presented functional BCRP protein and P-glycoprotein (Pgp) expression, however, resistant cell lines showed an overexpression of Pgp. The level of microRNA-143, that targets hTopo II α , was upregulated in both resistant cell lines. Further, low levels of hTopo II α and II β proteins and increased levels of hTopo I were detected in resistant cells, compared to parental cell line. Increased levels of Akt family proteins were also found in resistant cells compared to parental cells, corroborating the profile of increased resistance to chemotherapy present in these cell lines. PA, LQB-118 and LQB-223 treatment reduced cell viability of both resistant and parental lineages, showing that these compounds are effective in overcoming the resistance mechanism. In addition, the treatment with these compounds altered the cell cycle distribution and induced cell death. Moreover, LQB-118 treatment induced a decrease in Akt protein level and this was not associated with apoptosis induction. In conclusion, our results suggest that PA, LQB-118 and LQB-223 have powerful antitumor activity against acute leukemia cells, including cells with MDR phenotype. Their mechanism of action involves human DNA topoisomerases catalytic inhibition, pointing these compounds as powerful antineoplastic agents with potential to improve the treatment scheme of acute leukemias.

Keywords: Acute myeloid leukemia, acute lymphoid leukemia, multidrug resistance, pomolic acid, LQB-118, LQB-223, Akt, human DNA topoisomerases, Topo I and Topo II α .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Etapas da hematopoiese normal e leucêmica a partir da maturação da célula-tronco hematopoiética.....	28
Figura 1.2: Taxa de incidência de leucemia mieloide aguda (LMA) em adultos ajustada pela idade dos pacientes no ano de 2014..	29
Figura 1.3: Taxa de sobrevida global relativa ao tempo e à idade dos pacientes com LMA acompanhados ao longo período de 1988– 2013.....	33
Figura 1.4: Taxa de incidência de leucemia linfóide aguda (LLA) em crianças, adolescentes e adultos ajustada pela idade dos pacientes no ano de 2014.....	34
Figura 1.5: Protocolo de quimioterapia utilizado no tratamento da leucemia linfóide aguda (LLA) no Instituto Nacional de Câncer (INCA).....	36
Figura 1.6: Taxa de sobrevida global relativa ao tempo e à idade dos pacientes com LLA acompanhados ao longo período de 1988– 2013.....	37
Figura 1.7: Estrutura bidimensional das proteínas ABC.....	40
Figura 1.8: Formação de DNA superenovelado positivamente causado pelo deslocamento do maquinário de replicação, transcrição do DNA e remodelagem da cromatina através do DNA imobilizado a regiões da matriz nuclear.	43
Figura 1.9: Estrutura de domínios da Topo I humana complexada ao DNA..	45
Figura 1.10: Relaxamento do DNA superenovelado pela Topo I através de rotação controlada do DNA.....	46
Figura 1.11: Estrutura da Topo II α eucariótica..	47
Figura 1.12: Reação de separação de duas fitas duplas de DNAs pela Topo II α	49
Figura 4.1: Genotipagem das linhagens de leucemias agudas..	62
Figura 4.2: Análise da presença de micoplasma nas linhagens de leucemias agudas.	63
Figura 4.3: Estrutura geral dos novos compostos LQBs.	65

Figura 4.4: Estrutura do composto ácido pomólico	65
Figura 5.1: Efeito citotóxico do ácido pomólico (AP) na viabilidade celular das linhagens de leucemia mieloide aguda (LMA).....	84
Figura 5.2: Efeito do ácido pomólico (AP) na indução de morte celular nas linhagens de leucemia mielóide aguda (LMA)	86
Figura 5.3: Efeito do ácido pomólico (AP) na indução de fragmentação do DNA em células de leucemia mielóide aguda (LMA).....	87
Figura 5.4: Efeito do ácido pomólico (AP) no perfil do ciclo celular das células de leucemia mielóide aguda (LMA).....	88
Figura 5.5: Efeito dos compostos ácido pomólico (AP) e LQBs na inibição do relaxamento do DNA catalisado pelas enzimas hTopo I (A) e hTopo II α (B).	90
Figura 5.6: Análise do potencial de intercalação ao DNA pelos compostos LQB-118, LQB-223 e ácido pomólico (AP)	92
Figura 5.7: Análise do mecanismo de inibição das DNA topoisomerasas pelos compostos LQB-118, LQB-223 e ácido pomólico (AP).	93
Figura 5.8: Estrutura tridimensional da enzima topoisomerase II α completa construída com utilização do programa Modeller.....	95
Figura 5.9: Validação e análise da qualidade da estrutura tridimensional completa de hTopo II α gerada pelo programa Modeller..	96
Figura 5.10: Resultado de <i>docking</i> do modo de ligação do ácido pomólico (AP) às DNA topoisomerasas.	98
Figura 5.11: Estudo computacional da interação entre o composto LQB-118 e as enzimas DNA topoisomerasas.	102
Figura 5.12: Resultados do <i>docking</i> com LQB-118 (A) e LQB-223 (B) ancorados na região ATPase (PDB: 1ZXN) de hTopo II α , mostrando as energias em kcal/mol e os resíduos que interagem com a enzima neste domínio..	103

Figura 5.13: Análise morfológica das células das linhagens de leucemias agudas parentais e resistentes ao etoposídeo (VP-16)..	105
Figura 5.14: Quantidade de células de leucemias agudas vivas ao longo do tempo (24, 48 e 72 h) após a indução de resistência com VP-16..	106
Figura 5.15: Análise citogenética da linhagem de leucemia mielóide aguda U937 realizada por bandeamento G.	108
Figura 5.16: Análise citogenética da linhagem de leucemia mielóide aguda resistente ao etoposídeo, U937-R, realizada por bandeamento G.	109
Figura 5.17: Análise citogenética das linhagens de de leucemia linfóide aguda parental e resistente ao etoposídeo realizada por bandeamento G.	111
Figura 5.18: Viabilidade celular das linhagens CCRF-CEM (A) e U937 (B), avaliada por MTT após o tratamento com diversas concentrações de VP-16 por 24, 48 e 72 h..	113
Figura 5.19: Efeito da exposição a diferentes concentrações de VP-16 durante o período de 24, 48 e 72 h na viabilidade celular das linhagens de (A) leucemia linfóide aguda parental (CCRF-CEM) e resistente (CEM-R) ao VP-16 e (B) leucemia mielóide aguda parental (U937) e resistente (U937-R) ao VP-16..	115
Figura 5.20: Aquisição de resistência ao etoposídeo (VP-16) pelas linhagens de leucemias agudas.	117
Figura 5.21: Efeito da exposição a diferentes concentrações de daunorrubicina, idarrubicina e doxorubicina durante o período de 24 h na viabilidade celular das linhagens de: A) leucemia linfóide aguda parental (CCRF-CEM) e resistente (CEM-R); B) leucemia mielóide aguda parental (U937) e resistente (U937-R).	118
Figura 5.22: Expressão da proteína transportadoras de efluxo Pgp avaliada por citometria de fluxo nas linhagens de LLA (A) e LMA (B).	120
Figura 5.23: Avaliação por citometria de fluxo da atividade das proteínas transportadoras de efluxo Pgp (A) e BCRP (B) na função de extrusão de corantes fluorescentes nas linhagens de leucemia linfóide aguda (LLA) e leucemia mielóide aguda (LMA).	122

Figura 5.24: Análise do conteúdo proteico das DNA topoisomerasas (A) e das proteínas da família Akt (B) nas linhagens de leucemias agudas resistentes comparadas às parentais.	125
Figura 5.25: Níveis de expressão do microRNA-143 (A), microRNA-485-3p (B) e microRNA-23a (C) nas linhagens de leucemias agudas resistentes U937-R e CEM-R em relação às parentais U937 e CCRF-CEM, respectivamente).	127
Figura 5.26: Efeito citotóxico dos compostos LQB-118 (A), LQB-223 (B) e Ácido Pomólico (C) após 24, 48 e 72 h de análise da viabilidade celular por MTT nas linhagens de leucemia linfóide aguda (LLA) parental (CCRF-CEM) e resistente (CEM-R) ao etoposídeo.	131
Figura 5.27: Efeito citotóxico dos compostos LQB-118 (A), LQB-223 (B) e Ácido Pomólico (C) após 24, 48 e 72 h de análise da viabilidade celular por MTT nas linhagens de leucemia mieloide aguda (LMA) parental (U937) e resistente (U937-R) ao etoposídeo.	132
Figura 5.28: Efeito dos LQBs – 118 e – 223 na indução de morte celular nas linhagens resistente e parental de leucemia linfóide aguda (LLA), avaliados no ensaio de marcação de células anexina V ⁺ por citometria de fluxo, após incubação por 48 h.	135
Figura 5.29: Efeito do LQB-118 e do LQB-223 na indução de morte celular nas linhagens resistente e parental de leucemia mieloide aguda (LMA), avaliados no ensaio de marcação de células anexina V ⁺ por citometria de fluxo, após incubação por 24 h.	136
Figura 5.30: Efeito do LQB-118 e do LQB-223 na indução de fragmentação do DNA nas linhagens parentais e resistentes de LLA (A) tratadas por 48 h e LMA (B) tratadas por 24 h com os compostos.	138
Figura 5.31: Histogramas representativos da indução de de fragmentação do DNA causada pelos compostos LQB-118 e LQB-223 nas linhagens de leucemia linfóide aguda (LLA) resistente e parental.	139
Figura 5.32: Histogramas representativos da indução de de fragmentação do DNA causada pelos compostos LQB-118 e LQB-223 nas linhagens de leucemia mieloide aguda (LMA) resistente e parental.	140

Figura 5.33: Avaliação do efeito dos compostos LQB-118 e LQB-223 no perfil do ciclo celular das linhagens de leucemia linfóide aguda (LLA) (A) tratadas por 48 h e leucemia mieloide aguda (LMA) (B), tratadas por 24 h com esses compostos.....	142
Figura 5.34: Histogramas representativos do efeito dos compostos LQB-118 e LQB-223 no perfil do ciclo celular das linhagens de leucemia linfóide aguda (LLA) resistente e parental.	143
Figura 5.35: Histogramas representativos do efeito dos compostos LQB-118 e LQB-223 no perfil do ciclo celular das linhagens de leucemia mieloide aguda (LMA) resistente e parental.....	144
Figura 5.36: Efeito do LQB-118 na modulação dos níveis de Akt após o tratamento com diferentes concentrações (1,5 – 12 μ M) do composto, durante 24 h, nas células resistentes ou parentais de leucemia mieloide aguda (A) ou leucemia linfóide aguda (B)..	145
Figura 5.37: Avaliação do efeito da apoptose na modulação dos níveis da proteína Akt após tratamento com LQB-118 por 24h nas linhagens de leucemias agudas resistentes ou parentais.	146
Figura 5.38: Efeito do LQB-118 na modulação dos níveis de Akt nas células resistentes ou parentais de leucemias agudas durante uma cinética de tempo em até 24 h.	147

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 4.1: Protocolo experimental usado na identificação de inibidores de topoisomerasas	76
Esquema 4.2: Protocolo experimental usado para diferenciar inibidores de topoisomerasas de intercaladores de DNA.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Primeira classificação da leucemia mieloide aguda convencionada pelo grupo Franco-Americano-Britânico (FAB)	30
Tabela 1.2: Classificação da leucemia mieloide aguda (LMA) mais atualizada estipulada pela Organização Mundial de Saúde (OMS).....	30
Tabela 1.3: Subgrupos citogenéticos e moleculares genéticos de importância prognóstica na LMA	32
Tabela 1.4: Principais marcadores dos diferentes tipos de leucemia linfóide aguda (LLA)	35
Tabela 5.1: Resultados do <i>docking</i> das topoisomerasas com os compostos LQB-118 e LQB-223 ancorados na região do sítio de EVP e do <i>docking</i> cego feito sobre os modelos 3QX3 do PDB (hTopo II β) e M59 (hTopo II α), construído através do Modeller.	99
Tabela 5.2: Cálculo dos valores de IC ₅₀ das linhagens CCRF-CEM, CEM-R, U937 e U937-R em resposta ao tratamento com LQB-118 e LQB-223 por 24 h, 48 h e 72 h..	133

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ADP	Adenosina difosfato
AP	Ácido pomólico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BCRP	<i>Breast cancer resistance protein</i>
Br.Etd	Brometo de etídio
BSA	Albumina do soro bovino
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CIA	Clorofórmio-álcool isoamílico
CPT	Camptotecina
CPT-11	Irinotecano
CSA	Ciclosporina A
CTRL	Controle (sem tratamento)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DOPE	<i>Discrete Optimized Protein Energy</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EVP	ligante etoposídeo usado nos ensaios de docking
FAB	grupo Franco-Americano-Britânico
FC	<i>Fold Change</i>
FDA	<i>Food and Administration Agency</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FS	Fosfatidilserina
FTC	<i>Fumitremorgin C</i>
hTopo I	Topoisomerase I humana
hTopo II α	Topoisomerase II humana

hTopo II β	Topoisomerase II β humana
IC50	Concentração de um fármaco que inibe metade da resposta máxima
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPPN	Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais
ISCN	Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana
LDD	Laboratório de Diagnósticos por DNA
LHOCM	Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LQB	Laboratório de Química Bio-orgânica
m-AMSA	m-Amsacrina
MDR	<i>Multidrug Resistance</i>
MP	Membrana plasmática
MRP1	<i>Multi-drug Resistance Protein 1</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetilazolil-2)-2,5-difeniltetrazolium
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
OC ou Nicked	DNA circular aberto (<i>open circular DNA</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pgp	Glicoproteína-P
PhA	<i>Pheophorbide A</i>
Pi	Fosfato inorgânico
PI	Iodeto de propídeo
PKB	Proteína quinase B
Rel	DNA relaxado
RIF	Razão das médias de intensidade de fluorescência
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
Rn	Topoisômeros relaxados

RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNA _{se}	Ribonuclease A
Rho-123	Rodamina-123
ROS	Espécies reativas a oxigênio
SAVES	<i>the Structure Analysis and Verification Server</i>
SC	DNA plasmidial superenovelado (supercoiled)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>SDS-poliacrylamide gel electrophoresis</i>
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>
SFB	Soro fetal bovino
STR	Repetição curta em tandem
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBS	Salina tamponada com Tris
TBST	TBS com Tween-20
Topo I	Topoisomerase I
Topo II α	Topoisomerase II α
Topo II β	Topoisomerase II β
TTC	ligante topotecano usado nos ensaios de docking
UDG	Uracil-DNA-glicosilase
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UV	Ultravioleta
VP-16	Etoposídeo
VRP	Verapamil

SUMÁRIO

Agradecimentos	ii
Resumo	ii
Abstract.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE ESQUEMAS	XVII
LISTA DE TABELAS.....	XVIII
1. INTRODUÇÃO	27
1.1 Leucemia.....	27
1.2 Leucemias Agudas.....	28
1.1.1 Leucemia mieloide aguda	29
1.1.2 Leucemia linfoide aguda	34
1.3 Resistência a Múltiplas Drogas.....	38
1.3.1 Proteínas transportadoras ABC	40
1.3.2 DNA Topoisomerases.....	42
1.3.3 Família serina-treonina quinase Akt.....	49
1.3.4 microRNAs na resistência tumoral.....	50
1.4 Inibidores de topoisomerases no tratamento antitumoral	52
1.5 Compostos com atividade antitumoral	55
2. JUSTIFICATIVA	59
3. OBJETIVOS	59
3.1 Objetivo Geral:.....	59

3.2	Objetivos Específicos:	59
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
4.1	Cultura celular	60
4.2	Análise do perfil de STR das linhagens de leucemias agudas.....	61
4.3	Avaliação da presença de micoplasma nas linhagens celulares.....	63
4.4	Análise citogenética das linhagens de leucemias agudas	64
4.5	Agentes citotóxicos e compostos avaliados	64
4.6	Ensaio de viabilidade celular.....	65
4.7	Avaliação da proliferação celular através de exclusão por azul de tripan	67
4.8	Extração de RNA, miRNA e síntese de cDNA	67
4.9	Avaliação da expressão de microRNAs	68
4.10	Extração e eletroforese de proteínas.....	69
4.11	Avaliação da expressão proteica por <i>Western Blot</i>	70
4.12	Deteção do perfil de expressão das proteínas transportadoras de efluxo.....	71
4.13	Avaliação da atividade das proteínas transportadoras de efluxo.....	71
4.14	Análise do ciclo celular e fragmentação do DNA	72
4.15	Ensaio de morte celular	73
4.16	Estudos de Inibição das enzimas hTopo I e hTopo II α	74
4.17	Caracterização do mecanismo molecular de inibição das topoisomerases	77
4.17.1	Avaliação do potencial de intercalação dos compostos.....	77

4.17.2	Caracterização do tipo de inibição – <i>poison</i> ou catalítica	78
4.18	Análises por biologia computacional da interação dos novos compostos (LQBs e AP) com as enzimas hTopo I e hTopo IIα	79
4.18.1	<i>Docking</i> Molecular	79
4.19	Análises Estatísticas.....	81
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
	<i>Parte I: Análise da atividade antitumoral dos novos compostos e avaliação bioquímica e por biologia computacional da interação desses com as enzimas hTopo I e hTopo IIα.....</i>	82
5.1	Atividade biológica antitumoral dos novos compostos	82
5.1.1	Avaliação da viabilidade celular	82
5.1.2	Avaliação da morte celular.....	85
5.1.3	Avaliação do perfil de distribuição de células no ciclo celular.....	88
5.2	Atividade dos compostos ácido pomólico e LQBs sobre as enzimas DNA topoisomerases humana.....	89
5.3	Potencial de intercalação dos compostos AP, LQB-118 e LQB-223 ao DNA.....	91
5.4	Caracterização do tipo de inibição provocada pelos compostos AP, LQB-118 e LQB-223 sobre as enzimas DNA topoisomerases humana	92
5.5	Construção e validação de um modelo computacional em 3D da hTopo IIα	94
5.6	<i>Docking</i> Molecular.....	97

<i>Parte II: Desenvolvimento e caracterização das linhagens de leucemias agudas resistentes ao etoposídeo.....</i>	104
5.7 Efeito da indução de resistência ao etoposídeo.....	104
5.8 Análise do padrão cromossômico após indução de resistência com etoposídeo	107
5.9 Viabilidade celular das linhagens de leucemias agudas parentais e resistentes ao etoposídeo	112
5.10 Potência de resistência ao etoposídeo	116
5.11 Viabilidade celular das linhagens parentais e resistentes a outros quimioterápicos usados no tratamento das leucemias agudas.....	117
5.12 Expressão e função das proteínas transportadoras de efluxo	119
5.13 Perfil de expressão das proteínas topoisomerases e da família Akt	124
5.14 Perfil de expressão dos microRNAs miR-23a, miR-143 e miR-485-3p nas linhagens de leucemias agudas parentais e resistentes ao etoposídeo	126
<i>Parte III: Efeito antineoplásico (incluindo anti-MDR) dos novos compostos nas linhagens resistentes</i>	129
5.15 Atividade citotóxica dos compostos LQB-118, LQB-223 e Ácido Pomólico nas linhagens de leucemias agudas resistentes <i>versus</i> parentais	129
5.16 Potencial dos compostos LQB-118 e do LQB-223 na inibição das linhagens de leucemias agudas resistentes <i>versus</i> parentais.....	133
5.17 Efeito dos compostos LQB-118 e LQB-223 na indução de morte celular nas linhagens de leucemias agudas resistentes <i>versus</i> parentais .	134

5.18 Efeito dos compostos LQB-118 e LQB-223 no ciclo celular das linhagens de leucemias agudas resistentes <i>versus</i> parentais.....	141
5.19 Efeito do composto LQB-118 na modulação de Akt nas linhagens de leucemias agudas resistentes <i>versus</i> parentais	145
6. CONCLUSÕES	149
7. CONCLUSÃO GERAL	150
8. PERSPECTIVAS	150
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
10.ANEXOS.....	172
10.1 Artigos submetidos à publicação	172
10.2 Artigos em preparo para submissão	176

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia

A leucemia é uma neoplasia maligna que se origina na medula óssea e compromete o sistema hematopoiético. Na população essa neoplasia acomete tanto homens quanto mulheres, adultos e crianças. Dados da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) mostram que em 2012 a estimativa mundial de incidência de leucemia foi de 352 mil novos casos, dos quais foi estimada uma mortalidade de 265 mil pacientes (75,3%) no mundo em decorrência desse tipo de câncer.

A alta taxa de mortalidade reflete um pior prognóstico, principalmente em países em desenvolvimento. No Brasil, a estimativa do Instituto Nacional de Câncer (INCA) para o ano de 2016 foi de 10.070 novos casos de leucemia, dentre esses 55% acometeriam homens e 45% mulheres. Os dados do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde mostram que em 2015 ocorreram 6.837 óbitos em decorrência de leucemia, o equivalente a aproximadamente 68% dos pacientes acometidos por essa neoplasia no país.

Em adultos, as maiores taxas de sobrevida global relativas a um período de cinco anos (cerca de 60%) são observadas em populações com maiores níveis socioeconômico, como nos países da América do Norte, Oeste da Ásia, Europa e Oceania. Segundo o INCA, no Brasil, essa taxa de sobrevida relativa ao período de 2000 a 2005 foi de 20% em adultos e 70% em crianças com leucemia. No entanto, países como a Áustria, Bélgica, Canadá, Alemanha e Noruega apresentam uma taxa de sobrevida maior do que 90% para as leucemias infantis.

Devido a sua complexidade a leucemia é subdividida em diferentes neoplasias hematológicas, podendo ser classificada como: leucemia crônica, cuja progressão é lenta com aumento de células sanguíneas maduras anormais; leucemia aguda, com acúmulo rápido de células imaturas do sangue; e ainda linfóide ou mieloide de acordo com o tipo celular acometido.

1.2 Leucemias Agudas

As leucemias agudas compõem um grupo de neoplasias que têm em comum o rápido crescimento de células hematopoiéticas imaturas na medula óssea, suprimindo a maturação das células sanguíneas saudáveis por esse órgão. Como consequência, a doença se agrava em um pequeno intervalo de tempo (LARSON, 2010). Estas células são oriundas de uma única célula tronco multipotente ancestral que sofreu mutações gênicas e alterações cromossômicas levando à perda da capacidade de diferenciação e a proliferação celular aberrante (SMITH, HILLS, GRIMWADE, 2011). Estas alterações cromossômicas, incluem translocações, inversões e deleções que podem levar à expressão de proteínas oncogênicas, perdas de genes supressores tumorais, além de alterações na expressão de diversas moléculas que participam do controle da apoptose e proliferação celular (ODENIKE *et al.*, 2011).

De acordo com a origem da célula hematopoiética progenitora, essas neoplasias hematológicas podem ser divididas em dois grupos. Quando as alterações citogenéticas e/ou moleculares ocorrem em células no estágio inicial do desenvolvimento, como as células tronco mieloide ou blasto mieloide, há o desenvolvimento da leucemia mieloide aguda (LMA), afetando a maturação destes em células monocíticas ou granulocíticas. Quando essas alterações ocorrem em blasto linfoide há o surgimento da leucemia linfoide aguda (LLA), comprometendo a maturação das células linfocíticas B ou T (Figura 1.1) (VARDIMAN *et al.*, 2009).

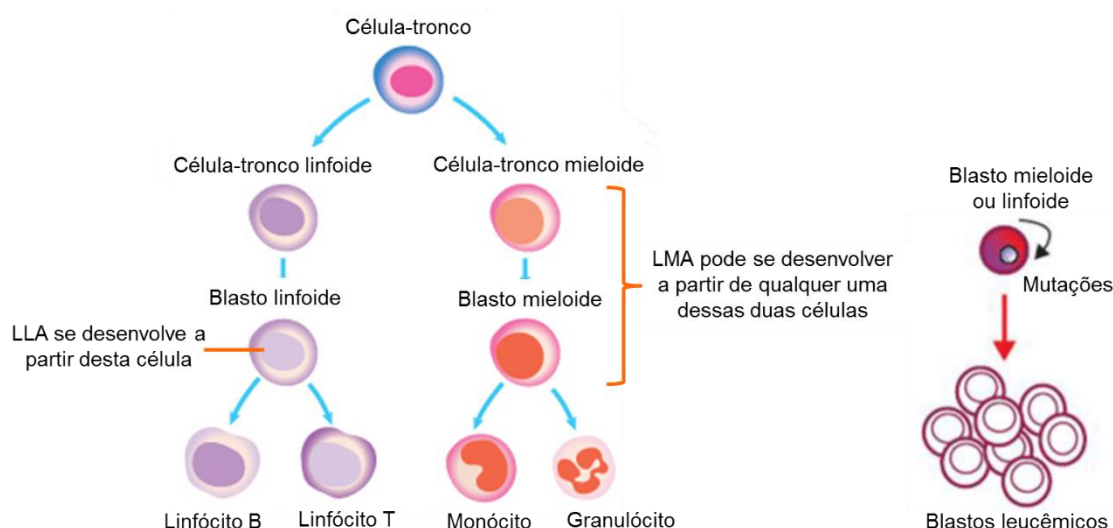


Figura 1.1: Etapas da hematopoiese normal e leucêmica a partir da maturação da célula-tronco hematopoiética (adaptado de: *Cancer Research UK website*).

As leucemias agudas também são estratificadas na sua prevalência na população, acometendo diferentes faixas etárias. A LMA representa cerca de 80% das

leucemias agudas do adulto e cerca de 20% das leucemias agudas na infância. Enquanto que o contrário é observado na LLA, que apesar de também acometer adultos é mais comum em crianças, sendo a leucemia infantil mais prevalente na população (INCA, 2001; INCA, 2002a,b).

1.1.1 Leucemia mieloide aguda

Entre as neoplasias hematológicas, a LMA configura o maior número de casos (cerca de 34% de todas as leucemias) e a maior taxa de morte a cada ano (aproximadamente 50% dos pacientes) (SIEGEL, MILLER, JEMAL, 2017). Embora ocorra em qualquer faixa etária, a incidência de LMA aumenta com a idade, ocorrendo geralmente em pessoas mais velhas, sendo incomum antes dos 45 anos de idade. A idade média de um paciente com LMA é de cerca de 67 anos (Figura 1.3).



Adaptado de: <https://seer.cancer.gov/faststats/selections.php?#Output>

Figura 1.2: Taxa de incidência de leucemia mieloide aguda (LMA) em adultos ajustada pela idade dos pacientes no ano de 2014. Fonte: programa SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, US National Cancer Institute*).

A LMA é uma doença complexa que leva a manifestações clínicas agressivas (KUMAR, 2011). Os blastos leucêmicos podem emergir a partir de diversos estágios de diferenciação dos precursores mieloides, o que implica em uma malignidade amplamente heterogênea. Devido a isso, a LMA é classificada em diversos subtipos, estabelecidos a partir de características citoquímicas e morfológicas (HARRIS *et al*, 1997; GILLILAND, 2001).

A classificação da LMA foi estipulada inicialmente pelo grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) em 1976 com base na avaliação morfológica de esfregaços de sangue e de medula óssea, além de alguns procedimentos citoquímicos. Este sistema distinguiu a LMA e a LLA como distúrbios diferentes (BENNETT *et al.*, 1976), além de estratificar a LMA em oito sub-grupos distintos (HAYHOE, 1988) (Tabela 1.1). Esse sistema foi e ainda é amplamente utilizado devido à facilidade de comparação dos resultados entre instituições.

Tabela 1.1: Primeira classificação da leucemia mieloide aguda convencionalizada pelo grupo Franco-Americano-Britânico (FAB)

M0: Leucemia mieloblástica aguda indiferenciada
M1: Leucemia mieloblástica aguda sem maturação
M2: Leucemia mieloblástica aguda com maturação
M3: Leucemia promielocítica aguda ou promielocítica
M4: Leucemia mielomonocítica aguda
M5: Leucemia monoblástica aguda (5a) ou Leucemia monocítica aguda (5b)
M6: Leucemia eritróide aguda ou Eritroleucemia
M7: Leucemia megacarioblástica aguda

Posteriormente, em 2008, a Organização Mundial de Saúde (OMS) fez uma atualização do sistema FAB a fim de englobar análises da imunofenotipagem, etiologia, citogenética e morfologia em uma mesma avaliação (SWERDLOW *et al.*, 2008) (Tabela 1.2).

Tabela 1.2: Classificação da leucemia mieloide aguda (LMA) mais atualizada estipulada pela Organização Mundial de Saúde (OMS)

LMA com anormalidades genéticas recorrentes
LMA com t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
LMA com inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
LPMA com t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i>
LMA com t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>
LMA com t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
LMA com inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i>
LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i>
Entidade temporária: LMA com <i>NPM1</i> mutante
Entidade temporária: LMA com <i>CEBPA</i> mutante
LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia
Neoplasias mieloides relacionadas à terapia*
LMA, SOE
LMA com diferenciação mínima
LMA sem maturação
LMA com maturação
Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia monocítica/monoblástica aguda
Leucemia eritroide aguda
Leucemia eritroide pura
Eritroleucemia, eritroide/mieloide
Leucemia megacarioblástica aguda
Leucemia basofílica aguda
Panmielose aguda com mielofibrose (mielofibrose aguda, mielosclerose aguda)
Sarcoma mieloide (tumor mieloide extramedular, sarcoma granulocítico, cloroma)
Proliferações mieloides relacionadas à síndrome de Down
Mielopoiese anormal transiente (distúrbio mieloproliferativo transiente)
Leucemia mieloide associada à síndrome de Down
Neoplasia de célula dendrítica plasmacitoide blástica
Leucemias agudas de linhagem ambígua
Leucemia indiferenciada aguda
Leucemia aguda de fenótipo misto com t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
Leucemia aguda de fenótipo misto com t(v;11q23); rearranjo de <i>MLL</i>
Leucemia aguda de fenótipo misto, B/mieloide, SOE
Leucemia aguda de fenótipo misto, T/mieloide, SOE
Entidade temporária: leucemia linfoblástica de célula natural killer/linfoma

*A neoplasia mieloide relacionada à terapia inclui o espectro de qualquer síndrome mielodisplásica ou leucemia mieloide aguda que ocorra subsequentemente à terapia citotóxica para distúrbio não mieloide. (Figura de LARSON, 2010).

O padrão citogenético permanece sendo a característica mais importante para o prognóstico de pacientes com LMA desde a década de oitenta (SMITH; HILLS; GRIMWADE, 2011; SHAH, BAROCHIA, LOUGHRAN, 2013). Com base na ocorrência de anormalidades cromossômicas, os pacientes são estratificados nas seguintes

categorias: prognóstico favorável (baixo risco), intermediário (que pode ser subdividido em I e II e agrupa os pacientes de risco intermediário) e desfavorável ou adverso (alto risco) (DÖHNER *et al.*, 2010) (Tabela 1.3).

Tabela 1.3: Subgrupos citogenéticos e moleculares genéticos de importância prognóstica na LMA

Resultado clínico	Subgrupos genéticos
Favorável	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutante sem <i>FLT3-ITD</i> (cariótipo normal) <i>CEBPA</i> mutante (cariótipo normal)
Intermediário-I	<i>NPM1</i> mutante e <i>FLT3-ITD</i> (cariótipo normal) <i>NPM1</i> selvagem e <i>FLT3-ITD</i> (cariótipo normal) <i>NPM1</i> selvagem sem <i>FLT3-ITD</i> (cariótipo normal)
Intermediário-II	t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-MLL</i> Anormalidades citogenéticas não classificadas como favoráveis nem adversas
Adverso	inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); rearranjo de <i>MLL</i> -5 ou del(5q); -7; (17p) anormal; cariótipo complexo*

*O cariótipo complexo é definido pela ocorrência de 3 ou mais anormalidades cromossômicas na ausência de uma das translocações ou inversões recorrentes designadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), ou seja, t(15;17), t(8;21), inv(16) ou t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23), t(6;9), inv(3)/t(3;3). (Figura de LARSON, 2010).

Além das anormalidades cromossômicas, a evolução clonal difere de cada tumor como consequência à instabilidade genômica (GERLINGER *et al.*, 2012) e isso é uma das razões para as diferentes respostas dos pacientes ao mesmo regime de tratamento (MARCUCCI, HAFERLACH, DOHNER, 2011).

Apesar de muitos esforços, a LMA apresenta a menor taxa de sobrevivência dentre todos os tipos de leucemias. O tratamento dessa neoplasia tem sido basicamente o mesmo há décadas, isto é, associação de antraciclinas (idarrubicina ou daunorrubicina) com citarabina, um nucleosídeo análogo da pirimidina que inibe a síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA) (O'DONNELL *et al.*, 2012). Embora este tratamento seja a melhor opção para os pacientes, a taxa de sobrevida global em 5 anos para adultos com cerca de 50 anos de idade é de 26 %, e em torno de 10 % para pacientes com 65 anos ou mais (HOWLADER *et al.*, 2017 BURNETT, 2012; BURNETT, WETZLER, LOWENBERG, 2011) (Figura 1.3).

Taxa de sobrevivida por tempo e por idade (LMA: 1988 – 2013)

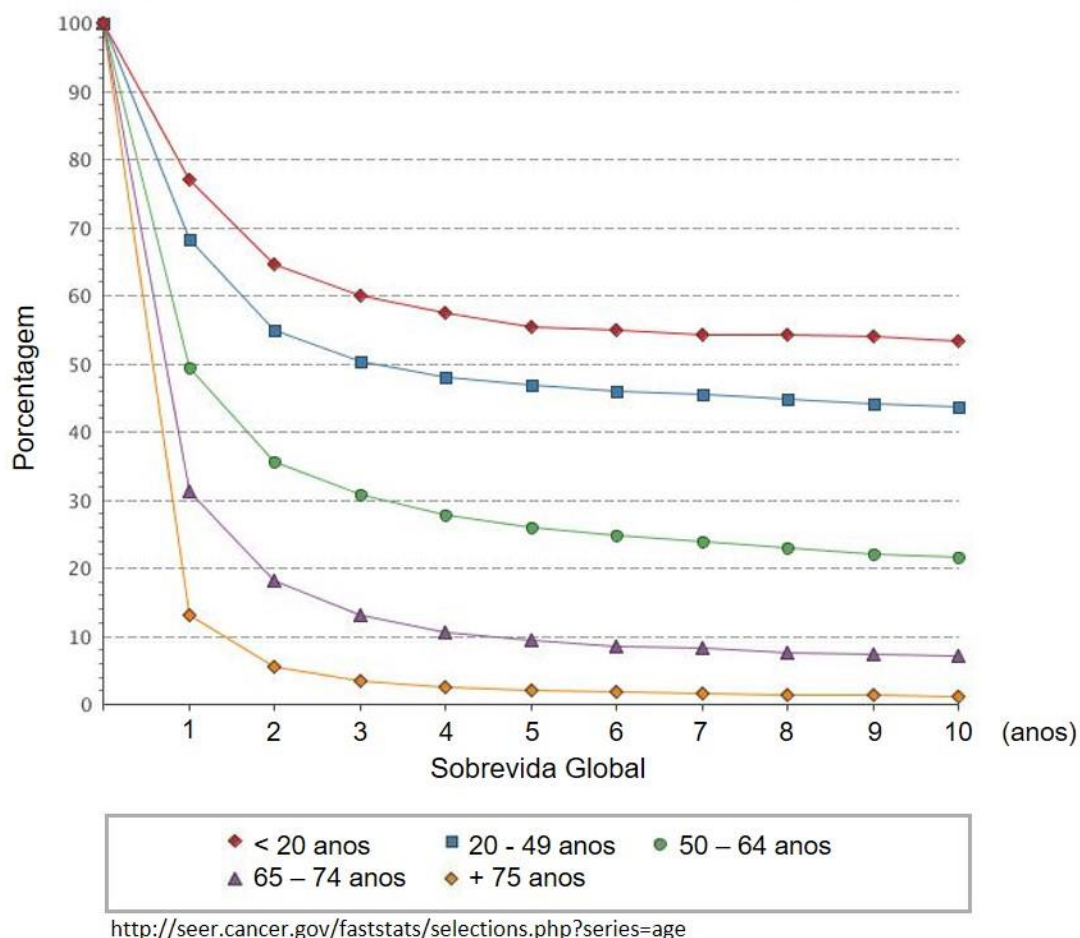


Figura 1.3: Taxa de sobrevivida global relativa ao tempo e à idade dos pacientes com LMA acompanhados ao longo do período de 1988– 2013. Fonte: programa SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, US National Cancer Institute*).

Inicialmente, a taxa de resposta completa é alcançada em cerca de 60 – 70 % dos pacientes. No entanto, após 3 a 5 anos do diagnóstico da LMA, a maioria dos pacientes apresenta recaída da doença (SMITH; HILLS; GRIMWADE, 2011), e como consequência, muitos deles morrem devido à LMA refratária a quimioterapia (FERRARA, 2011). A pior resposta clínica é devido às diferentes propriedades apresentadas pelos pacientes, como idade, alterações citogenéticas e moleculares (SMITH, HILLS, GRIMWADE, 2011; MARIN *et al.*, 2012).

Uma vez que o tratamento para pacientes com LMA não evoluiu, não houve mudanças significativas relacionadas à superação da quimioresistência (REBUCCI & MICHIELS, 2013) ou ao aumento da taxa de resposta completa (ROBAK & WIERZBOWSKA, 2009) e apenas cerca de 25% dos pacientes podem ser curados com a quimioterapia utilizada no tratamento (INCA, 2002).

1.1.2 Leucemia linfoide aguda

A LLA compreende um grupo de neoplasias hematológicas que surgem da transformação maligna na célula linfoide B (LLA-B) ou na célula linfoide T (LLA-T) da linhagem progenitora. A LLA é a neoplasia maligna mais comum na infância, sendo responsável por quase 30% dos tumores pediátricos (NIGRO, 2013), afeta principalmente crianças na faixa etária entre 2 e 10 anos e representa 85 – 90 % dos casos de leucemias em crianças (SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2012; INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013). O risco para o desenvolvimento de LLA é mais elevado em crianças com menos de 5 anos de idade, diminuindo até cerca de 20 anos e aumentando lentamente em indivíduos a partir de 50 anos (Figura 1.4).



Adaptado de: <https://seer.cancer.gov/faststats/selections.php?#Output>

Figura 1.4: Taxa de incidência de leucemia linfoide aguda (LLA) em crianças, adolescentes e adultos ajustada pela idade dos pacientes no ano de 2014. Fonte: programa SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, US National Cancer Institute*).

A classificação da LLA estipulada pelo grupo FAB com base na morfologia não é utilizada para esta leucemia, pois não possui correlação com a relevância clínica. O sistema atual de classificação baseado na morfologia, imunologia, análise citogenética

e de biologia molecular foi introduzido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), enquanto que a imunofenotipagem com base na superfície celular e nas proteínas citoplasmáticas é mais amplamente aplicado. De acordo com a imunofenotipagem, a LLA pode ser classificada em dois tipos, LLA-T e LLA-B, sendo que a LLA-B inclui principalmente três subtipos: pré-células B precoces, pré-células B e células B maduras. Os principais marcadores dos tipos de LLA estão listados na Tabela 1.4 (RANDOLPH, 2004; LARSON, 2010).

Tabela 1.4: Principais marcadores dos diferentes tipos de leucemia linfóide aguda (LLA)

Marcadores dos diferentes tipos de LLA	LLA-T	LLA-B: pré-células B precoces	LLA-B: pré-células B	LLA-B: células B maduras
Ig de superfície(slg)+				x
Desoxinucleotidil-transferase (Tdt)	x	x	x	
CD2+	x			
CD3+	x			
CD4+	x			
CD5+	x			
CD7+	x			
CD8+	x			
CD10+/-		x	CD10+	x
CD19+		x	x	x
CD20+			x	x
D34+		x		
HLA-DR+		x	x	x

Os esquemas terapêuticos atualmente disponíveis resultam de avanços consideráveis nas últimas décadas estão responsáveis pelo melhor prognóstico da LLA. Diferente da LMA, cujo esquema terapêutico é baseado principalmente na administração de idarrubicina combinada à citarabina em diferentes concentrações e intervalos de tempo, a quimioterapia da LLA envolve a combinação de mais de dez fármacos diferentes devido sua ampla heterogeneidade clínica e prognóstica. O tratamento da LLA costuma ser prolongado e os quimioterápicos são administrados ao longo de cinco fases: 1) indução da remissão, 2) intensificação-consolidação, 3) reindução, 4) prevenção da leucemia no sistema nervoso central e 5) manutenção da remissão (NERSTING; BORST; SCHIMIEGELow, 2011; INCA, 2002) (Figura 1.5).

Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda (LLA)

<i>Indução</i>		<i>Reindução</i>	
FASE 1:	FASE 2:	FASE 1:	FASE 2:
Prednisona	Ciclofosfamida	Dexametasona	Ciclofosfamida
Vincristina	Citarabina	Vincristina	Citarabina
Daurorubicina	6-Mercaptopurina	Idarubicina	6-Tioguanina
L-asparaginase	Metotrexato	Metotrexato	
Metotrexato			
<i>Consolidação</i>		<i>Consolidação pós indução (2 ciclos):</i>	
Metotrexato	> 50 anos e/ou LLA-T:	Teniposido	
Ácido folínico	Teniposido	Citarabina	
L-asparaginase	Citarabina	Metotrexato	
	Metotrexato		
MANUTENÇÃO			
6-Mercaptopurina			
Metotrexato			

CONDUTAS DO INCA/MS - Revista Brasileira de Cancerologia, 2002.

Figura 1.5: Protocolo de quimioterapia utilizado no tratamento da leucemia linfóide aguda (LLA) no Instituto Nacional de Câncer (INCA).

A taxa de sobrevivência em 5 anos para crianças com LLA é atualmente superior a 85% (NIGRO, 2013). No entanto, aproximadamente 15% - 20% dos pacientes com LLA apresentam recaída e prognóstico desfavorável, uma vez que não há esquemas de resgate eficazes, limitando significativamente a sobrevida dos mesmos (NGUYEN *et al.*, 2008).

Em contraste com as altas taxas de sobrevida dos pacientes com LLA pediátricos, as taxas de sobrevida em 5 anos para adolescentes (entre 15 - 19 anos) e adultos jovens (entre 20 - 29 anos) são cerca de 60 % e 40 %, respectivamente, de acordo com o banco de dados SEER do Programa do Instituto Nacional de Câncer dos EUA (período entre 1988 - 2013) (PULTE; GONDOS; BRENNER, 2009). Essas taxas tornam-se ainda piores em pacientes de LLA com mais de 50 anos, que apresentam sobrevida em 5 anos de apenas 25 % (HOWLADER *et al.*, 2017) (Figura 1.3). Em pacientes adultos com recidiva e LLA refratária, a taxa de sobrevida global em 5 anos é inferior a 10% (FIELDING *et al.*, 2007; ORIOL *et al.*, 2010).

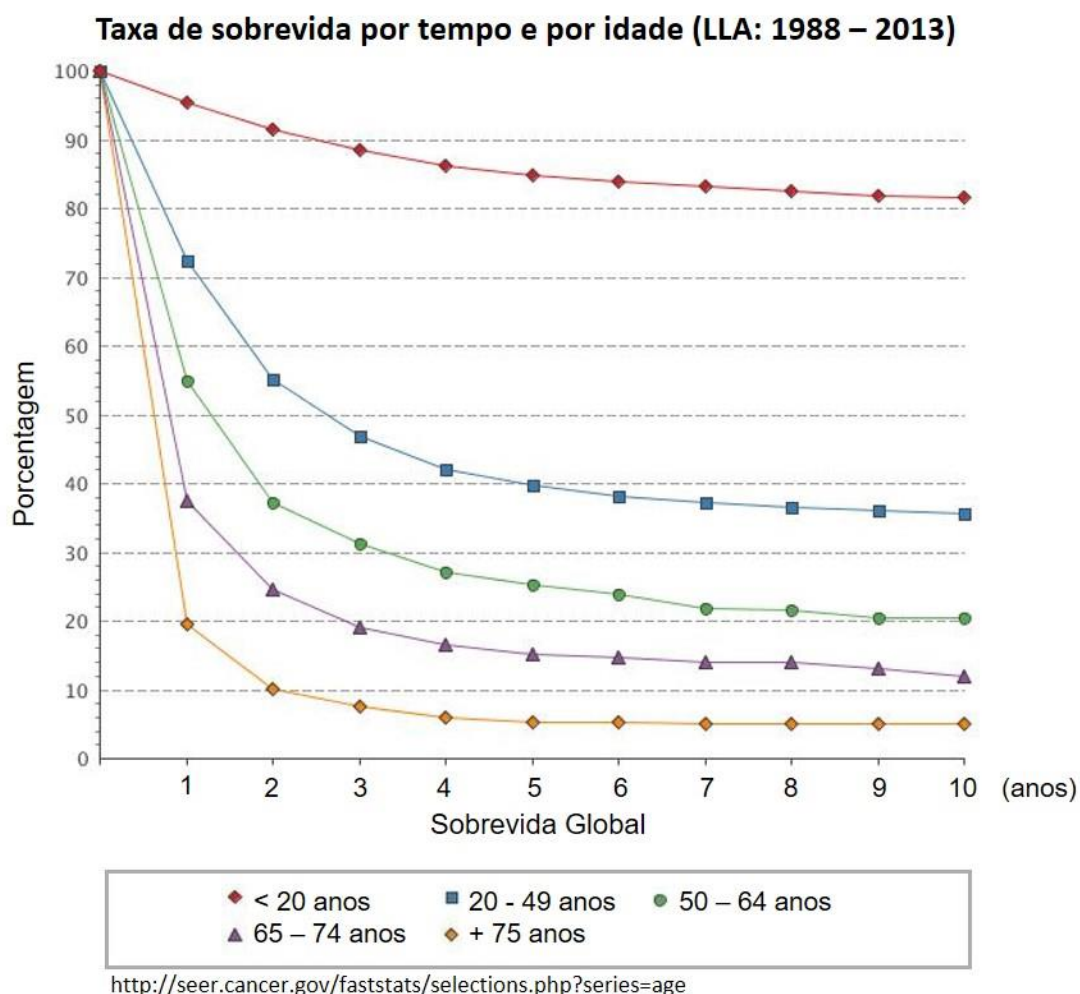


Figura 1.6: Taxa de sobrevivida global relativa ao tempo e à idade dos pacientes com LLA acompanhados ao longo do período de 1988– 2013. Fonte: programa SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, US National Cancer Institute*).

Embora a maioria dos casos de LLA ocorra em crianças, a maioria das mortes por LLA (cerca de 4 em 5) ocorre em adultos. A doença apresenta pior prognóstico clínico em adultos, com uma taxa de cura de apenas 30 - 40% que é muito inferior ao percentual de cura de crianças portadoras de LLA que corresponde a mais de 80% (BASSAN; HOELZER, 2011). As crianças respondem melhor ao tratamento devido às diferenças no esquema terapêutico, já que as crianças geralmente toleram melhor um tratamento agressivo do que os adultos. Além disso, existem diferenças biológicas na doença na infância e nos adultos que desfavorecem o tratamento destes últimos. Um desses complicadores, por exemplo, é a expressão aumentada de mecanismos de resistência a múltiplas drogas (MDR) em pacientes adultos, quando comparados às crianças (INCA, 2002; BASSAN; HOELZER, 2011). Portanto, há necessidade de

melhorar as estratégias terapêuticas para pessoas com idades mais avançadas, e para os pacientes que apresentam recidiva da doença. Logo, o desenvolvimento de fármacos mais específicos e que possam ultrapassar os mecanismos MDR é necessário, visando melhorar a sobrevida dos pacientes.

1.3 Resistência a Múltiplas Drogas

O fenômeno MDR é caracterizado pela resistência das células tumorais à quimioterapia. Essa resistência pode ser intrínseca às células tumorais, devido a maior expressão de moléculas relacionadas à resistência, ou adquirida após a pressão seletiva durante a exposição contínua das células aos fármacos, tornando-as resistentes não só ao fármaco exposto, mas também a outros fármacos com estruturas e/ou mecanismos de ação diferentes (MAIA; RUMJANEK, 2009).

Os mecanismos MDR configuram enormes obstáculos à terapia antitumoral e a principal causa de falha no tratamento das leucemias agudas, uma vez que até o momento nenhum tratamento é capaz de reverter de forma eficaz esse fenótipo. Mecanismos MDR foram avaliados em análises multivariadas como o fator prognóstico, independente, central na falência terapêutica em LMA (SHAFFER *et al.*, 2012).

O desenvolvimento do fenótipo MDR está frequentemente associado à superexpressão de proteínas transportadoras de xenobióticos, também conhecidas como bombas de efluxo, cujos membros pertencem à superfamília ABC (*ATP Binding Cassette*). Essas proteínas são transmembranares e extruem diversas moléculas para o meio extracelular, incluindo fármacos e metabólitos celulares, de maneira ativa, com gasto de ATP, ocorrendo mesmo contra um gradiente de concentração e, conseqüentemente, reduzindo o acúmulo intracelular destas moléculas, como por exemplo, de um fármaco. Dentre os membros da superfamília ABC três se destacam no cenário clínico por apresentarem papel relevante no transporte de fármacos: a glicoproteína-P (ABCB1/MDR1/Pgp), a proteína associada a resistência a múltiplas drogas (ABCC1/MRP-1) e a proteína de resistência ao câncer de mama (ABCG2/BCRP) (EL-AWADY *et al.*, 2016).

Além das proteínas transportadoras, algumas células tumorais com fenótipo MDR não apresentam a superexpressão dessas bombas de efluxo e são então chamadas de células com fenótipo MDR atípico (YOKOMIZO *et al.*, 1994; NAITO *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2010). A aquisição desse fenótipo MDR atípico está

parcialmente associada a alterações nas enzimas DNA topoisomerasas, envolvendo mecanismos de resistência cruzada a diversos fármacos que inibem essas enzimas (OKADA *et al.*, 2001; COSS *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2011). Vias de resistência a fármacos anti-Topo II independentes de proteínas ABC já foram associadas a esse fenótipo MDR. Nesses casos, a Topo II geralmente está negativamente regulada, encontrando-se baixa expressão desse alvo na célula, reduções na sua estabilidade, na atividade catalítica, na eficiência de localização nuclear da enzima ou alterações estruturais, apresentando mutações em algum de seus domínios (HOLOHAN *et al.*, 2013; OKADA *et al.*, 2001; LAGE *et al.*, 2000; VASSETZKY *et al.*, 1995). Já foi relatado que pacientes com LLA não tratados apresentam uma maior taxa de recaída em dois anos quando expressam baixos níveis de Topo II comparados aos pacientes com alta expressão deste alvo. Além disso, em pacientes com LLA em recidiva da doença ou refratários ao tratamento, a taxa de resposta completa é significativamente menor naqueles que apresentam baixa expressão de Topo II do que naqueles com alta expressão deste alvo (XU; LIN; ZHANG, 2006).

O fenótipo MDR é um evento multifatorial que engloba falhas na apoptose, aumento de mecanismos antioxidantes e alterações em proteínas envolvidas com a proliferação e sobrevivência celular (HOLOHAN *et al.*, 2013). Outros processos intracelulares também podem mediar a resistência à quimioterapia. Um importante mediador intracelular de resistência a fármacos é a via de sinalização fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K) / Akt. Essa via intracelular é crucial para muitos processos fisiológicos, promove a sobrevivência celular, mas apresenta-se desregulada em diversos tumores, contribuindo tanto para a patogênese do câncer quanto para a resistência terapêutica (BONGIOVANNI; SACCOMANI; PIOVAN, 2017; MARTELLI *et al.*, 2010); YUAN; CANTLEY, 2008; BRUNET *et al.*, 1999). Os membros proteicos dessa via, em particular a proteína serina/treonina quinase Akt, são frequentemente superexpressos nas leucemias agudas (FRANSECKY; MOCHMANN; BALDUS, 2015; GRANDAGE *et al.*, 2005).

Dessa forma, a inibição desses alvos que contribuem para o desenvolvimento do fenótipo MDR, seja em combinação com a quimioterapia ou como adjuvante após a remissão, pode ser eficaz para melhorar as respostas dos pacientes ao tratamento.

1.3.1 Proteínas transportadoras ABC

As proteínas membros da superfamília ABC são geralmente compostos por quatro domínios centrais. Metade dos domínios são transmembranares, sendo este o sítio de interação com o substrato, permitindo-o atravessar a membrana plasmática. A outra metade dos domínios é de ligação ao nucleotídeo (NBD, *Nucleotide Binding Domain*). Os NBDs são os sítios onde há a ligação e converção de ATP em ADP, gerando a energia necessária para o funcionamento das bombas de efluxo (Figura 1.7) (ZHOU, 2008).

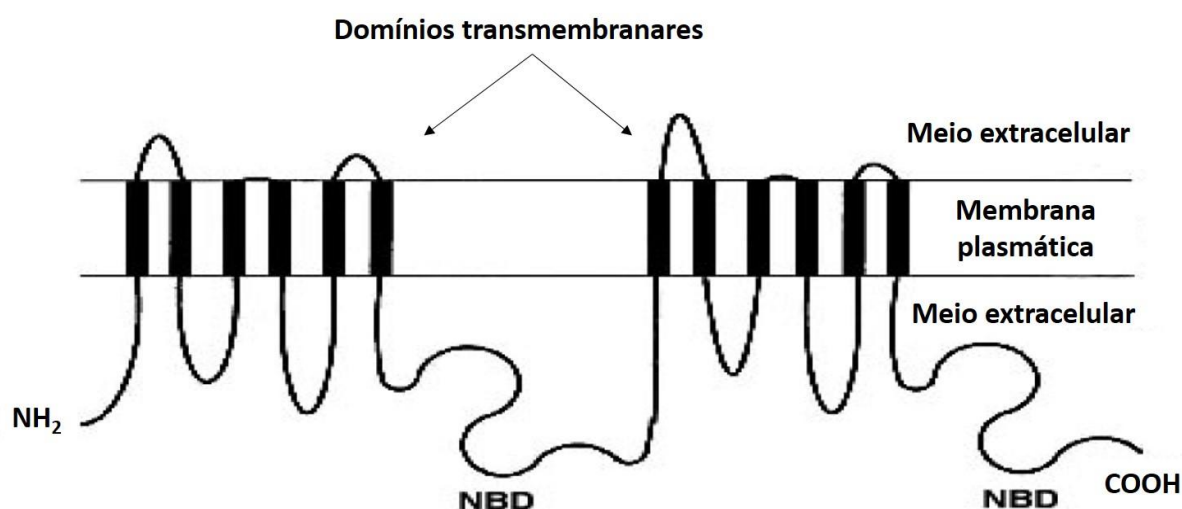


Figura 1.7: Estrutura bidimensional das proteínas ABC com seus domínios transmembranares e seus domínios de ligação de nucleotídeo (NBD), sítios de ligação do ATP (Adaptado de PINTO-SILVA, 2007).

Existem cerca de 50 transportadores ABC em humanos e muitos desses apresentam funções fisiológicas nas células normais atuando inclusive como um mecanismo de defesa contra toxinas e xenobióticos (KUNJACHAN *et al.*, 2013). Entretanto, o efluxo de moléculas realizado por estes transportadores também reduz a disponibilidade e altera a distribuição tecidual de fármacos, sendo importantes alvos para o desenvolvimento de novos compostos (SZAKÁCS *et al.*, 2006; COLE, 2014).

Dentre as proteínas transportadores com papel de transporte de moléculas, a Pgp humana, codificada pelo gene de resistência a múltiplas drogas ABCB1/MDR1, e localizado no cromossomo 7q21.1, possui destaque no cenário clínico (KUNJACHAN *et al.*, 2013). Essa proteína de 170 kDa faz o transporte de diversos quimioterápicos antitumorais utilizados na clínica, tais como: alcalóides da Vinca, antraciclinas, epipodofilotoxinas e taxanos. Dessa forma, pacientes que expressam altos níveis de

Pgp podem exibir alterações na absorção e biodisponibilidade de fármacos e/ou desenvolver um fenótipo MDR, dificultando o sucesso do tratamento antitumoral (ZHOU, 2008; KUNJACHAN *et al.*, 2013). A superexpressão desta proteína é detectada ao diagnóstico em cerca de 30% dos pacientes com LMA, 50% nos pacientes com recaída e aumentando para 70% em pacientes idosos. Pgp é freqüentemente expressa nos blastos de pacientes idosos com LMA, particularmente naqueles com LMA secundária e raramente em crianças com LMA (LEITH *et al.*, 1999; SHAFFER *et al.*, 2012). Pacientes com LMA que expressam o gene ABCB1/MDR1 apresentam significativamente menor resposta à terapia de indução de remissão, com maior incidência de recaída ao tratamento em 5 anos (55% em pacientes com superexpressão de Pgp *versus* 46% em pacientes Pgp negativos) e uma maior taxa de resistência à quimioterapia, 14% para os pacientes Pgp positivos *versus* 5% nos Pgp negativos (SCHAICH, 2004; PALLIS *et al.*, 2011).

Outra proteína transportadora com papel na disposição de moléculas clinicamente relevantes é a BCRP codificada pelo gene ABCG2 e localizada no cromossomo 4q22. Essa proteína de 72 kDa é encontrada em células de câncer gástrico, do cólon, mama, pulmão, além de células blásticas de pacientes com leucemia mieloide aguda e leucemia linfóide aguda (ROSS *et al.*, 2000; KUNJACHAN *et al.*, 2013). A expressão de BCRP é induzida em baixas condições de oxigênio e, portanto, sua alta expressão ocorre em tecidos expostos a ambientes com baixo nível de oxigênio, interagindo com porfirinas como o grupo heme no sangue, em um grande número de neoplasias hematológicas, além de tumores sólidos (MAO; UNADKAT, 2015; KRISHNAMURTHY; SCHUETZ, 2005). A superexpressão dessa proteína está associada a altos níveis de resistência a diversos agentes antitumorais, incluindo antraciclinas, mitoxantrona, topotecano e camptotecina, uma vez que aumenta o efluxo dessas moléculas (MAO; UNADKAT, 2015). Além disso, BCRP também é expressa em células-tronco leucêmicas, contribuindo para a resistência à erradicação da leucemia pelos agentes quimioterápicos (NATARAJAN *et al.*, 2012).

Vários estudos demonstraram uma correlação positiva entre níveis elevados de BCRP e um pior prognóstico em LMA, como por exemplo, ocorrência de doença recidiva ou refratária, baixa taxa de resposta ao tratamento, menor sobrevivência global e/ou ausência de remissão completa (ROSS; NAKANISHI, 2010; NATARAJAN *et al.*, 2012). Em crianças com LMA recém-diagnosticada a análise da expressão gênica de BCRP revelou que a mediana da expressão deste gene estava aumentada, em mais de 10 vezes, em pacientes que não atingiram a remissão após a primeira

fase de quimioterapia. Além disso, a expressão do gene BCRP foi maior na recaída do que no diagnóstico (STEINBACH *et al.*, 2002). Em adultos com LMA foi demonstrado uma correlação entre a expressão de RNA mensageiro (RNAm) de BCRP e menor taxa de remissão completa (43% em pacientes BCRP positivos *versus* 69% em pacientes negativos) e menor sobrevivência (12% dos pacientes BCRP positivos apresentaram sobrevida livre de doença em 4 anos *versus* 33% em pacientes negativos para expressão de BCRP (BENDERRA *et al.*, 2004). Em relação a sobrevida global de 4 anos, 19% dos pacientes BCRP positivos alcançaram *versus* 38% em pacientes BCRP negativos) (BENDERRA *et al.*, 2004). Além disso, os pacientes podem superexpressar mais de uma proteína transportadora e já foi visto que a expressão de BCRP e Pgp em conjunto configura um pior prognóstico (BENDERRA *et al.*, 2005).

1.3.2 DNA Topoisomerasas

As DNA topoisomerasas são enzimas que modulam o estado topológico do DNA nas células. Essas enzimas regulam o superenovelamento positivo e negativo do DNA e removem os nós e emaranhados do material genético, criando uma quebra transitória na dupla hélice (BARANELLO; KOUZINE; LEVENS, 2013).

O DNA é um polímero extremamente longo de forma que um único genoma de mamíferos corresponde a aproximadamente 2 metros de comprimento. Este DNA é localizado no núcleo celular, cujo volume é de aproximadamente 10^{-17} m^3 e o diâmetro equivalente a $6\mu\text{M}$, ou seja, a circunferência média de um núcleo de uma célula de mamífero é quase um milhão de vezes menor do que o comprimento do genoma que precisa ser armazenado no seu interior. Logo, o DNA deve ser altamente compactado, o que cria muitas alças nos domínios do DNA (*loops*) e pontos de contato entre esses domínios. Além disso, o metabolismo do DNA necessita que as duas fitas da dupla hélice sejam separadas para que elas sirvam como modelos para replicação, transcrição, recombinação e reparo. Devido ao tamanho e a massa dos complexos de replicação e transcrição, é plausível que tais complexos não girem livremente em torno da dupla hélice de DNA. Devido a rotação limitada dos domínios de DNA flanqueados aos complexos de replicação e transcrição, o DNA superenovelado é gerado como consequência do seu metabolismo (ALBERTS *et al.*, 2017) (Figura 1.8).

O acúmulo de DNA superenovelado positivamente gera diversos fenômenos

celulares, como o bloqueio da replicação, transcrição, e outros processos essenciais às células, além da geração de nós no material genético que, quando acumulados no genoma, inviabilizam a separação da fita dupla de DNA (ROCA, 2011). Além disso, se cromátides-irmãs permanecessem emaranhadas (ou seja, concatenadas) antes da divisão celular, as células morreriam por falhas durante o processo de mitose (NITISS, 2009b). Portanto, as topoisomerases eucarióticas são enzimas cruciais para as células, pois elas podem relaxar o DNA positivamente e negativamente superenovelado. Esse relaxamento possibilita a separação das fitas duplas de DNA para a transcrição e replicação, a segregação de duas cópias idênticas de genomas inteiros em duas células filhas após a replicação, e a compactação do genoma nas células (CHEN; CHAN; HSIEH, 2013).

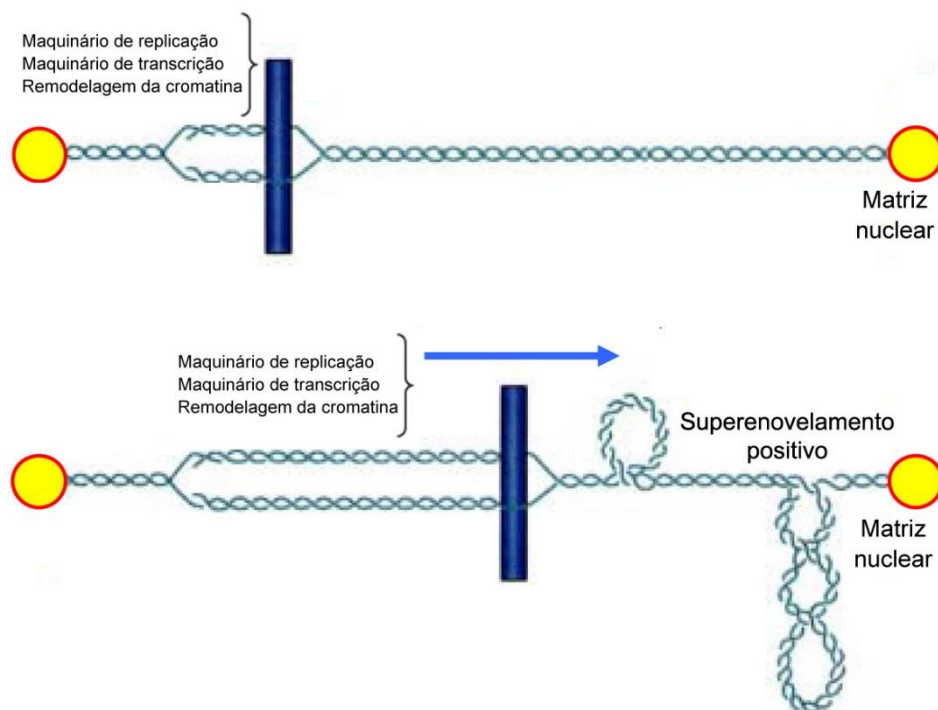


Figura 1.8: Formação de DNA superenovelado positivamente causado pelo deslocamento do maquinário de replicação, transcrição do DNA e remodelagem da cromatina através do DNA imobilizado a regiões da matriz nuclear (representados pela seta e haste de movimento na dupla hélice). Adaptado de POMMIER, 2006.

As topoisomerases são classificadas como tipo I e tipo II, de acordo com o número de fitas da dupla hélice de DNA que elas clivam. Portanto, são denominadas Topo I quando clivam uma única fita do DNA, e Topo II quando clivam as duas fitas da dupla hélice do DNA para exercer suas funções catalíticas (FORTERRE *et al.*, 2007; VOS *et al.*, 2011).

Uma característica comum das topoisomerasas é o mecanismo catalítico, que é semelhante em todas as classes dessas enzimas e consiste em um ataque nucleofílico à ligação fosfodiéster do DNA por um resíduo de tirosina catalítico da topoisomerase. O resultado é a fixação covalente da tirosina ao fosfato do DNA (P-Y) na porção final da fita de DNA clivada. Essas reações são altamente reversíveis e deixam a sequência de DNA inalterada após as reações com as topoisomerasas (POMMIER, 2013).

As topoisomerasas apresentam redundância em suas funções e sua expressão é induzida em resposta à atuação dos inibidores de topoisomerasas. A inibição completa de apenas um tipo de topoisomerase já é suficiente para levar à morte celular por apoptose (KOH; NISHIO; SAIJO, 2005; POMMIER, 2013).

1.3.2.1 Aspectos gerais, estrutura, atividade e função da Topo I

A Topo I humana consiste em um monômero, com 91kDa. O gene que a codifica está localizado no cromossomo 20q11.2 – 13.1. Essa enzima tende a se concentrar nas regiões superenoveladas da cromatina, particularmente associada aos complexos de transcrição ou replicação (BUGREEV & NEVINSKY, 2009).

A enzima Topo I humana tem 765 resíduos de aminoácidos e é formada pelos domínios N-terminal, C-terminal, domínio central e o domínio espaçador ou de ligação (STEWART; IRETON; CHAMPOUX, 1996) (Figura 1.9). O domínio N-terminal (resíduos 1 – 214) é altamente carregado e contém alguns resíduos hidrofóbicos e vários peptídeos sinais. Este domínio é responsável pela localização nuclear da Topo I, mas não é essencial para atividade desta enzima (ALSNER *et al.*, 1992). A região C-terminal (resíduos 713 – 765) contém Tyr723, que forma uma ligação fosfodiéster com o fosfato na posição terminal 3' do filamento alvo na clivagem do DNA. O domínio C-terminal, juntamente com o domínio central (subdomínios I, II e III; resíduos 215 – 635), o qual contém resíduos que formam o centro ativo e de ligação ao DNA, determinam a atividade catalítica da Topo I (BUGREEV & NEVINSKY, 2009). O domínio espaçador ou de ligação (resíduos 636 – 712) conecta os domínios central e C-terminal. Esta região não está diretamente envolvida na atividade catalítica da Topo I, mas parece participar do relaxamento do DNA superenovelado (SIRIKANTARAMAS *et al.*, 2015).

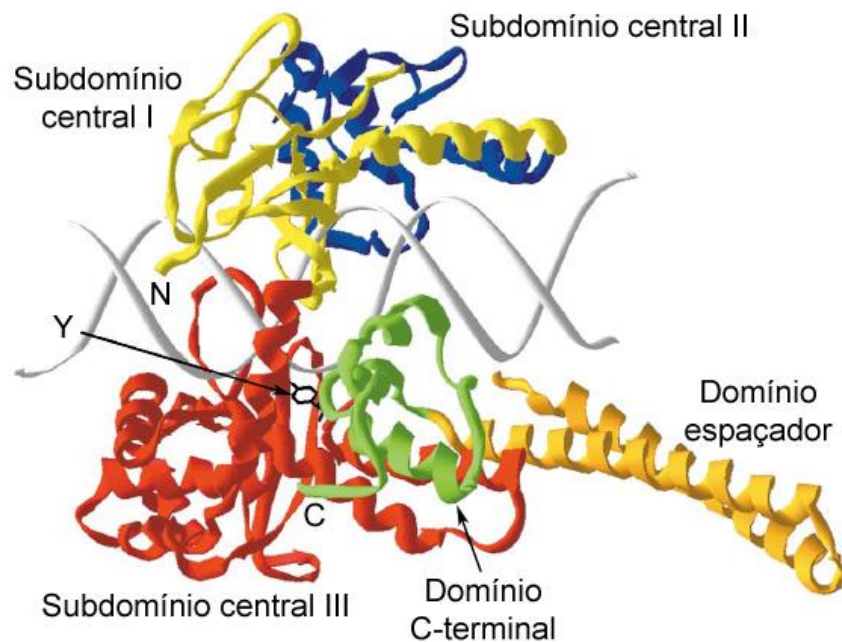


Figura 1.9: Estrutura de domínios da Topo I humana complexada ao DNA. O domínio central e os seus três subdomínios estão mostrados em cores, sendo I (amarelo), II (azul) e III (vermelho). Os domínios espaçador e o C-terminal estão representados em laranja e verde, respectivamente. As regiões N-terminal (N) e C-terminal (C) da proteína também estão indicadas na figura, assim como o sítio de tirosina (Y) ativo. Adaptado de CHAMPOUX, 2001.

A enzima Topo I relaxa o DNA superenovelado na ausência de um cofator energético clivando uma única fita da dupla hélice de DNA e permitindo que a fita clivada gire em torno do complexo Topo I ligado ao DNA (Figura 1.10). Esse mecanismo de rotação do DNA é controlado e ocorre na conformação de grampo fechado da Topo I, sem abertura do mesmo, causando atrito entre o DNA e a cavidade da enzima, ou seja, o DNA não gira livremente (POMMIER, 2013).

Uma vez que o DNA está relaxado, a Topo I religa covalentemente as fitas de DNA clivadas. Esta religação requer o alinhamento do grupo hidroxila-5' na porção final do DNA com a ligação fosfodiéster DNA-tirosina. Para isso, a ligação com a tirosina catalítica é desfeita e então são religadas as extremidades 5' e 3' de uma das fitas do DNA. Em condições normais, os produtos intermediários da clivagem são transitórios e a religação é favorecida em detrimento da clivagem (CHEN; CHAN; HSIEH, 2013) (Figura 1.10).

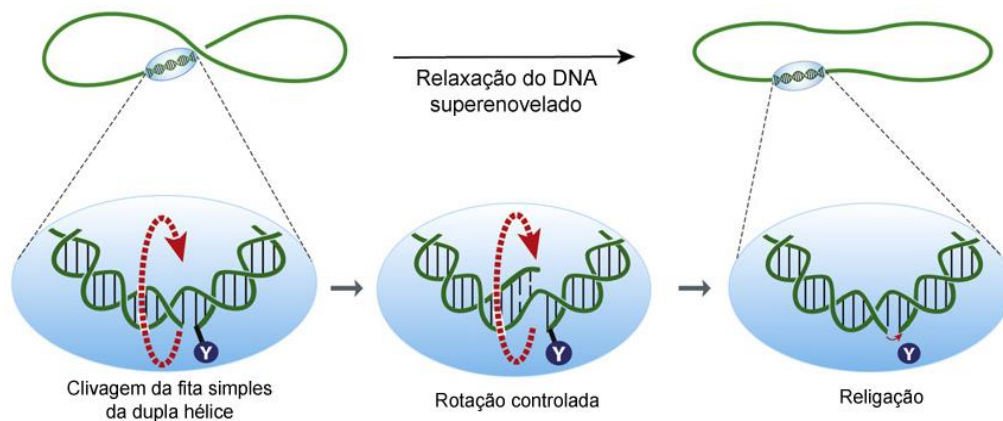


Figura 1.10: Relaxamento do DNA superenovelado pela Topo I através de rotação controlada do DNA. Adaptado de POMMIER *et al.*, 2010.

Portanto, as Topo I humanas são capazes de aliviar o stress causado pela torção da dupla hélice de DNA. As Topo I estão envolvidas em todos os processos de DNA que englobem sistemas de rastreamento e têm um papel importante na manutenção da integridade genômica (VOS *et al.*, 2011).

1.3.2.2 Aspectos gerais, estrutura, atividade e função da Topo II

As enzimas Topo II possuem duas isoformas, a Topo II α e II β , sendo a Topo II α objeto do presente trabalho. A Topo II α humana é um homodímero, com 170 kDa, cujo gene que a codifica está localizado no cromossomo 17q21–22. Essa enzima é essencial para a sobrevivência de células com crescimento ativo, sendo encontrada em forquilhas de replicação, além de permanecer fortemente associada aos cromossomos durante a mitose, atuando na replicação do DNA e na segregação de cromossomos (NITISS, 2009b).

A estrutura primária da Topo II α pode ser dividida em três domínios (Figura 1.11). O domínio N-terminal (primeiros ~ 428 aminoácidos) contém o sítio de ligação e hidrólise do ATP (LINDSEY *et al.*, 2014). O domínio central (aminoácidos ~429 – 1.200) contém o sítio ativo da tirosina (aminoácido 805, na hTopo II α) necessário para a clivagem e religação do DNA (LINDSEY *et al.*, 2014). O domínio C-terminal da Topo II α (aminoácidos ~1.201 – 1.521) é altamente variável entre diferentes espécies e inclusive entre as duas isoformas (α e β) de hTopo II. Embora seja dispensável para a atividade catalítica *in vitro*, este domínio contém sequências de localização nuclear, sítios de fosforilação, além de desempenhar um papel importante no reconhecimento

da geometria do DNA. Esse domínio ainda participa da regulação da atividade da enzima por modificações pós-traducionais, e da regulação da função da enzima pelas interações proteína - proteína (GILROY & AUSTIN, 2011).

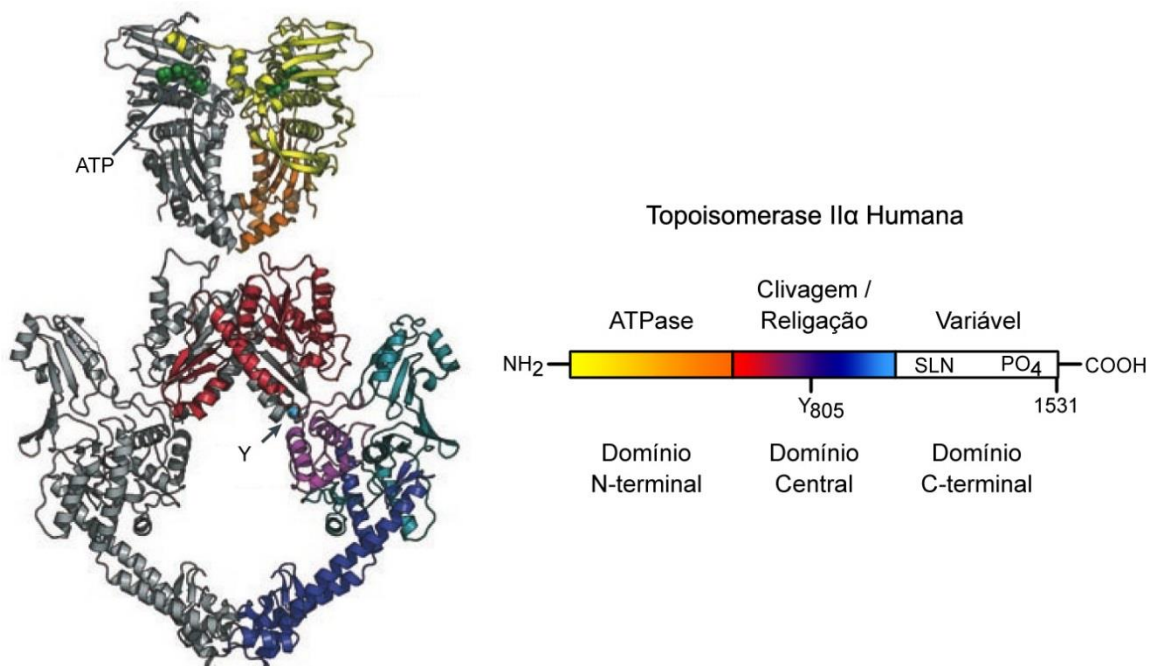


Figura 1.11: Estrutura da Topo II α eucariótica. A esquerda é mostrada a estrutura dos domínios ATPase e de clivagem e religação ao DNA, destacando o resíduo de tirosina (Y, indicado pela seta apontando a esfera azul clara) que faz a ligação covalente com o DNA e o cofator ATP (indicado pela seta apontando as esferas verde). O domínio N-terminal é localizado no topo da estrutura (amarelo e laranja) e o domínio central está localizado na parte inferior da estrutura (vermelho, liláz, azul claro e azul escuro). Adaptada de (SCHOEFFLER; BERGER, 2008).

A enzima Topo II α , relaxa de forma mais eficiente o DNA positivamente superenovelado. Essas enzimas são capazes de remover a torção na hélice de DNA, além de resolver os nós e o emaranhado existentes na dupla hélice. A atuação das enzimas Topo II α no processamento do DNA é necessária para a recombinação, segregação cromossômica, além de condensação e descondensação adequada dos cromossomos (GHILAROV; SHKUNDINA, 2012; SEOL *et al.*, 2013).

A ação das enzimas Topo II α resulta numa quebra temporária na fita dupla de DNA, seguida por um evento de passagem de uma segunda fita dupla de DNA através do DNA previamente clivado. Para a realização desta atividade catalítica, a Topo II α necessita de dois cofatores, um cátion divalente, como Mg⁺² para todas as etapas além da ligação da enzima com o DNA; e o ATP (DEWEESE & OSHEROFF, 2010). Essas enzimas atuam primeiro se ligando a dois segmentos do DNA clivando uma

dupla hélice em um dos segmentos. Após, transportam o segundo segmento de DNA através da fenda de clivagem, religando o primeiro segmento de DNA clivado e liberando o segundo segmento de DNA transportado. Por fim, fecham a fenda de clivagem e finalmente recuperam a capacidade de iniciar um novo ciclo catalítico (CHANG *et al.*, 2013) (Figura 1.12).

Para conduzir a reação de passagem de um segmento de DNA por outro, a Topo II α utiliza a energia do ATP, necessitando normalmente, de duas moléculas do mesmo. O ATP não é necessário para a clivagem do DNA e nem para a religação do mesmo, no entanto, a ligação desta molécula à Topo II α desencadeia o transporte de DNA através da fenda de clivagem de ácidos nucléicos. Além disso, apesar da hidrólise de ATP não ser um pré-requisito para o evento de passagem do segmento de DNA, parece que esta etapa ocorre mais rapidamente se ela é precedida pela hidrólise de uma das moléculas de ATP ligadas à enzima e esta hidrólise é necessária para a reciclagem da enzima (DING; LIN; FENG, 2013).

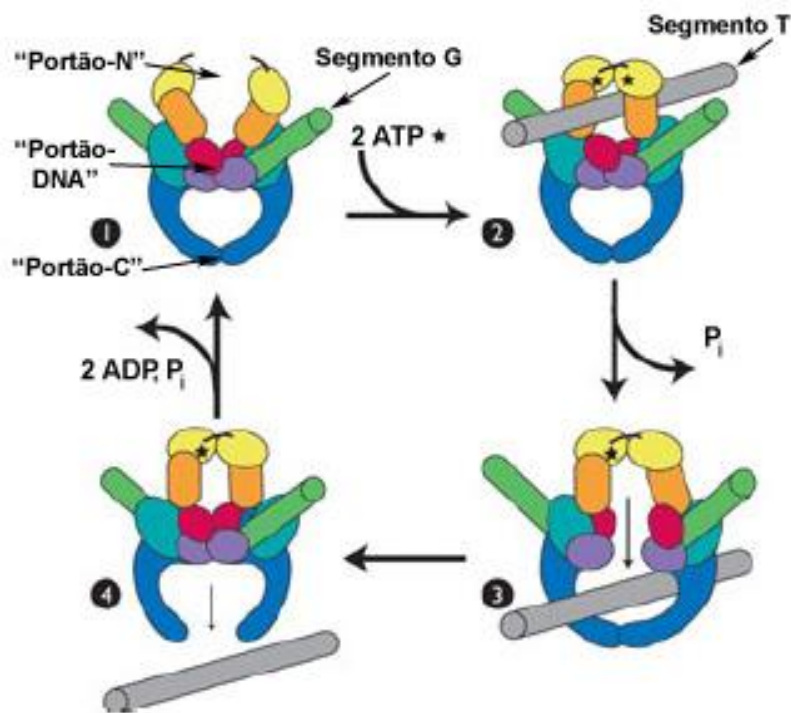


Figura 1.12: Reação de separação de duas fitas duplas de DNAs pela Topo II α . 1) A enzima Topo II α primeiro se liga ao segmento G (verde) de uma molécula de DNA entrelaçada; 2) A ligação de duas moléculas de ATP (estrela preta) ao domínio N-terminal (amarelo e laranja) fecha o “portão-N”, capturando um segmento T (cinza) de DNA; 3) A hidrólise de uma molécula de ATP e a liberação do fosfato inorgânico ocorre concomitantemente com a passagem do segmento T através do “portão-DNA”. O ATP restante permanece intacto, prevenindo a abertura do “portão-N” e o escape do segmento T; 4) Após a religação do segmento G há a abertura do “portão-C”, permitindo que o segmento T passe pela enzima e seja liberado. A hidrólise do ATP remanescente e liberação do ADP e P_i leva à abertura do “portão-N”, restabelecendo a topoisomerase para um novo ciclo de separação de duas fitas de DNA. Adaptado de SCHOEFFLER; BERGER, 2008.

1.3.3 Família serina-treonina quinase Akt

Akt também conhecida como proteína quinase B (PKB) é uma proteína de 57 kDa com importante papel fisiológico, estando envolvida com a ativação de diversos alvos celulares através da fosforilação destes. Foram identificados mais de 100 substratos de Akt, dos quais cerca de 40 foram caracterizados como mediadores das funções pleiotrópicas de Akt, envolvidos na indução de proliferação, migração e sobrevivência celular (MANNING; CANTLEY, 2007).

A família de proteínas Akt compreende três isoformas altamente conservadas e homólogas entre si (Akt-1, Akt-2 e Akt-3) que regulam o crescimento, a

sobrevivência e a morte celular em tumores (DATTA; BRUNET; GREENBERG, 1999; FORTIER; ASSELIN; CADRIN, 2011). No entanto, apesar do alto grau de semelhança entre as sequências nucleotídicas dessas isoformas, elas possuem funções distintas e algumas vezes opostas. Elas são encontradas expressas em diferentes níveis de acordo com o tipo celular e contribuem de formas diferentes para a progressão tumoral (KHABELE *et al.*, 2014; HOFBAUER *et al.*, 2016; LINNERTH-PETRIK *et al.*, 2014; GROTTKE *et al.*, 2016).

Em condições normais a via de Akt é regulada negativamente por PTEN, um gene supressor tumoral, no entanto esse é encontrado mutado na maioria dos tumores. Na ausência de PTEN funcional, a proteína Akt é encontrada constitutivamente ativada nas células e essa alta atividade correlaciona-se com a carcinogênese, respostas precárias ao tratamento e aumento da resistência à quimioterapia (McCUBREY *et al.*, 2011).

A ativação de Akt ocorre na membrana plasmática, através da sua fosforilação nos sítios Thr308 e Ser473. A ativação de Akt completa requer ambas as etapas de fosforilação. Akt migra, então, tanto para o citosol quanto para o núcleo, onde desempenha importantes papéis anti-apoptóticos (MARTELLI *et al.*, 2006).

Akt é encontrada constitutivamente ativa em diversas neoplasias, dentre elas na LMA e na LLA de linfócitos T (LLA-T) (BONGIOVANNI; SACCOMANI; PIOVAN, 2017; MARTELLI *et al.*, 2010). Sendo assim, a inibição da atividade de Akt restringe a sobrevivência celular, de forma que mutantes dominante-negativos em Akt predispõe a um aumento do efeito citotóxico de fármacos quimioterapêuticos, revertendo o fenótipo MDR. Dessa forma, moléculas inibidoras dessa proteína têm sido avaliadas em ensaios clínicos com grande potencial no tratamento tumoral (GIROUARD *et al.*, 2013; DEFEO-JONES *et al.*, 2005).

1.3.4 microRNAs na resistência tumoral

A atenção de muitos pesquisadores tem se voltado para o papel de microRNAs (miRNA) como potenciais biomarcadores da resistência tumoral aos quimioterápicos, uma vez que eles são encontrados desregulados em diversas doenças, incluindo tumores, e estão envolvidos com a regulação gênica pós-transcricional em processos como apoptose, proliferação, diferenciação e sinalização celular (DRAKAKI; ILIOPOULOS, 2009; GIOVANNETTI *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2010).

Os miRNAs constituem uma classe de pequenas moléculas de RNAs, de 18 a 24 nucleotídeos, não codificadores de proteínas que se ligam às sequências complementares na região 3' UTR (*untranslated region*) de RNAs mensageiros (RNAm) de múltiplos alvos (GIOVANNETTI *et al*, 2011). A ligação desses miRNA ao RNAm, na maioria das vezes, não ocorre com perfeita complementaridade, levando à inibição da tradução ou desestabilização do RNAm complementar. Consequentemente, são encontrados baixos níveis da proteína codificada pelo RNAm alvo (JANSSON; LUND; 2012; GREGORY; SHIEKHATTAR, 2005).

Os miRNAs estão presentes de forma abundante em todas as células humanas, cerca de 1.400 miRNAs já foram identificados em humanos, atuando na repressão de centenas de alvos e regulando mais de 60% dos RNAm. Esta é, provavelmente, a maior forma de regulação pós-transcricional já identificada (JANSSON; LUND; 2012).

Diversos estudos têm associado os miRNAs com a resistência ao tratamento em diversas neoplasias, sugerindo que alvos específicos de miRNAs possam se configurar como uma nova abordagem terapêutica para o tratamento do câncer (ZHU *et al.*, 2014; GOUNARIS-SHANNON; CHEVASSUT, 2013; POGRIBNY *et al.*, 2010; WEIDHAAS *et al.*, 2007).

Dessa forma, diversas moléculas têm sido exploradas como alvos de diferentes miRNAs. Alterações nas proteínas topoisomerasas estão relacionadas à resistência às antraciclínas, podofilotoxinas, amsacrinas e demais quimioterápicos que atuam na inibição dessas enzimas. Essas enzimas já foram validadas como alvos de diversos miRNAs, dentre eles os microRNAs miR-23a, miR-143 e miR-485 atuam respectivamente no RNAm da Topo II β e de forma direta ou indireta no RNAm da Topo II α (WU *et al.*, 2011; SRIKANTAN *et al.*, 2011; UGRAS *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2011).

O emprego dos miRNAs como alvos terapêuticos é uma abordagem recente e resultados *in vitro* e *in vivo* sugerem que os miRNAs são eficientes para o tratamento do câncer, mas ainda existe uma enorme defasagem entre os resultados dos miRNAs gerados na pesquisa básica e as suas aplicações clínicas (GIOVANNETTI *et al*, 2011).

1.4 Inibidores de topoisomerases no tratamento antitumoral

As enzimas Topo I e II α são alvos moleculares bem estabelecidos de fármacos antitumorais, de forma que inibidores dessas enzimas estão entre os fármacos mais eficazes no tratamento do câncer (NITISS, 2009a; CHIKAMORI *et al.*, 2010; CASTELLI *et al.*, 2012; KATHIRAVAN *et al.*, 2013; KHADKA & CHO, 2013).

As topoisomerases são particularmente vulneráveis aos inibidores durante o estágio de clivagem, referido como "complexo de clivagem". Os inibidores da enzima são classificados como *poisons* ou como inibidores catalíticos. Os inibidores do tipo *poisons* atuam de forma a transformar as topoisomerases em toxinas letais para o DNA, por isto são referidos como tais. Esses compostos atuam estabilizando o complexo covalente Topoisomerase–DNA, impedindo que as quebras na fita do DNA sejam consertadas, o que resulta em um aumento dos níveis de DNA clivado nas células vivas. Tal complexo torna-se citotóxico e resulta conseqüentemente, em apoptose (POMMIER, 2013).

Já os inibidores catalíticos não resultam na clivagem do DNA, mas diminuem a velocidade da reação catalisada pelas enzimas. Esses inibidores têm sido bastante identificados nos últimos anos e dentre os que inibem a enzima Topo II α estão incluídos a merbarona - um derivado de cumarina, fostriecina, aclarubicina, SN22995, novobiocina, suramina, cloroquina e bisdioxopiperazinas (ICRF-193, ICRF-187, ICRF-154, MST-16, etc.) (ANNETTE *et al.*, 2003; PASTOR *et al.*, 2012). Os inibidores catalíticos da Topo II α podem atuar em qualquer uma das etapas do ciclo catalítico. A aclarubicina inibe a ligação da enzima com o DNA, a merbarona e taurosporina inibem a clivagem da dupla fita do DNA, a novobiocina e coumarina inibem a passagem da fita dupla em presença de ATP e ICRF-193 inibe a hidrólise do ATP (POGORELCNIK; PERDIH; SOLMAJER, 2013).

Inibidores *poisons* de topoisomerases como a camptotecina (*poison* de Topo I) e o etoposídeo (*poison* de Topo II α) são utilizados como fármacos antitumorais na clínica (BALDWIN; OSHEROFF, 2005; LORUSSO *et al.*, 2010). O etoposídeo e seu derivado, teniposídeo, são compostos derivados da podofilotoxina e representam uma classe de agentes antitumorais mais ativos contra tumores sólidos, sendo amplamente utilizados como fármacos padrão para o tratamento de várias neoplasias, como câncer de pulmão, ovário, linfomas e leucemias. Além dos derivados da podofilotoxina, outros compostos antitumorais com atividade *poison* que atuam sobre Topo II α são bastante relevantes clinicamente. Dentre estes estão as antraciclinas, muito utilizadas no

tratamento de leucemias agudas (LMA e LLA) e câncer de mama (como por exemplo, adriamicina, mitoxantrona, doxorubicina, idarrubicina e daunorrubicina) e as aminoacridinas (por exemplo, m-AMSA) (KETRON *et al.*, 2012; POGORELČNIK; PERDIH; SOLMAJER, 2013b).

Além desses fármacos atualmente em uso clínico, existem diversos compostos inibidores da Topo II α que exibem alta atividade antitumoral, incluindo em células resistentes ao etoposídeo, em testes clínicos (STIBOROVÁ; FREI, 2014; POMMIER, 2013; MOROHASHI *et al.*, 2005; YOU, 2005; SHIMIZU *et al.*, 2002; MALONNE *et al.*, 2000).

Os inibidores de Topo II α do tipo *poison* diferem uns dos outros em relação ao mecanismo de ação. Alguns atuam inibindo a religação do DNA no complexo de clivagem (etoposídeo, teniposídeo, antraciclinas, amsacrina), enquanto outros induzem o aumento da formação do complexo de clivagem (elipticinas, azatoxinas, o flavonóide natural genisteína e a quinolona CP- 115,953) (BALDWIN; OSHEROFF, 2005; CHIKAMORI *et al.*, 2010; COWELL; AUSTIN, 2012; STIBOROVÁ; FREI, 2014).

Os inibidores de Topo I, tais como a camptotecina (CPT) e seus derivados, aprisionam esta enzima em um complexo covalente com o DNA. O irinotecano (CPT-11), um derivado de camptotecina, foi o primeiro inibidor de Topo I aprovado para uso clínico sendo usado no tratamento de muitos tipos de neoplasias, incluindo o câncer de pulmão, ovário e colo-retal. A camptotecina foi descoberta pelo Instituto Nacional de Câncer nos EUA (NCI), em uma triagem de milhares de plantas em 1950 (WALL, 1998), na qual apenas uma espécie, a *Camptotheca acuminata*, uma árvore pequena nativa da China, mostrou atividade significativa. Os ensaios clínicos iniciados na China pelo NCI foram logo abandonados devido a efeitos colaterais incluindo a toxicidade hematológica grave e cistite hemorrágica. Na década de 1980, foi demonstrado que a camptotecina inibia a atividade da Topo I de forma específica, não se ligando a Topo II, por ex., e como consequência, uma série de derivados deste composto foram posteriormente desenvolvidos para aplicação clínica. (HUANG *et al.*, 2015; KOH; NISHIO; SAIJO, 2005).

Depois da descoberta de que Topo I era o alvo exclusivo da camptotecina, iniciou-se uma busca por diversos compostos com estruturas semelhantes a este composto natural com a intenção de inibir a Topo I, mas avançar na estabilidade do composto, diminuir a toxicidade e a resistência, uma vez que a camptotecina é substrato para proteínas transportadoras de efluxo da família ABC. Nesse sentido foram desenvolvidos alguns inibidores de Topo I não derivados da camptotecina,

como NB-506, um derivado de indolocarbazole, que mostrou alta atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* e poucos efeitos adversos quando testado em estudo de fase I no Japão (MENG; LIAO; POMMIER, 2003; POMMIER, 2013). Outro inibidor de Topo I derivado de indolocarbazole é o composto J-107088 que exibe uma alta atividade antitumoral contra células resistentes a múltiplas drogas e atividade antimetastática em modelo de micrometástase para o fígado (SAIF *et al.*, 2010; KURTZBERG *et al.*, 2011).

Duas famílias de inibidores sintéticos de Topo I não derivados de camptotecina, indenoisoquinolinas e dibenzonaftiridinonas, estão em desenvolvimento clínico, atualmente iniciando estudo de fase II (POMMIER; CUSHMAN, 2009; KHADKA; CHO, 2011; POMMIER, 2013). Elas também superam o mecanismo de efluxo de drogas associado à resistência a camptotecina e produzem complexos de clivagem mais estáveis e apresentam menos toxicidade do que o topotecano.

Todos os inibidores da enzima Topo I utilizados na quimioterapia do câncer são do tipo *poison*, mas há um grande interesse no desenvolvimento de novos inibidores do tipo catalítico, devido às suas possíveis vantagens. Uma delas seria a eficácia sobre as células tumorais insensíveis a camptotecina que apresentam mutações no gene Top1 afetando o sítio de ligação da camptotecina a esta enzima (MARTINEZ; CHACON-GARCIA, 2005; POMMIER, 2013).

Além disso, os inibidores catalíticos da enzima Topo II α têm uma variedade de aplicações clínicas. Além de agentes antineoplásicos (aclaurubicina e MST-16), eles também podem ser usados como cardioprotetores (ICRF-187) ou moduladores para aumentar a eficácia de outros agentes (suramina e novobiocina) (SWIFT *et al.*, 2008).

Por fim, novos tipos de inibidores de topoisomerasas que apresentam inibição dupla tanto da Topo I quanto da Topo II α têm sido desenvolvidos. Um deles, o TAS-103 (*Taiho Pharmaceutical*), se mostrou ativo contra células resistentes ao irinotecano (CPT-11) e contra as células com fenótipo MDR (FUJIMOTO, 2007). Outro inibidor dual, o composto F11782, derivado de podofilotoxina, é um inibidor catalítico que inibe a ligação das topoisomerasas ao DNA (KRUCZYNSKI *et al.*, 2004; KAMAL *et al.*, 2015).

1.5 Compostos com atividade antitumoral

A produção de medicamentos antitumorais baseia-se fortemente em produtos naturais (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; CRAGG; NEWMAN, 2005; IMPERATORE *et al.*, 2014), esses representam quase 60 % dos medicamentos autorizados pelas agências reguladoras para uso na clínica (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Por isso, nos últimos anos, diversos compostos de diferentes classes de produtos naturais têm sido avaliados quanto ao seu potencial antitumoral e de inibição das enzimas DNA topoisomerases com interesse na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (DEWICK, 2009; SCOTTI *et al.*, 2017).

Dentre os produtos naturais bem descritos na literatura por apresentar atividade antitumoral estão as classes dos flavonóides (SUDAN; RUPASINGHE, 2014), isoflavonóides (MIZUSHINA *et al.*, 2013; VARINSKA *et al.*, 2015), quinonas (REGAL; MERCER; DEWEESE, 2014), naftoquinonas (NEVES *et al.*, 2013), pterocarpanos (MAURICH *et al.*, 2006; MILITÃO *et al.*, 2014), triterpenos (HATA *et al.*, 2006; ZHENG *et al.*, 2010; YIN *et al.*, 2015), sulfonamidas (GUIANVARC'H, 2004; SHAH; RIVERA; ASHFAQ, 2013), dentre outros.

Os triterpenos apresentam atividade antitumoral e citotoxicidade em células com fenótipo MDR (KUETE *et al.*, 2015). O ácido pomólico (AP), um triterpeno pentacíclico encontrado em *Cryobalanus icaco*, foi descrito como inibidor do crescimento celular, indutor de apoptose e ativo nas células de leucemia mielóide crônica com fenótipo MDR (FERNANDES *et al.*, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007). Além disso, o composto AP também apresentou propriedades antitumorais em células de câncer de mama, gástrico, útero, ovário, cólon e melanoma (YOSHIDA *et al.*, 2005; YOUN *et al.*, 2012; YOO *et al.*, 2013)

A estrutura quinona é comum a muitos produtos naturais e é associada à atividade anticancerígena, antibacteriana, antiviral, antimalárica, antifúngica e tripanocida. Os derivados de quinonas podem ser tóxicos às células através de diferentes mecanismos incluindo a ciclagem redox, intercalação, indução de quebras nas fitas do DNA e formação de radicais livres (SCHMIEDER *et al.*, 2003; INMAN *et al.*, 2014).

A presença do grupo amino nas quinonas leva a formação de compostos biologicamente ativos, cuja atividade está relacionada à habilidade delas receberem um ou dois elétrons, induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio. Com

isso, o estresse oxidativo gerado nas células acaba por desempenhar um papel na mutagênese e carcinogênese (ASCHE, 2005; KOSTRZEWA-NOWAK *et al.*, 2012).

Compostos naturais e sintéticos derivados de quinonas têm sido amplamente investigados para a terapia do câncer (CARDOSO *et al.*, 2014). Muitos medicamentos contendo uma porção quinona receberam aprovação para uso clínico, tais como mitomicina C (POPLIN *et al.*, 1994; TETEF *et al.*, 1995), doxorubicina (HANDE, 1998) e menadiona (TETEF *et al.*, 1995).

A menadiona é um composto químico sintético análogo a 1,4-naftoquinona que tem sido avaliado na clínica em estudos de fase I/II no tratamento de câncer de próstata combinado a vitamina C (TAREEN *et al.*, 2008; JIANG *et al.*, 2013).

A mitomicina C é um composto do grupo das mitomicinas, quinonas com atividade antibiótica e antitumoral, sendo produzida pelo fungo *Streptomyces caespitosus*. Este composto é utilizado na quimioterapia de certos tipos de tumores sólidos, como no tratamento de pacientes com câncer de mama, colo do útero e de bexiga (KAHMANN *et al.*, 2010; VOLPE *et al.*, 2010).

A daunorrubicina e seus análogos doxorubicina e idarrubicina são agentes antitumorais da série das antraciclina, uma classe de quinonas antibióticas proveniente de culturas de fungos *Streptomyces*. A daunorrubicina tem sido vastamente utilizada no tratamento das leucemias agudas. A doxorubicina possui espectro de atividade antineoplásica mais amplo do que a daunorrubicina, sendo utilizado em diversos tumores sólidos. A idarrubicina também é empregada nas leucemias agudas, em alguns tipos de linfomas e no câncer de mama, e sua toxicidade é menor do que a apresentada pela doxorubicina e daunorrubicina, induzindo menor risco de cardiotoxicidade. Há três décadas as antraciclina vêm sendo empregadas como primeira linha de tratamento em diversos tipos de tumores sólidos e hematológicos. Dentre os mecanismos celulares que levam ao efeito anticancerígeno destes fármacos podem ser citados: intercalação com o DNA e formação de espécies reativas de oxigênio. Entretanto, o principal fator indutor de morte celular desta substância reside na inibição da atuação das enzimas topoisomerases II (α e β) (DEZHENKOVA *et al.*, 2008; NIELSEN *et al.*, 1996).

As naftoquinonas atuam na inibição das topoisomerases, ação que pode estar envolvida com o seu mecanismo citotóxico e que provoca o desencadeamento da apoptose celular (NEVES *et al.*, 2013). Alguns exemplos de naftoquinonas que atuam na inibição de topoisomerases são *plumbagin*, *shikonin*, *naphthazarin*, além do

lapachol, uma naftoquinona natural e o seu derivado, a β -lapachona (YANG *et al.*, 2006).

Dentre as classes de produtos naturais, outro importante grupo que se destaca é o dos isoflavonóides, que apresenta grande diversidade estrutural e inclui diversas substâncias como: isoflavonas, isoflavanas, isoflavanonas, cumestanos, pterocarpanos, dentre outras (BOLAND; DONNELLY; 1998; DEWICK, 2009). Os isoflavonóides têm sido muito investigados devido às suas diversas atividades biológicas, tais como proteção contra doenças cardiovasculares, osteoporose, além da atividade antitumoral. Recentemente, também foi demonstrado seu efeito anti-proliferativo em células de câncer de mama (CHOI; KIM, 2013) e em câncer de próstata (ADJAKLY *et al.*, 2013). Além disso, a atividade desses compostos foi associada à inibição das enzimas DNA topoisomerases (MIZUSHINA *et al.*, 2013; SUDAN; RUPASINGHE, 2014).

Dentre o grupo dos isoflavonóides, os pterocarpanos representam a segunda maior classe de substâncias presentes em produtos naturais e são citotóxicos em diversas células tumorais, tais como, células de câncer de mama (NGUYEN *et al.*, 2009; MILITÃO *et al.*, 2014), leucemias (NETTO *et al.*, 2009), câncer de pâncreas (AWALE *et al.*, 2008), de cólon (LI *et al.*, 2008a), de carcinoma cervical humano (LI *et al.*, 2008b), além de inibir a angiogênese (LEE, 2013).

Outro grupo de grande importância na química medicinal é formado pelos compostos sulfonamidas, cujas estruturas apresentam várias atividades biológicas, como atividades anti-inflamatórias e antitumorais (BANO *et al.*, 2011; SHAH; RIVERA; ASHFAQ, 2013). A atividade antitumoral das sulfonamidas ocorre devido a interação destas com diversos alvos moleculares, como as enzimas piruvato-quinase (CHEN *et al.*, 2014), COX-2 (SUPURAN *et al.*, 2004), anidrase carbônica (BOZDAG *et al.*, 2014), quinases dependentes de ciclina, CDKs (BYTH *et al.*, 2009) e topoisomerases (GUIANVARC'H, 2004).

Com o objetivo de reunir a atividade de diversos compostos desses grupos ativos a fim de gerar estruturas com efeitos potencializados, foram sintetizadas novas moléculas de pterocarpanos e pterocarpanquinonas (denominadas LQBs). Essas moléculas foram sintetizadas no Laboratório de Química Bio-orgânica, do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais (IPPN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob a coordenação do Prof. Paulo R. R. Costa em colaboração com a Dra. Camila D. Buarque do Departamento de Química da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio). Essas moléculas surgiram inicialmente mediante a

hibridização molecular de um pterocarpano com o lapachol, uma naftoquinona com atividade antineoplásica, formando a pterocarpanquinona LQB-118 (SALUSTIANO *et al.*, 2010). Esse primeiro composto vem sendo bastante estudado pelo nosso grupo e por grupos colaboradores, tanto em estudos *in vitro* (mecanismo de ação, bioselectividade, efeito antiproliferativo em diferentes linhagens celulares, incluindo células com fenótipo MDR) (MAIA *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2013; NESTAL DE MORAIS *et al.*, 2014) quanto *in vivo* (ação leishmanicida, antitumoral e estudos toxicológicos em camundongos) (revisado em BUARQUE *et al.*, 2015). Em seguida, com o objetivo de otimizar essa estrutura, outros compostos dessa série LQB foram sintetizados, surgindo o LQB-192 (que mantém o grupamento quinona e tem a adição do grupo fenilsulfonamida) e carbo-análogos que perderam a estrutura quinona, mantendo o grupo fenilsulfonamida ou N-benziloxicarbonil. Dentre esses compostos carbo-análogos, o composto LQB-223 mostrou ser o mais ativo da série já tendo sido estudado em células de leucemia, inclusive com fenótipo MDR (BUARQUE *et al.*, 2014).

Além disso, esses compostos LQBs também apresentaram potencial inibição da enzima topoisomerase I de *plasmodium falciparum* em estudos de modelagem computacional e atividade antimalárica em camundongos (CORTOPASSI *et al.*, 2014).

As topoisomerasas são alvos importantes na quimioterapia antitumoral, de modo que em mais de 30 anos de seu uso na clínica, cerca de 50% dos protocolos de tratamento atuais ainda empregam ao menos um medicamento direcionado a inibição das topoisomerasas (NITISS, 2009a). No entanto, devido aos efeitos cardiotoxicos e do surgimento de neoplasias secundárias ao tratamento após o uso de etoposídeo e antraciclinas (principalmente associados à inibição da Topo II β por estes inibidores *poisons* usados na clínica), há grande expectativa quanto à delineação de estratégias racionais usando substâncias ativas sobre estas enzimas para o combate de neoplasias. Principalmente com mecanismo de ação diferente dos inibidores *poisons*, além de seletivas sobre as diferentes isoformas das topoisomerasas.

2. JUSTIFICATIVA

O tratamento das leucemias agudas é feito com inibidores de topoisomerasas associados a outros quimioterápicos. Apesar de atualmente esta ser a melhor opção de tratamento para estes pacientes, a taxa de morte ainda é alta tanto em LMA quanto em adolescentes e adultos com LLA. Nessas leucemias, a remissão completa muitas vezes não é alcançada devido ao fenótipo MDR, uma das causas responsáveis pelo surgimento de refratariedade ao tratamento com inibidores de topoisomerasas. Neste contexto, a fim de se obter avanços no tratamento destas doenças, torna-se fundamental o entendimento dos mecanismos moleculares da resistência aos inibidores de topoisomerasas nas leucemias agudas, além do desenvolvimento de novos compostos efetivos sobre as células com fenótipo de resistência.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Investigar o mecanismo MDR mediado por alterações nas enzimas DNA topoisomerasas, o mecanismo de ação dos novos compostos modificados de isoflavonoides (LQBs) e do triterpeno natural ácido pomólico como potenciais inibidores das enzimas DNA topoisomerasas e sua atividade antitumoral nas linhagens celulares de leucemias agudas parentais ou resistentes ao etoposídeo.

3.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a atividade biológica antitumoral dos novos compostos nas linhagens de leucemias agudas;
- Investigar o mecanismo de ação dos novos compostos via inibição das enzimas DNA topoisomerasas I e II α humana;
- Caracterizar o mecanismo de ação molecular dos compostos mais promissores, avaliando o tipo de inibição (intercalação no DNA, inibição catalítica ou *poison*), a afinidade de interação e a preferência do sítio de ligação nas enzimas DNA topoisomerasas mediante ensaios bioquímicos e de biologia computacional;

- Desenvolver e caracterizar duas linhagens celulares de leucemias agudas (LMA e LLA) resistentes ao etoposídeo (VP-16) quanto ao perfil morfológico, citogenético, de resistência a diferentes quimioterápicos, de expressão e atividade das proteínas transportadoras de efluxo Pgp e BCRP, de expressão proteica das DNA topoisomerasas, de proteínas da família Akt e de miRNAs relacionados a hTopo II α em comparação com as linhagens parentais;
- Avaliar o efeito antineoplásico dos novos compostos na proliferação celular, na citotoxicidade, na alteração do perfil do ciclo celular e na indução de morte celular das linhagens de leucemias agudas resistentes ao VP-16 comparadas às linhagens parentais;
- Investigar a modulação da proteína Akt após o tratamento com o composto LQB-118 nas linhagens de leucemias agudas (parentais e resistentes ao VP-16).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura celular

As linhagens de leucemias agudas utilizadas neste trabalho foram – CCRF-CEM (ATCC® CCL-119™), derivada da LLA, e as derivadas da LMA – HL60 (linhagem celular de leucemia promielocítica, ATCC® CCL240™, subtipo FAB M2/M3), U937 (ATCC® CRL-1593.2™, subtipo FAB M4/M5) e Kasumi-1 (ATCC® CRL-2724™, subtipo FAB M2). A partir dessas linhagens parentais foram desenvolvidas linhagens resistentes ao etoposídeo (VP-16), inibidor clássico de topoisomerase II α , mediante a exposição contínua a concentrações crescentes deste fármaco. As linhagens CCRF-CEM e U937 foram submetidas inicialmente a concentração de 0,001 μ M de VP-16 e após 21 meses de aumento gradual da exposição a este fármaco, as linhagens tornaram-se resistentes à concentração de 1 μ M de VP-16. As linhagens resistentes ao VP-16 foram denominadas CEM-R (LLA) e U937-R (LMA). Todas as linhagens foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma, St.Louis, MO, USA) suplementado com glutamina (2 mM) e 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado por 1 h a 56 °C (*Defined*, HyClone™) com exceção da linhagem Kasumi-1 que foi cultivada em meio DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* – GIBCO®, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) com 20% SFB. As linhagens foram mantidas em estufa de atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37 °C. As linhagens resistentes

CEM-R e U937-R foram mantidas com 1 μM de VP-16 adicionado ao meio de cultura, concentração máxima atingida durante a indução de resistência.

4.2 Análise do perfil de STR das linhagens de leucemias agudas

A autenticidade das linhagens celulares foi confirmada através da metodologia STR (*Short Tandem Repeat*) que se baseia na identificação de regiões polimórficas presentes no genoma da amostra através da amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Para tanto, foi adicionado PBS (solução salina tamponada com fosfato) a 5×10^6 células das linhagens HL60, U937 e Kasumi-1 que foram, então, submetidas a centrifugação a 500 g por 3 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet seco foi congelado e enviado ao Laboratório Sonda da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) para análise genotípica. A genotipagem da linhagem CCRF-CEM foi realizada no Laboratório de Diagnósticos por DNA (LDD) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Para tanto, foi feita a extração de DNA de cerca de 5×10^6 células pelo método DNAzol (*DNAzol Reagent*®, Invitrogen). Ao todo, foram avaliados nove *loci* nas linhagens HL60 e U937, e dezesseis *loci* nas linhagens Kasumi-1 e CCRF-CEM. O perfil STR destas linhagens foi comparado com as informações depositadas no banco de dados da ATCC (*American Type Culture Collection*). Foi possível correlacionar as características da linhagem U937, HL60 e Kasumi-1 integralmente com o perfil descrito na ATCC. A linhagem CCRF-CEM apresentou diferença em um único alelo do marcador CSF1PO, no entanto, isso não desqualifica a sua identidade que foi majoritariamente correspondente ao perfil encontrado na ATCC (Figura 4.1).

A)



		U937		
			ATCC	INCA
1	CSF1PO	Al. 1	12	12
		Al. 2		
2	TPOX	Al. 1	11	11
		Al. 2	8	8
3	TH01	Al. 1	9.3	9.3
		Al. 2	6	6
4	vWA	Al. 1	15	15
		Al. 2	14	14
5	D16S539	Al. 1	12	12
		Al. 2		
6	D7S820	Al. 1	11	11
		Al. 2	9	9
7	D13S317	Al. 1	12	12
		Al. 2	10	10
8	D5S818	Al. 1	12	12
		Al. 2		
9	Amelogenina	Al. 1	X	X
		Al. 2	X	X

B)



		CCRF-CEM			
		ATCC		INCA	
		Al. 1	Al. 2	Al. 1	Al. 2
1	D8S1179			13	13
2	D21S11			30	33.2
3	D7S820	9	13	9	13
4	CSF1PO	10	11	11	11
5	D3S1358			15	15
6	TH01	6	7	6	7
7	D13S317	11	12	11	12
8	D16S539	10	13	10	13
9	D2S1338			24	24
10	D19S433			14	15
11	vWA	17	19	17	19
12	TPOX	8	8	8	8
13	D18S51			13	18
14	AMEL	X	X	X	X
15	D5S818	12	13	12	13
16	FGA			23	23

C)



		HL-60 - Lote A		
			ATCC	LHOCCM
1	CSF1PO	Al. 1	14	14
		Al. 2	13	13
2	TPOX	Al. 1	11	11
		Al. 2	8	8
3	TH01	Al. 1	8	8
		Al. 2	7	7
4	vWA	Al. 1	16	16
		Al. 2		
5	D16S539	Al. 1	11	11
		Al. 2		
6	D7S820	Al. 1	12	12
		Al. 2	11	11
7	D13S317	Al. 1	11	11
		Al. 2	8	8
8	D5S818	Al. 1	12	12
		Al. 2		
9	Amelogenina	Al. 1	X	X
		Al. 2	X	X

D)



		Kasumi		
			ATCC	INCA
1	D2S1338	Al. 1		19
		Al. 2		
2	D19S433	Al. 1		15.2
		Al. 2		13
3	CSF1PO	Al. 1	12	12
		Al. 2	10	10
4	TPOX	Al. 1	9	9
		Al. 2	8	8
5	TH01	Al. 1	9	9
		Al. 2	6	6
6	vWA	Al. 1	14	14
		Al. 2		
7	D16S539	Al. 1	12	12
		Al. 2	9	9
8	D7S820	Al. 1	11	11
		Al. 2	8	8
9	D13S317	Al. 1	13	13
		Al. 2	11	11
10	D5S818	Al. 1	11	11
		Al. 2	9	9
11	FGA	Al. 1		24
		Al. 2		22
12	D3S1358	Al. 1		17
		Al. 2		15
13	D18S51	Al. 1		16
		Al. 2		15
14	D8S1179	Al. 1		14
		Al. 2		13
15	D21S11	Al. 1		31
		Al. 2		30
16	Amelogenina	Al. 1	X	X
		Al. 2	X	X

Figura 4.1: Genotipagem das linhagens de leucemias agudas. Resultado do perfil STR da (A) U937 (LMA); (B) CCRF-CEM (LLA); (C) HL60 (LMA); (D) Kasumi-1 (LMA). O laudo de STR da CCRF-CEM foi emitido pelo Laboratório de Diagnósticos por DNA – UERJ e os demais pelo Laboratório Sonda - UFRJ; ATCC: representa o perfil dos marcadores listados no banco de dados da *American Type Culture Collection*; INCA ou LHOCCM: perfil dos marcadores encontrados nas linhagens submetidas à avaliação.

4.3 Avaliação da presença de micoplasma nas linhagens celulares

Todas as linhagens foram avaliadas periodicamente quanto à presença de micoplasma, a fim de garantir a qualidade das mesmas para realização dos experimentos. Para tanto, as células foram submetidas à centrifugação, a fim de coletar o sobrenadante de cada cultura celular, seguido de extração do DNA de cada linhagem, pelo método DNAzol. Em seguida, 100 ng do DNA extraído foram usados para análise de detecção de micoplasma feita por PCR semiquantitativo como previamente descrito (UPHOFF; DREXLER, 2014). Posteriormente, os produtos de PCR foram avaliados em eletroforese de gel de agarose 1,5 %, com tampão TAE 1X (0,04 M Tris-acetato; 0,001 M EDTA) e 0,5 µg/mL GelRed, possibilitando a visualização das bandas de DNA que foram fotografadas sob iluminação ultra-violeta mostrando que as linhagens se encontravam livres de contaminação por micoplasma ao longo de todo o período do estudo (Figura 4.2).

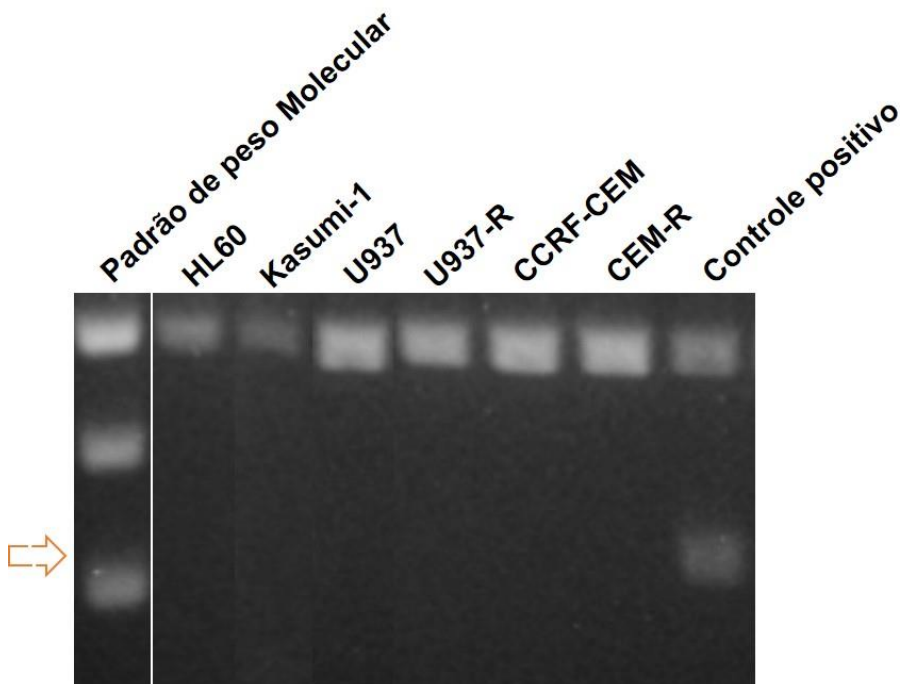


Figura 4.2: Análise eletroforética em gel de agarose 1% dos produtos de PCR do teste de avaliação da presença de micoplasma nas linhagens de leucemias agudas. A seta indica a banda relativa à contaminação por micoplasma.

4.4 Análise citogenética das linhagens de leucemias agudas

Afim de acompanhar as alterações cromossômicas referentes ao desenvolvimento das linhagens resistentes foi feita a avaliação do cariótipo das linhagens U937, U937-R, CCRF-CEM e CEM-R em colaboração com o Laboratório de Citogenética, Centro de Medula Óssea - INCA. Para essa análise, foi utilizada a técnica previamente descrita por Testa e colaboradores em 1985 (TESTA *et al.*, 1985). Para tanto, foi adicionado 0,05 µg/mg de colchicina à cultura de células com 1×10^7 células/mL, seguido de incubação na estufa por 1 h, em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37 °C. Para a preparação das lâminas utilizou-se a metodologia descrita por Hungerford em 1965 (HUNGERFORD, 1965) e os cromossomos foram avaliados pela técnica de bandeamento GTG (SEABRIGHT, 1971). A identificação e classificação cromossômica foi feita segundo o Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN), 2013 (SIMONS; SHAFFER; HASTINGS, 2013). Foram analisadas em microscópio ótico pelo menos 30 metáfases por linhagem, das quais foram adquiridas 5 a 10 imagens para a montagem dos cariótipos de cada linhagem, através do Sistema de *Cariotipagem Cytovision Applied Image*.

4.5 Agentes citotóxicos e compostos avaliados

Os novos compostos LQBs -118, -192, -223, -266, -268 e -326, (Figura 4.3) foram sintetizados no Laboratório de Química Bio-orgânica, do IPPN, UFRJ e no Departamento de Química da PUC-Rio, como descrito previamente (NETTO, *et al.*, 2010; BUARQUE, *et al.*, 2014).

O composto natural ácido pomólico (Figura 4.4) foi adquirido pela Biobiopha Co., Ltda, Yunnan, P.R. China e cedido pelo Laboratório de Imunologia Celular, do Instituto de Biofísica Carlos Chaves Filho (IBCCF), UFRJ.

Os compostos (sintético e natural), foram recebidos na forma liofilizada, solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA) e mantidos em estoque na concentração de 25 mM, a -20 °C. Para uso experimental, os compostos foram diluídos em meio de cultura RPMI-1640 (para os ensaios celulares) ou em água (para os ensaios bioquímicos de inibição enzimática das DNA topoisomerasas), imediatamente antes do uso. O DMSO foi usado como controle do veículo em todos os experimentos, na concentração máxima contida na diluição dos compostos avaliados.

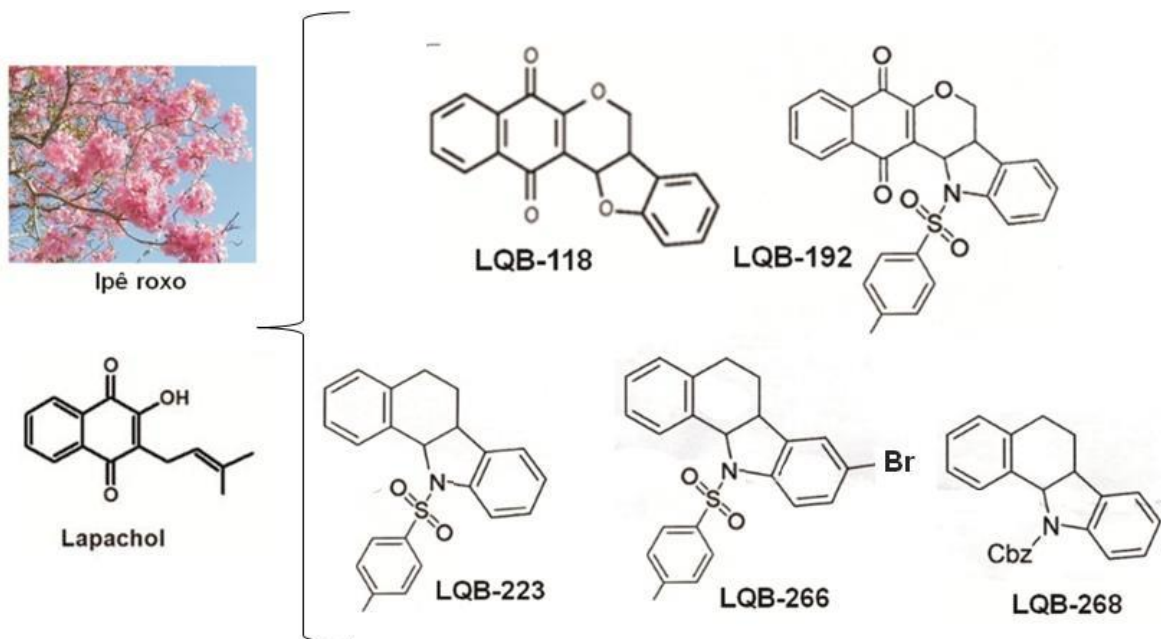


Figura 4.3: Estrutura geral dos novos compostos LQBs, estruturalmente relacionados ao lapachol, uma naftoquinona natural extraída da planta *Tabebuia spp.* (Bignoniaceae), popularmente conhecida como "ipê".

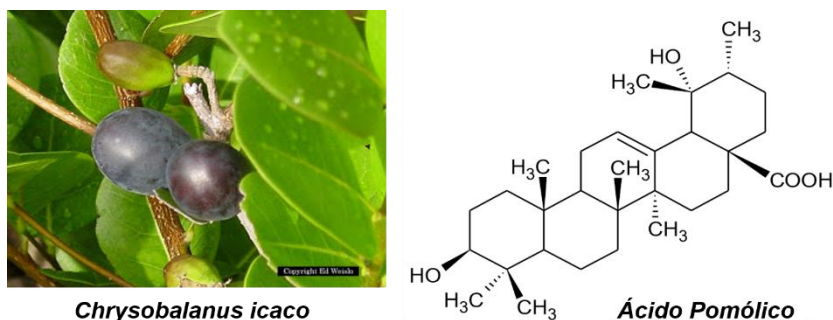


Figura 4.4: Estrutura do composto ácido pomólico, um triterpeno natural isolado da planta *Chrysobalanus icaco*.

4.6 Ensaio de viabilidade celular

A análise da viabilidade celular foi realizada pelo ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetilazolil-2)-2,5-difeniltetrazolium, da GE Healthcare, USA) com a finalidade de avaliar o efeito citotóxico da exposição das quatro linhagens de leucemias agudas a diversas concentrações de diferentes moléculas. Nesse ensaio, a viabilidade celular é avaliada de acordo com a atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, uma vez que estas enzimas são capazes de reduzir o sal de tetrazólio MTT de coloração amarela, ao produto formazana nas células viáveis e

metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983). A formazana constitui cristais que ao serem solubilizados em DMSO exibem uma coloração violeta à solução. Esta pode ser quantificada por espectrofotometria. Para o ensaio foram adicionadas 2×10^4 células das linhagens de LMA e 8×10^4 células das linhagens de LLA em cada poço, em uma placa para cultura de células de 96 poços. Em seguida, a cada célula foi adicionado um dos seguintes compostos, avaliados em diferentes concentrações por diluição seriada: daunorrubicina, idarrubicina ou doxorrubicina: 0,013 – 15 μM , VP-16 (0,05 μM – 12,8 μM), LQB-118 ou LQB-223 (0,78 μM – 100 μM) e AP (0,62 μM – 30 μM). O DMSO foi adicionado na mesma concentração presente na condição com a menor diluição de cada composto avaliado, simulando a concentração máxima de DMSO utilizada como veículo no experimento. Também foi utilizado como controle negativo, somente células e meio de cultura, sem nenhum composto, para avaliar a condição de viabilidade das células sem tratamento. O volume final foi de 200 μL por poço. Cada condição no experimento foi feita em quatro replicatas e em seguida as placas foram mantidas em estufa a 37 °C contendo 5% CO_2 pelo período de 24, 48 e 72 h. Posteriormente, faltando três horas para finalizar o período de incubação estabelecido, foi adicionado a cada poço 20 μL de MTT (10 μg /ml em PBS pH 7,4) e as placas retornaram para a estufa, abrigadas da luz, pelas três horas restantes. Após a finalização do tempo de incubação, as placas foram centrifugadas por 5 minutos a 500 g sob temperatura ambiente e vertidas rapidamente, a fim de retirar o volume do sobrenadante. Os cristais de formazana foram então solubilizados com adição de 150 μL de DMSO. Por fim, as placas de 96 poços foram analisadas em espectrofotômetro (EZ Read 400, Biochrom) e as densidades óticas foram mensuradas no comprimento de onda de 570nm. A porcentagem de células viáveis foi calculada pela seguinte equação: [(Absorbância das células tratadas / Absorbância das células não tratadas) x 100]. Os resultados finais foram obtidos através da média de três experimentos independentes.

Ao final dos experimentos de viabilidade celular, as concentrações dos compostos escolhidos para os ensaios de morte celular e análise do perfil do ciclo celular foram geradas através do cálculo dos valores de IC50, feitos por regressão não linear logística.

4.7 Avaliação da proliferação celular através de exclusão por azul de tripan

Além do ensaio de viabilidade celular por MTT também foi realizada a metodologia de exclusão por Azul de Tripan a fim de comparar a densidade e proliferação celular das linhagens leucêmicas parentais e resistentes ao VP-16 submetidas ao tratamento com este fármaco.

As células U937-R e CEM-R mantidas com VP-16 (0,1 – 2 μM) durante o desenvolvimento da resistência foram avaliadas quanto a taxa proliferativa durante 24, 48 e 72 h. Para tanto, foi adicionado azul de tripan (4mg/mL) às células que foram contadas em microscópio ótico utilizando uma câmara de Neubauer. As células azuis, que perderam a integridade da membrana plástica, permitindo a entrada do corante, caracterizam as células mortas. As células não coradas foram consideradas células viáveis. A porcentagem de células vivas foi calculada em relação ao controle, o qual foi considerado 100%. E a quantidade de células mortas foi calculada em relação ao total de células (vivas e mortas) presentes em cada condição.

4.8 Extração de RNA, miRNA e síntese de cDNA

O RNA total das linhagens de leucemias agudas parentais ou resistentes foi extraído utilizando o método por Trizol™ (Invitrogen). Para tanto foi adicionado PBS a uma suspensão de 5×10^6 células/mL, seguido de centrifugação por 5 min a 500 g e adição de 1 mL de Trizol ao pellet. As amostras foram, então, armazenadas em freezer a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ até seu processamento, quando foram incubadas previamente por 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado a essas amostras 200 μL de clorofórmio para cada mililitro de Trizol, seguido por agitação vigorosa do *ependorf* por alguns segundos e incubação do mesmo por 3 minutos a $30\text{ }^\circ\text{C}$. A amostra foi, então, centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$ e após essa etapa a fase aquosa contendo o RNA (sobrenadante) foi cuidadosamente retirada para evitar contaminação com DNA, e transferida para outro tubo. O RNA foi, então, precipitado pela adição de 500 μL de isopropanol, seguido de incubação por 10 minutos a $30\text{ }^\circ\text{C}$ e nova centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida foi adicionado 1 mL de etanol 75% ao pellet e a amostra foi, então, misturada sob forte agitação no vórtex, seguido de centrifugação a 7.500 g por 5 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco em estufa a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por aproximadamente 10 minutos, até que o pellet estivesse quase totalmente seco. Por fim, o RNA foi dissolvido em 30

μL água milli-Q autoclavada, desnaturado a 60 °C por 10 minutos e armazenado no freezer a -80 °C. Previamente a sua utilização o RNA foi quantificado por espectrofotometria no NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) observando-se a razão das absorvâncias obtidas nas densidades ópticas a 260 e 280 nm, sendo esperado valores próximos a 2 para um RNA com boa qualidade e uma razão 260/230 inferior a 1 para um RNA puro, livre de contaminantes como fenol (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987).

Em seguida foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA) específico para cada alvo mediante a utilização do Kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems®) com primers específicos para as sequências dos miRNAs avaliados e a partir de 100 ng de RNA. A reação foi feita de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando o termociclador (Peltier Thermal Cycler (PTC-100) BioRad) com as seguintes condições: 30 minutos a 16°C, seguido de 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C e 4°C ∞ . Ao término da reação, a amostra foi armazenada a -20°C.

4.9 Avaliação da expressão de microRNAs

A análise da expressão dos microRNAs foi realizada por PCR em tempo real (*Real Time Polymerase Chain Reaction*) pelo método TaqMan descrito em 1991 (HOLLAND *et al.*, 1991). As sondas utilizadas foram hsa-miR-23a, hsa-miR-143, hsa-miR-485-3pe RNU6b (endógeno utilizado como controle da expressão basal) (TaqMan® MicroRNA Assay). As sondas adquiridas apresentam fluorocromo reporter 6-FAM (6-carboxilfluoresceína) ligado à sua porção 5' e um *quencher* não fluorescente na sua porção 3' para detecção da sequência de interesse (concentração final de 250 nM). Além das sondas, para a reação de PCR também é adicionado à solução *Master Mix* (TaqMan 2x *Universal PCR Master Mix*), a enzima DNA polimerase (Applied Biosystems) e o cDNA previamente sintetizado.

Durante a reação de PCR, a sonda TaqMan (marcada com 6-FAM) se liga de forma específica à sequência complementar e é então clivada pela atividade 5' nuclease da DNA polimerase que só atua nas sondas já hibridizadas com o alvo. A clivagem separa o fluorocromo reporter do *quencher*, resultando em aumento da fluorescência emitida pelo reporter, uma vez que antes de ser clivada, o fluorocromo reporter e o *quencher* encontram-se próximos um ao outro, levando a supressão da

fluorescência primária. Logo, o aumento do sinal de fluorescência ocorre apenas após a hibridização da sonda à sequência alvo no cDNA, seguido de sua clivagem. Dessa forma, não há detecção de ligações inespecífica (BUSTIN, 2002).

A reação foi otimizada, contendo volume final de 10 µL por poço, incluindo 0,5 µL de sonda (20X TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems), 5 µL de Master Mix (2X TaqMan Universal Mix), 2 µL de cDNA. Após a mistura homogênea dos reagentes, estes foram distribuídos em placa de 45 poços, em seguida esta foi vedada com adesivo próprio (Applied Biosystems) e submetida ao termociclador StepOne™ Real-Time PCR System, (Applied Biosystems) para início da reação (10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto). Ao término dos ciclos, os valores de CT (*Cycle Threshold*) foram exportados para uma planilha do Excel e analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Esses valores de CT indicam o número fracionário de ciclos nos quais a quantidade de alvo amplificado ultrapassa um limiar fixado (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A análise da expressão relativa dos microRNAs avaliados foi, então, realizada através da comparação dos valores encontrados na linhagem resistente *versus* a linhagem parental.

4.10 Extração e eletroforese de proteínas

Para a análise da expressão proteica, inicialmente foi realizada a lise celular através da ruptura da membrana plasmática por choque térmico e agitação vigorosa em vórtex. Para esse procedimento cada amostra teve seu conteúdo proteico extraído com a utilização de 30 - 60 µL de tampão *Cell Extraction Buffer* (Invitrogen), com adição de inibidores de fosfatase e protease (1:1), para cada pellet de células, conforme as instruções do fabricante. Em seguida, as amostras foram submetidas a centrifugação e o sobrenadante contendo as proteínas foi armazenado a -20°C. Posteriormente, as proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry utilizando o kit de dosagem de proteínas *DC™ (detergent compatible) Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, Inc). Após a quantificação proteica, foi adicionado 15 µL de tampão de amostra (0,06 M de Tris-HCl, pH 6,8; SDS 2%, glicerol 10%, 0,025% de azul de bromofenol e 200 mM de β-mercaptoetanol) a 25 - 50 µg de proteína de cada amostra. Essa solução foi homogeneizada e aquecida por 5 minutos a 95 °C, a fim de romper as pontes dissulfeto e desnaturar as proteínas, desfazendo a estrutura tridimensional delas. Em seguida essas amostras foram submetidas à eletroforese unidimensional segundo protocolo de SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Poliacrylamide Gel

Electrophoresis) descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970). Para a resolução de proteínas de diferentes pesos moleculares, foram utilizados géis de poliacrilamida variando de 8 – 15% (gel de resolução; resolving gel), cuja trama apresenta poros maiores (menor porcentagem de acrilamida) ou menores (maior porcentagem de acrilamida) o que possibilita a separação das proteínas de acordo com o seu peso molecular. Após a polimerização do gel de resolução foi adicionado o gel de empilhamento (stacking gel) e em seguida foi colocado um pente para formação dos poços para aplicação das amostras neste gel. Após a completa polimerização (aproximadamente 30 minutos), as amostras foram aplicadas no gel e submetidas a migração eletroforética a 100 V constantes por 1:30h. em um tampão contendo 0,025 M de Tris, 0,0192 M de glicina, SDS 0,1% (p/v), pH 8,3. O padrão de peso molecular utilizado para referência do tamanho das proteínas foi o Rainbow (Amersham Biosystems / GE Healthcare).

4.11 Avaliação da expressão proteica por *Western Blot*

Após eletroforese, as bandas proteicas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond™ECL, (Amersham Biosciences) utilizando-se tampão contendo Tris 25 mM, Glicina 193 mM e 20 % de metanol em uma cuba de transferência úmida a 100 V por 3 h. Após a transferência, as membranas foram coradas com Vermelho de Ponceau (Ponceau S 50mg, Ácido Acético glacial 5%, água Milli-Q q.s.p. 50 mL), para verificar se a transferência foi eficiente.

Após lavagem com TBST (tampão TBS + Tween 20) a membrana foi incubada por 1 h com uma solução contendo TBST e 5% de leite em pó desnatado à temperatura ambiente sob agitação leve e depois lavada em tampão TBST por 1 minuto. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos: AKT (1:1000, Cell Signaling), AKT-1 (1:1000, Cell Signaling), AKT-2 (1:1000, Cell Signaling), Topo I (1:500, Sigma-Aldrich), Topo II α (1:500, Invitrogen), Topo II β (1:500, Invitrogen), HSC70 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), e β -actina (1:3000, Sigma-Aldrich), diluídos em TBST leite 5% overnight a 4°C. Após incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos cada, em TBST sob agitação leve em temperatura ambiente e incubada com os respectivos anticorpos secundários diluídos em TBST 5% de leite por 1 h à temperatura ambiente, sob agitação suave, e seguida por três lavagens de 10 minutos cada em TBST. Os complexos proteína-anticorpo foram visualizados utilizando o kit ECL Prime Detection

System (Amershan Biosciences), de acordo com as especificações do fabricante. As membranas foram então escaneadas utilizando C-Digit™ Blot Scanner e as imagens foram geradas utilizando Image Studio Lite software (Li-cor Biosciences).

4.12 Detecção do perfil de expressão das proteínas transportadoras de efluxo

Para detecção da proteína transportadora de efluxo Pgp 5×10^5 células foram submetidas à incubação por 15 minutos com solução de bloqueio contendo 2% de SFB seguida por centrifugação durante 5 minutos a 500 g. O pellet celular foi, então, incubado com 2,5 μ L de anticorpo anti-Pgp (clone UIC2) por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado solução PBS contendo 2% de albumina do soro bovino (BSA) às células que foram centrifugadas em seguida, com repetição desse processo por duas vezes antes de finalizar o protocolo com a fixação das células com 500 μ L de formaldeído 1%. Por fim, a aquisição das células foi feita utilizando o citômetro de fluxo Cyan ADP (Dako Colorado, Inc., Fort Collins, USA) e a análise foi feita pelo programa Summit v4.3 (Dako, USA). Para a detecção da expressão da Pgp, foi feito o cálculo da razão entre a média de intensidade de fluorescência (RIF) da amostra imunomarcada sobre RIF da amostra controle, sem imunomarcção com anticorpo, a fim de excluir da análise a autofluorescência da célula (HUET *et al.*, 1998). Valores de RIF iguais ou superiores a 1,1 foram considerados positivos para a expressão das proteínas MDR (SILVA *et al.*, 2003).

4.13 Avaliação da atividade das proteínas transportadoras de efluxo

A atividade das proteínas transportadoras de efluxo Pgp e BCRP foi avaliada por citometria de fluxo através do ensaio de extrusão celular dos corantes fluorescentes Rodamina-123 (Rho-123; Sigma, St. Louis, USA) para Pgp e *Pheophorbide A* (PhA; Fisher Scientific, USA) para BCRP, conforme protocolo descrito previamente em um trabalho do nosso grupo (VASCONCELOS *et al.*, 2013).

Brevemente, para estes ensaios 5×10^5 células das linhagens de leucemias agudas foram expostas por 45 minutos a 37°C aos corantes fluorescentes (Rho-123 ou PhA) na presença ou ausência (controle negativo) de agentes moduladores (BECK *et al.*, 1996; LEBEDEVA; PANDE; PATTON, 2011). Foram usados como moduladores das proteínas transportadoras de efluxo a ciclosporina A (CSA; Novartis, Suíça) que

modula diferentes proteínas transportadoras, tais como: Pgp, MRP-1 e BCRP (QADIR *et al.*, 2005), o verapamil (VRP), um bloqueador de canais de cálcio que se liga à Pgp, inibindo competitivamente a ligação de fármacos citotóxicos à essa molécula (CORNWELL; PASTAN; GOTTESMAN, 1987) e o Fumitremorgin C (FTC; Sigma, St. Louis, USA), um produto natural - uma toxina fúngica, que inibe especificamente ABCG2/BCRP (RABINDRAN *et al.*, 2000). Ao término do período de incubação foi adicionado PBS às células que foram em seguida submetidas à centrifugação por 5 minutos a 500 g. Ao pellet foi adicionado meio de cultura contendo (ou não) CSA, VRP ou FTC. As células foram, então, novamente incubadas a 37°C por 45 minutos e em seguida foram analisadas no citômetro de fluxo.

O padrão de autofluorescência celular foi definido com utilização das células sem os corantes fluorescentes e sem os moduladores. Os resultados da avaliação de Pgp funcional foram expressos como a razão das médias de intensidade de fluorescência das células com o corante fluorescente Rho-123 e adição dos agentes moduladores CSA ou VRP sobre RIF das células somente com Rho-123. A detecção de BCRP funcional foi feita de maneira semelhante, mediante o cálculo da razão de RIF das células com PhA e adição de FTC sobre RIF das células somente com PhA. Dessa forma, o aumento da fluorescência emitida pelos fluorocromos Rho-123 ou PhA mantidos no interior da célula devido à inibição das bombas de efluxo pelos moduladores VRP, CSA ou FTC leva a um deslocamento do pico de fluorescência para a direita no gráfico e um aumento dos valores de RIF quando comparados com os valores gerados só com os fluorocromos, na ausência dos moduladores.

Assim como no ensaio para avaliação da expressão de Pgp, valores de RIF iguais ou superiores a 1,1 também foram considerados positivos neste ensaio para detecção das proteínas MDR funcionais.

4.14 Análise do ciclo celular e fragmentação do DNA

A avaliação do perfil do ciclo celular foi feita pela análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo após o tratamento das células com os compostos avaliados. Para tanto, 1×10^6 células foram incubadas com diferentes concentrações de AP (12,5 e 15 μ M), LQB-118 e LQB-223 (ambos nas concentrações de 1,5; 3 e 6 μ M) por 48 h

nas linhagens de LMA e 24 h nas linhagens de LLA. Ao término do período de tratamento as células foram lavadas com PBS, submetidas à centrifugação por 5 minutos a 500 g e transferidas para os tubos específicos para análises no citômetro de fluxo. Em seguida, as células foram submetidas a uma nova etapa de lavagem com PBS e centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi incubado por 15 minutos, protegido da luz e à temperatura ambiente, com uma solução contendo 500 µL de ribonuclease A (RNase) 100 µg/ml diluída em tampão citrato 40 mM e 500 µl de iodeto de propídeo (PI) 50 µg/ml diluído em tampão citrato 4 mM e Triton X-100 0,3%. Posteriormente, foi feita a aquisição de 10.000 eventos por amostra no citômetro de fluxo (FACSCALIBUR, BD), no canal FL3 para avaliação do conteúdo de DNA. O programa Summit v4.3 foi utilizado para analisar a distribuição das fases sub-G0/G1, G0/G1, S e G2/M ao longo do ciclo celular. A fragmentação do DNA induzida pelos compostos LQB-118, LQB-223 e AP foi quantificada pela porcentagem de células na fase sub-G0/G1.

4.15 Ensaio de morte celular

A taxa de morte celular foi avaliada pelo ensaio de marcação com anexina V/PI (Genzyme Diagnostics, Cambridge, MA, USA). A anexina V é uma proteína capaz de se ligar a fosfatidilserina (FS), um fosfolípido da membrana plasmática (MP) que em condições fisiológicas é encontrado na face interna desta. No entanto, durante o estímulo apoptótico há a inversão da FS para a face externa da MP (VERMES *et al.*, 1995). Como a anexina V não é permeável à membrana plasmática das células viáveis, a ligação da anexina V na FS só ocorre na face externa da MP e por isso essa ligação é correlacionada ao fenômeno de apoptose. Com a finalidade de avaliar o efeito dos novos compostos na indução de morte celular utilizou-se a anexina V conjugada com *fluorescein isothiocyanate* (FITC; *Apoptosis Detection Kit – Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA*) e a análise foi feita em citômetro de fluxo. Neste ensaio, células com a MP íntegra, ou seja, sem rupturas, não apresentam marcação pelo fluorocromo. Entretanto, nas células apoptóticas, cuja integridade de membrana foi comprometida, a anexina V pode marcar tanto a FS expressa na face externa (característica de apoptose inicial), quanto àquela presente na face interna da MP (característica de apoptose tardia). Para separar estas populações de células utilizou-se o PI a 50 µg/mL (Sigma), um marcador de ácidos nucléicos. Desta forma, células vivas não apresentam marcação para anexina V e PI; células em apoptose inicial

apresentam marcação apenas para anexina V; células em apoptose tardia apresentam marcação tanto para anexina V quanto para PI; e células em necrose apresentam marcação somente para PI (VERMES *et al.*, 1995). Para este ensaio 2×10^6 células foram incubadas com diferentes concentrações de AP (12,5; 15,0 e 20 μM), LQB-118 e LQB-223 (ambos nas concentrações de 1,5, 3 e 6 μM) por 48 h nas linhagens de LMA e 24 h nas linhagens de LLA. Após este período, as células foram lavadas com PBS e submetidas a centrifugação por 5 minutos a 500 g, à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi incubado por 15 minutos, na ausência de luz e em temperatura ambiente, com uma solução contendo 10 μL de tampão de ligação 10X (*Apoptosis Detection Kit*), 0,5 μL de anexina V-FITC e 79,5 μL de água deionizada. Posteriormente, adicionou-se 300 μL de tampão de ligação 1X (*Apoptosis Detection Kit*) e imediatamente antes da leitura no citômetro de fluxo adicionou-se 10 μL de PI. Por fim, foi feita a aquisição de 10.000 eventos por amostra e a leitura foi efetuada nos canais FL-1 (530 m) para a anexina V e FL-3 (para o PI) e os dados foram avaliados pelo programa Summit v4.3.

4.16 Estudos de Inibição das enzimas hTopo I e hTopo II α

A avaliação da atividade dos compostos AP e LQBs foi realizada empregando-se os ensaios de relaxamento do DNA pela enzima hTopo I ou hTopo II α . Para estes ensaios foram obtidos na Sigma-Aldrich, Inc (St. Louis, MO) os seguintes materiais: enzimas recombinantes (hTopo I e hTopo II α), DNAs plasmidiais superenovelados (pBR322 e pRYG), proteinase K de *Tritirachium album* (que foi dissolvida em água livre de DNase), os controles positivos de inibição (camptotecinae etoposídeo; liofilizados) e 10% SDS. Os tampões de amostra para eletroforese em gel de agarose 10X (0,25% de azul de bromofenol; 50% de glicerol), o tampão de relaxamento da Topo I (TGS 10X: 0,01 M Tris-HCl - pH 7,9; 0,001 M EDTA; 0,15 M NaCl; 0,1% BSA; 0,0001 M espermidina e 5% glicerol), o tampão de relaxamento da Topo II α 10X (0,5 M Tris-HCl – pH 8; 1,5 M NaCl; 0,1 M MgCl₂; 0,005 M DTT; 300 μg BSA/mL; 0,02 M ATP) e o tampão TAE 1X utilizados nos ensaios de eletroforese em gel de agarose foram preparados no laboratório previamente à realização dos ensaios. Este ensaio é baseado na transformação de um substrato de DNA plasmidial superenovelado em uma população de produtos relaxados pela atividade catalítica das enzimas topoisomerases. Apesar de idênticos na sequência de nucleotídeos e no peso molecular, a natureza compacta do DNA superenovelado e seus topoisômeros

relaxados são facilmente distinguidos através de eletroforese em gel de agarose. O sistema de análise se baseou na observação dos produtos da reação das enzimas topoisomerasas sobre plasmídeos (DNA fita dupla circular e superenovelado), na presença ou não dos compostos sob avaliação, conforme descrito previamente (NEVES *et al.*, 2013). De acordo com o padrão de migração e intensidade das bandas resultantes no gel, foi possível avaliar a atividade dos compostos testados (Esquema 4.1, gel sem BrEtd).

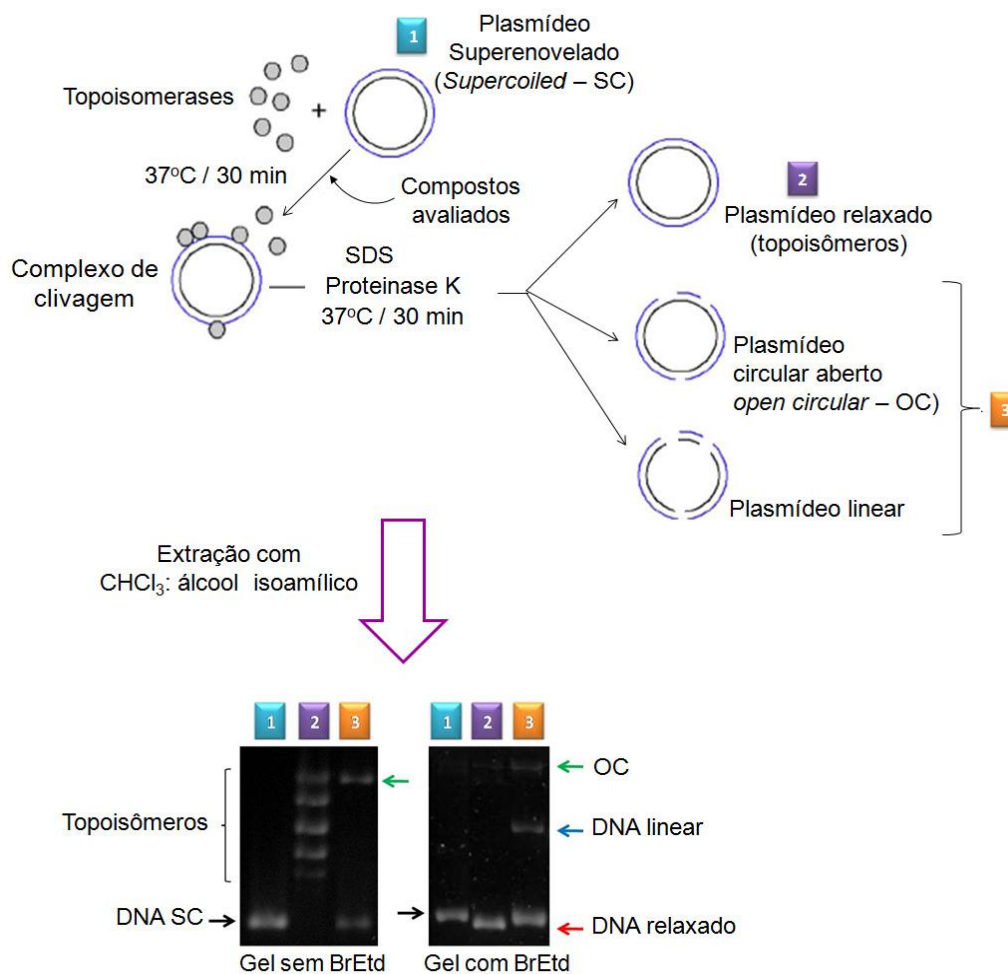
Para a triagem inicial, as substâncias foram testadas na concentração de 1 mM. Essa concentração foi escolhida com base na concentração efetiva dos padrões CPT e VP-16 recomendado pela TopoGen. Em seguida, os compostos que demonstraram atividade foram avaliados em concentrações até dez vezes menores (0,1 mM) a fim de verificar sua potência.

Para garantir que o DMSO não interferisse no experimento, diferentes concentrações desses solventes foram testadas, mostrando nenhuma interferência na função das enzimas em um intervalo de concentração de 0-10%.

A ordem de adição dos reagentes no ensaio foi: tampão de relaxação, composto testado, hTopo I ou hTopo II α e por fim, DNA plasmidial. Os compostos foram incubados com 200 ng do DNA plasmidial superenovelado (pBR322 para o ensaio com hTopo I e pRYG para o ensaio com hTopo II α), com as enzimas hTopo I ou hTopo II α humana (quantidade suficiente para relaxar completamente o substrato, usualmente 0,2 – 2 unidades) e tampão de relaxamento TGS 1X (volume final de 20 μ L) por 30 minutos a 37 °C. A CPT e o VP-16 foram usados como controles positivos da inibição das enzimas hTopo I e hTopo II α , respectivamente. As reações foram terminadas pela adição de SDS, numa concentração final de 1%, seguida pela adição de proteinase K (concentração final de 50 μ g/ml) e incubação a 37 °C por 30 minutos. O SDS facilita a captura do complexo de clivagem, enquanto que a protease digere as proteínas ligadas ao DNA. Em seguida, foi adicionado 2 μ L de tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose 10X seguido pela extração do DNA com 24:1 clorofórmio: álcool isoamílico (CIA). As amostras foram imediatamente submetidas ao vortex, centrifugadas e a fase aquosa azul, contendo o DNA, foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% sem adição de brometo de etídio (Br.Etd). A ausência do agente intercalador Br.Etd facilita a verificação da atividade das enzimas topoisomerasas, sendo possível a observação dos topoisômeros relaxados, já que os isômeros de DNA relaxados migram mais vagarosamente do que a forma de DNA superenovelada, além da separação do plasmídeo superenovelado do plasmídeo

completamente relaxado. Por fim, o produto da reação foi resolvido em gel de agarose 1% mediante a migração eletroforética por cerca de 16 h a 30V em temperatura ambiente (cerca de 25 °C), em tampão TAE. Os géis foram fotografados sob iluminação ultra-violeta após serem corados com Br.Etd (0,5µg/mL) por 30 minutos.

A potência de inibição dos compostos sobre as topoisomerases foi obtida através da comparação da intensidade das bandas de DNA superenovelado e relaxado entre as amostras e os controles (NEVES *et al.*, 2013).



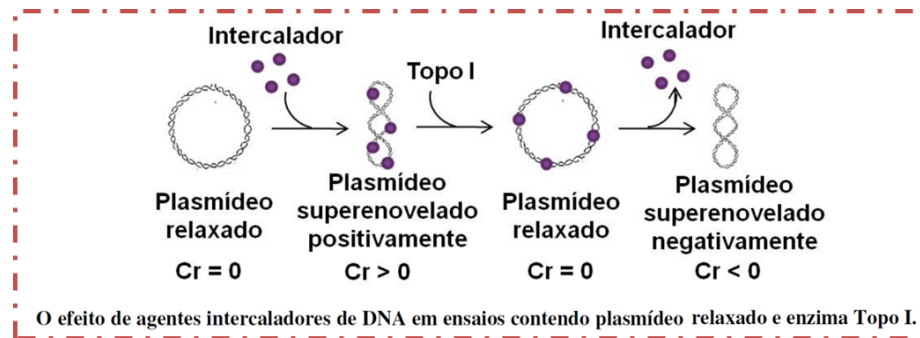
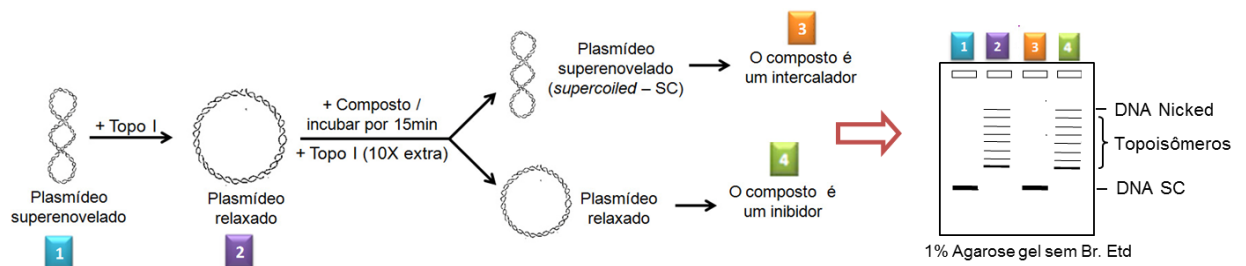
Esquema 4.1: Protocolo experimental usado na identificação de inibidores de topoisomerases. Adaptado de: SOE; HARTUNG; GROSSE, 2006.

4.17 Caracterização do mecanismo molecular de inibição das topoisomerases

4.17.1 Avaliação do potencial de intercalação dos compostos

Compostos que provocam a abertura do DNA alteram suas propriedades topológicas e, conseqüentemente a distribuição gaussiana dos topoisômeros, é afetada. Essa pode ser observada ao final do experimento e avaliada através de eletroforese em géis de agarose.

Para determinar se um composto particular induz a abertura do DNA, característica de intercaladores de DNA, foi seguida a metodologia usada por WEBB & EBELER, 2003. Neste ensaio foi adicionado ao plasmídeo relaxado (preparado como descrito na seção anterior) ou ao superenovelado (controle para a reação de *unwinding*) os diferentes compostos testados ou os controles de inibição (CPT e VP-16) e de intercalação do DNA (Br.Etd.), em um volume final de 20 μ L. As amostras foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente (cerca de 25°C), em seguida adicionou-se 2 – 6 unidades de topoisomerase (10x a quantidade usada no ensaio de relaxamento do DNA) à reação que foi submetida à nova incubação de 30 minutos a 37 °C. A reação foi terminada através da adição de SDS e proteinase K, seguida pela extração do DNA com CIA, conforme detalhado na seção anterior. As amostras foram, então, analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% sem Br.Etd no gel (Esquema 4.2).



Esquema do ensaio *unwinding* utilizado para diferenciar inibidores de intercaladores de DNA.

Esquema 4.2: Protocolo experimental usado para diferenciar inibidores de topoisomerasas de intercaladores de DNA. Adaptado de: PALCHAUDHURI & HERGENROTHER, 2007.

4.17.2 Caracterização do tipo de inibição – *poison* ou catalítica

O tipo de inibição dos compostos sobre as enzimas topoisomerasas foi avaliado através do ensaio de clivagem da fita dupla do DNA plasmidial.

O ensaio foi realizado como descrito na sessão 4.16, no entanto, os produtos de clivagem do DNA gerados pela ação de inibidores do tipo *poison* sobre as topoisomerasas foram resolvidos através de eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5 µg/mL Br.Etd. A presença do Br.Etd durante a corrida eletroforética leva a uma mudança topológica do DNA, possibilitando a visualização dos produtos de clivagem (DNA nicked, no caso da reação com hTopo I ou DNA linear, no caso da reação com hTopo IIα) separados das formas de DNA fechadas (circular relaxado e circular superenovelado) que são gerados por inibidores do tipo *poison* que aprisionam o complexo de clivagem formado pela enzima associada ao DNA.

Os géis foram submetidos à migração eletroforética por cerca de 16h a 1V/cm, em tampão TAE 1X com adição de 0,5 µg/mL de Br.Etd (Esquema 4.1, gel com BrEtd).

4.18 Análises por biologia computacional da interação dos novos compostos (LQBs e AP) com as enzimas hTopo I e hTopo II α

A avaliação computacional da interação do AP e dos LQBs com as topoisomerasas foi realizada em colaboração com o Grupo de Biofísica e Modelagem Molecular, PROCC, FIOCRUZ, RJ.

A estrutura 3D da enzima hTopo II α completa, foi construída a partir de dois monômeros dessa enzima depositados no PDB utilizando-se os parâmetros padrões do programa Modeller versão 9.12. O primeiro monômero corresponde ao domínio ATPase da hTopo II α (código PDB 1ZXN, resolução de 2,51Å) (WEI *et al.*, 2005), variando de Ser29 a Leu394, de acordo com a sequência dessa proteína depositada sob o número P11388 do UniProt (*Universal Protein Resource*) (BATERMAN *et al.*, 2015). O segundo monômero corresponde a uma parte da estrutura da hTopo II α ligada ao DNA (resíduos Asn433 a Gln1190) (código PDB 4FM9, resolução de 2,90 Å) (WENDORFF *et al.*, 2012). O modelo gerado pelo programa Modeller com valores mínimos de DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*) foi submetido a refinamento automático usando o servidor 3D refine (BHATTACHARYA; CHENG, 2013) para otimizar os resíduos das cadeias laterais.

Após a construção do modelo, foi realizada sua validação e a qualidade a fim de determinar a sua utilidade. A qualidade estereoquímica foi avaliada através do gráfico de Ramachandran, produzido pelo servidor RAMPAGE (LOVELL *et al.*, 2003). A validação da estrutura tridimensional da proteína, buscando identificar possíveis erros associados ao procedimento de modelagem, foi analisada através do gráfico Errat obtido pelo servidor SAVES (*the Structure Analysis and Verification Server*) (EISENBERG; LÜTHY; BOWIE, 1997; WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

4.18.1 Docking Molecular

A metodologia *docking* é utilizada para avaliar a conformação e orientação de um ligante no receptor alvo, possibilitando estimar a atividade de um ligante (FERREIRA *et al.*, 2015).

Os ensaios de *docking* molecular foram feitos no programa DOCKTHOR que utiliza a estratégia de algoritmo genético como método de busca conformacional (DE MAGALHÃES *et al.*, 2014).

Os algoritmos genéticos foram criados levando-se em consideração a teoria evolucionária de Darwin. Nessa estratégia, cada busca da melhor conformação se baseia na geração de uma população de indivíduos. Cada indivíduo equivale a uma possível solução para o problema de *docking*, que é a conformação do ligante em relação ao receptor alvo. Desta forma, cada conformação do ligante equivale a um cromossomo. Esses são formados por genes que são equivalentes aos graus de liberdade translacional, orientacional e conformacional. Esses indivíduos são avaliados por duas energias, a energia de interação entre a proteína e o ligante (complexo macromolecular), e a energia intramolecular do ligante (HEBERLÉ; DE AZEVEDO, 2011). Posteriormente, é feita uma busca aleatória pelo método desenvolvido por SOLIS & WETS, 1981 a fim de minimizar a energia do melhor indivíduo em cada geração.

A estrutura da enzima hTopo II β complexada ao DNA e ao ligante etoposídeo (EVP) (código PDB 3QX3, resolução de 2,16Å) (WU *et al.*, 2011) foi utilizada como referência para a configuração dos parâmetros a serem usados nos cálculos de *redocking* por apresentar as maiores identidades sequenciais com a enzima hTopo II α . Nesse estudo o ligante é ancorado na conformação da proteína com a qual ele foi co-cristalizado.

Para os cálculos com a enzima hTopo I foi utilizada a estrutura da enzima complexada ao ligante *poison* topotecano (TTC) (código PDB 1K4T, resolução de 2,1 Å) (STAKER *et al.*, 2002).

Os cálculos de *redocking* com EVP foram realizados com as estruturas 4FM9 e 3QX3 do PDB a fim de determinar os melhores parâmetros a serem utilizados nos cálculos de *docking* nas enzimas hTopo II α e hTopoII β , respectivamente. Para a enzima hTopo I, o *redocking* foi feito com TTC utilizando a estrutura 1ZXN do PDB.

Os cálculos de *docking* foram executados em uma grade cúbica de tamanho de 15 Å centrado no ligante EVP e 10 Å centrado no ligante TTC. O fragmento de DNA e o íon magnésio (Mg⁺²) foram incluídos como cofatores. O espaçamento considerado entre os pontos da grade foi de 0,25 Å. O número de avaliação, o tamanho da população, o número de execuções e o espaçamento da grade foram considerados como padrão, a menos que especificado de outra forma.

Os cálculos computacionais foram realizados utilizando-se três abordagens diferentes. Na primeira, as moléculas AP, LQB-118 e LQB223 foram ancoradas no sítio de ligação dos inibidores *poisons* (TTC ou EVP) nas topoisomerasas I, II α ou II β . Para a topoisomerase II α , a localização do sítio de ligação foi feita com base na

sobreposição de ambas as estruturas (Topo II α e Topo II β), devido à semelhança estrutural entre estas duas isoformas e o fato da estrutura experimental disponível de Topo II β apresentar o EVP ligado a ela e ao DNA (modelo 3QX3 do PDB). Esse procedimento foi feito para verificar se os compostos AP, LQB-118 e LQB223 podem se ligar no mesmo sítio de ligação que aos inibidores *poisons*. Na segunda abordagem, os ligantes foram ancorados sem especificação de um local de ligação exato, mas considerando todas as cavidades da proteína hTopo I, II α ou II β (*docking* cego). Esse procedimento foi realizado a fim de detectar locais de ligação plausíveis nas enzimas topoisomerasas. Na terceira abordagem, os ligantes foram ancorados no sítio de ligação da hTopo II α ao ATP (código PDB1ZXM) (WEI *et al.*, 2005).

Os ligantes AP, LQB-118 e LQB-223 foram construídos utilizando o software Avogadro (HANWELL *et al.* 2012) e a otimização da geometria dos compostos foi feita com os parâmetros padrões desse mesmo software.

4.19 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 5.0 utilizando o teste ANOVA, seguido pelo pós-teste Bonferroni. Os valores de p foram calculados em um intervalo de confiança de 95% e os valores menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Quanto menor o valor de p , maior o número de asterísticos e maior o poder estatístico, sendo representado da seguinte forma nos gráficos: $p < 0,05$: *; $p < 0,01$: **; $p < 0,001$: ***.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar a compreensão e discussão dos resultados, esta seção foi separada em três partes independentes. Estas são referentes aos resultados obtidos: (I) na avaliação biológica (atividade antitumoral) bioquímica e por biologia computacional da inibição das topoisomerasas pelos novos compostos; (II) no desenvolvimento de linhagens resistentes ao etoposídeo e (III) na avaliação antineoplásica (incluindo anti-MDR) dos novos compostos sobre as linhagens resistentes.

Parte I: Análise da atividade antitumoral dos novos compostos e avaliação bioquímica e por biologia computacional da interação desses com as enzimas hTopo I e hTopo II α .

5.1 Atividade biológica antitumoral dos novos compostos

5.1.1 Avaliação da viabilidade celular

O efeito citotóxico do AP em células mononucleares de sangue periférico (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) de indivíduos saudáveis foi previamente avaliado pelo nosso grupo e não foram encontradas diferenças significativas entre o índice apoptótico de PBMC do controle e das células PBMC tratadas com AP até 105,5 μ M (50 μ g / mL) (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Nosso grupo também demonstrou que o LQB-118 não causa toxicidade nas células da medula óssea de camundongos C57B1 (NESTAL DE MORAIS *et al.*, 2014) e não é tóxico para as células PBMC (IC₅₀ > 20 μ M, concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50%) (NETTO, *et al.*, 2010). Também demonstramos que LQB-223 não é tóxico em linfócitos murinos (BUARQUE *et al.*, 2014) e nem para as células PBMC humana (IC₅₀ > 30 μ M) (MENDES *et al.*, 2017 (submetido)).

O efeito do AP na LMA foi avaliado mediante a análise por MTT da viabilidade celular das linhagens celulares HL60, Kasumi-1 e U937 tratadas com AP em diferentes concentrações (0,62 – 20 μ M) durante o período de 24, 48 e 72 h. Como pode ser observado na Figura 5.1, os tratamentos resultaram em reduções estatisticamente significativas da viabilidade celular de uma maneira dose-dependente. AP diminuiu a viabilidade celular a partir de 10 μ M nas linhagens HL60 e U937 após 24 h (aproximadamente 40% e 50%, respectivamente). Kasumi-1 foi a linhagem celular

mais resistente ao tratamento com AP, já que a viabilidade celular desta linhagem só diminuiu após a incubação com 20 μ M de AP após 24 h (aproximadamente 65% de redução).

A linhagem Kasumi-1 apresenta o oncogene AML1-ETO e mutações no gene c-kit que podem explicar a maior resistência apresentada por esta linhagem (LARIZZA; MAGNANI; BEGHINI, 2005). Embora a translocação cromossômica t(8; 21) esteja relacionada a um prognóstico favorável e cerca de 90% dos pacientes atingem inicialmente a taxa de resposta completa, cerca de 50% dos pacientes de LMA portadores dessa translocação ativam constitutivamente mutações nos domínios de KIT-quinase que estão associados a maiores taxas de recaída, um perfil mais resistente aos quimioterápicos e uma menor sobrevida global (LARIZZA; MAGNANI; BEGHINI, 2005).

Esses resultados demonstram que o tratamento com AP pode inibir de forma eficaz a viabilidade celular de linhagens de LMA com diferentes fenótipos.

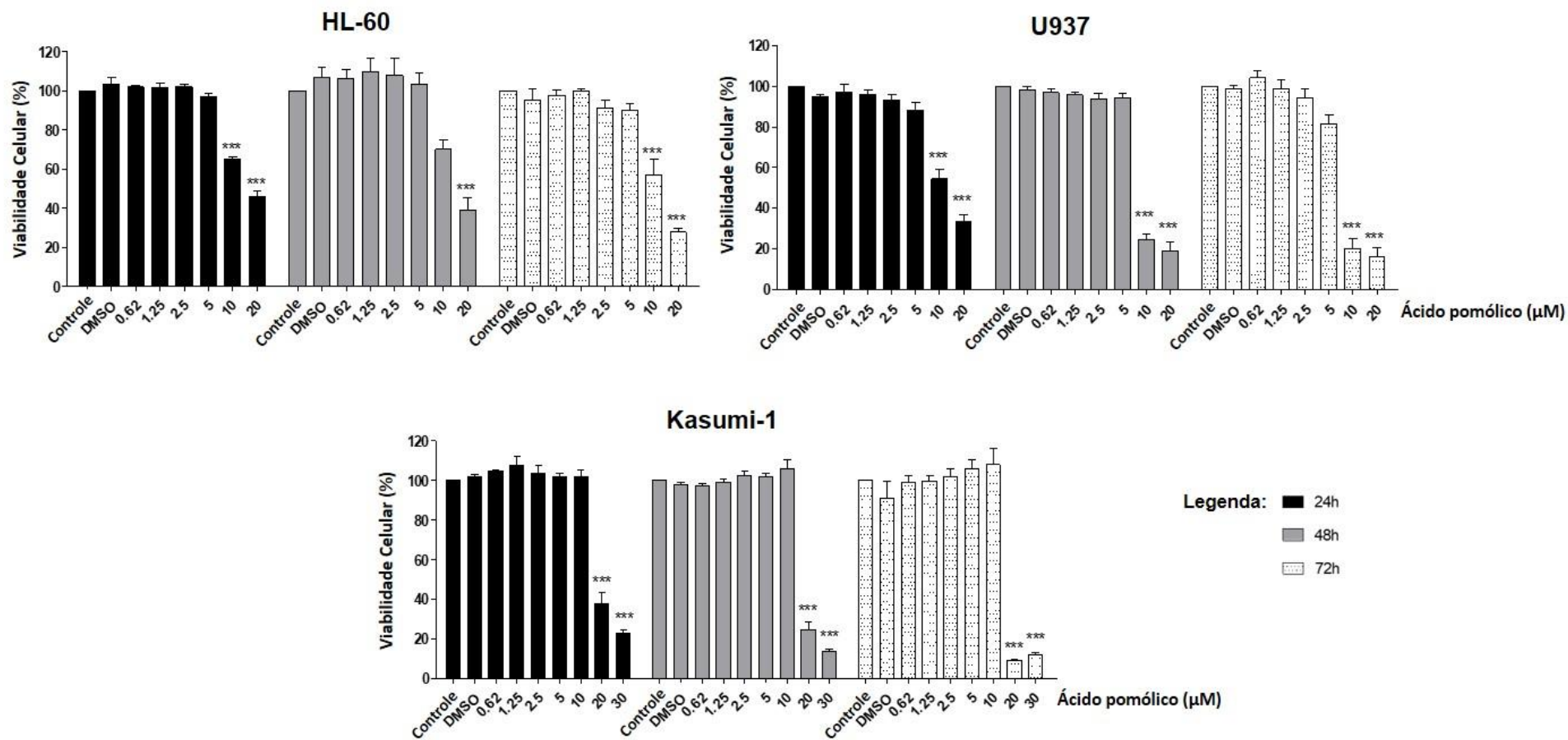


Figura 5.1: Efeito citotóxico do ácido pomólico (AP) na viabilidade celular das linhagens de leucemia mieloide aguda (LMA) HL60, U937 e Kasumi-1 após exposição ao composto em diferentes concentrações por 24, 48 e 72 h. Os gráficos demonstram as médias e os desvios padrão de no mínimo três experimentos independentes. (***) P-valor <0,001).

O efeito citotóxico do AP na LLA, inclusive em células da linhagem celular CCRF-CEM, assim como o efeito citotóxico dos LQBs nas leucemias agudas, já foi avaliado previamente (KUETE *et al.*, 2015; BUARQUE *et al.*, 2014; NESTAL DE MORAIS *et al.*, 2014; DE SOUZA REIS *et al.*, 2013; DE SÁ BACELAR *et al.*, 2013) e, portanto, o efeito do AP na LLA e dos LQBs nas leucemias agudas será avaliado no perfil de resistência na *parte III* deste trabalho.

5.1.2 Avaliação da morte celular

A avaliação da indução de morte celular nas células de LMA após exposição ao AP por 48 h foi realizada por ensaio de marcação com Anexina V/Pi e por quantificação de indução de fragmentação do DNA por citometria de fluxo. Conforme mostrado na Figura 5.2, o tratamento com AP causou um aumento na porcentagem de células marcadas com Anexina V (Anexina V⁺) de forma dose-dependente (valor $P < 0,01$). Aproximadamente 40% das células HL60 tratadas com 12,5 μM de AP foram Anexina V⁺, e 15 μM induziu cerca de 80% de marcação positiva. Perfis semelhantes foram observados nas células U937, nas quais aproximadamente 40% e 60% das células foram Anexina V⁺ após incubação com 12,5 μM e 15 μM , respectivamente. A linhagem celular Kasumi-1 atingiu a maior porcentagem de células Anexina V⁺ com AP 20 μM , resultando em aproximadamente 60% de morte celular.

Além disso, o tratamento com 12,5 e 15 μM de AP induziu cerca de 70% - 80% de fragmentação do DNA após 48 h de incubação nas linhagens HL60 e U937 ($p < 0,001$). Por outro lado, na Kasumi-1 - a linhagem de LMA mais resistente - 20 μM de AP levou a aproximadamente 45% de fragmentação do DNA (Figura 5.3). Em conjunto, esses resultados sugerem que o AP induz apoptose celular em células de LMA que exibem diferentes subtipos.

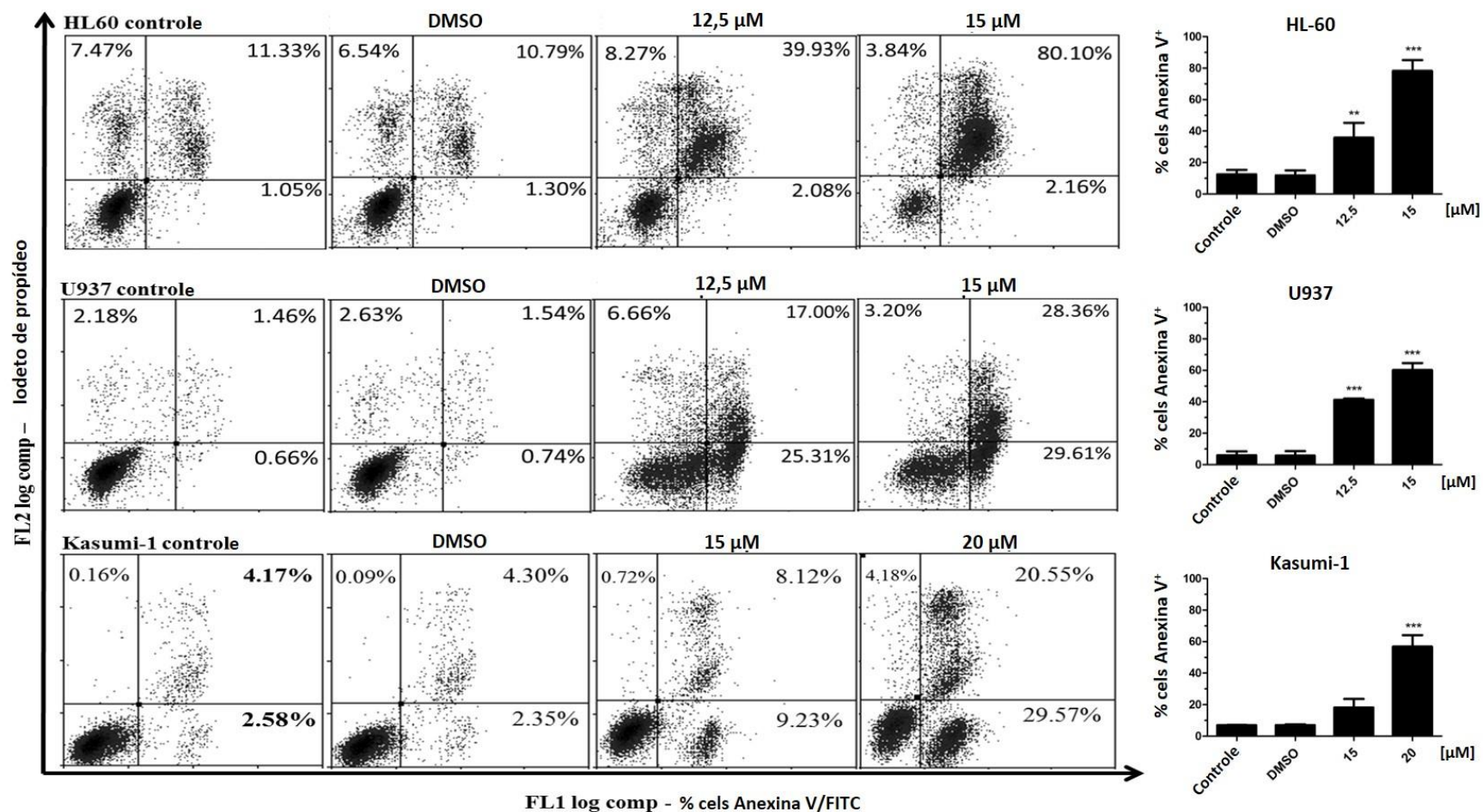


Figura 5.2: Efeito do ácido pomólico (AP) na indução de morte celular nas linhagens de leucemia mielóide aguda (LMA: HL60, U937 e Kasumi-1) após exposição ao composto nas concentrações de 12,5, 15 ou 20 μM por 48 h. Os Histogramas são representativos para cada linhagem celular avaliada e os gráficos demonstram as médias e os desvios padrão da porcentagem de células Anexina V⁺ de no mínimo três experimentos independentes (** valor $P < 0,01$ *** P-valor $< 0,001$).

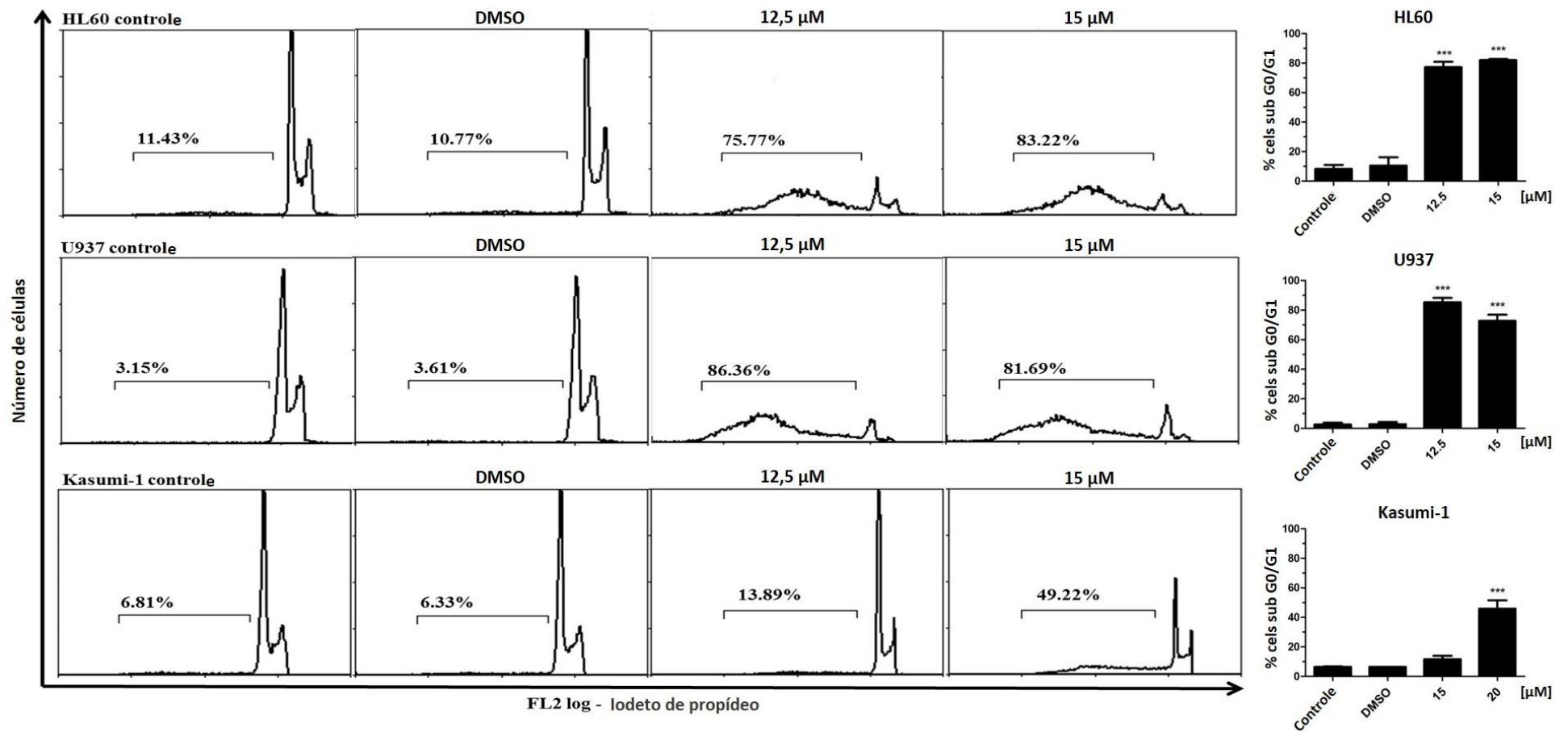


Figura 5.3: Efeito do ácido pomólico (AP) na indução de fragmentação do DNA em células de leucemia mielóide aguda (LMA: HL60, U937 e Kasumi-1) após exposição ao composto nas concentrações de 12,5, 15 ou 20 μ M por 48 h. Os Histogramas são representativos para cada linhagem celular avaliada e os gráficos demonstram as médias e os desvios padrão da porcentagem de células na fase sub-G0 / G1 do ciclo celular de no mínimo três experimentos independentes (***) P-valor <0,001).

5.1.3 Avaliação do perfil de distribuição de células no ciclo celular

Uma vez que o acúmulo de células em uma das fases do ciclo celular é um mecanismo importante para a redução da viabilidade celular, o conteúdo de DNA foi avaliado por citometria de fluxo após o tratamento com 12,5, 15 e 20 μM de AP por 48 h. A Figura 5.4 mostra que 15 μM de AP aumentou as células na fase S na linhagem HL60 (aproximadamente 26,8% no controle com DMSO para 36,7% no tratamento) e em G1 na linhagem U937 (48,4% no controle com DMSO para 55,7% no tratamento). O AP não afetou a distribuição de células no ciclo celular da linhagem Kasumi-1 em nenhuma das concentrações avaliadas. Esses resultados sugerem que o acúmulo de células no ciclo celular induzido pelo AP varia de acordo com os fenótipos de resistência das linhagens celulares.

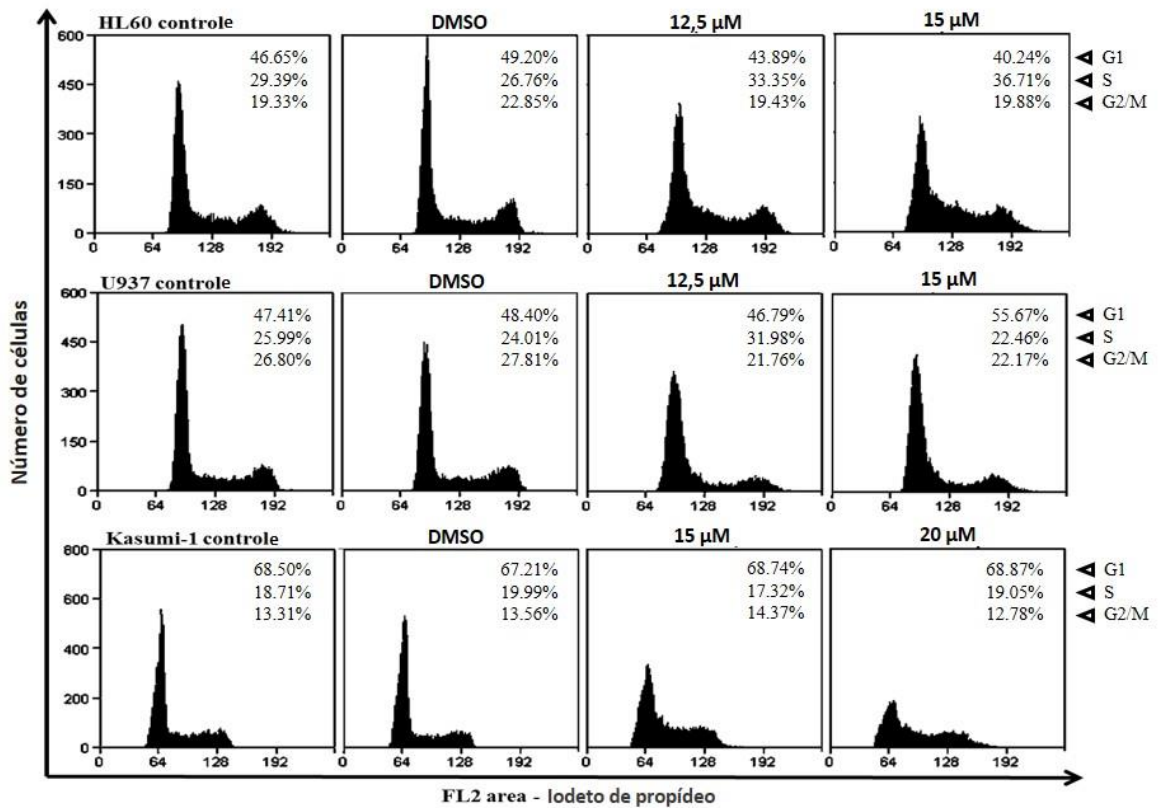


Figura 5.4: Efeito do ácido pomólico (AP) no perfil do ciclo celular das células de leucemia mielóide aguda (LMA: HL60, U937 e Kasumi-1) após exposição ao composto nas concentrações de 12,5, 15 ou 20 μM por 48 h. As setas indicam a porcentagem de células em cada fase (G1, S e G2/M). Os dados são representativos de três experimentos independentes.

5.2 Atividade dos compostos ácido pomólico e LQBs sobre as enzimas DNA topoisomerases humana

Uma vez que os compostos estudados neste trabalho apresentam estruturas químicas relacionadas à inibição das enzimas topoisomerases, eles foram avaliados em ensaios bioquímicos de relaxamento do DNA, a fim de verificar se apresentavam atividade inibitória sobre estas enzimas.

A Figura 5.5 mostra o resultado da avaliação dos compostos AP, LQBs -118, -192, -223, -266, -268 e -326 sobre as enzimas hTopo I e hTopo II α . É possível observar que nenhum composto da série dos LQBs inibiu a enzima hTopo I, uma vez que nenhum desses compostos conseguiu impedir a conversão da banda de DNA superenovelado em bandas de DNA relaxado, que é ocasionada pela ação das enzimas topoisomerases no relaxamento do DNA superenovelado. Por outro lado, o composto AP interferiu no relaxamento do DNA, mantendo o DNA superenovelado após a interação com a hTopo I, apresentando, portanto, atividade inibitória sobre esta enzima (Figura 5.5a).

Em relação a avaliação da atividade desses compostos sobre a enzima hTopo II α , foi observado que os compostos AP, LQB-118 e LQB-223 apresentaram atividade inibitória sobre esta enzima (Figura 5.5b).

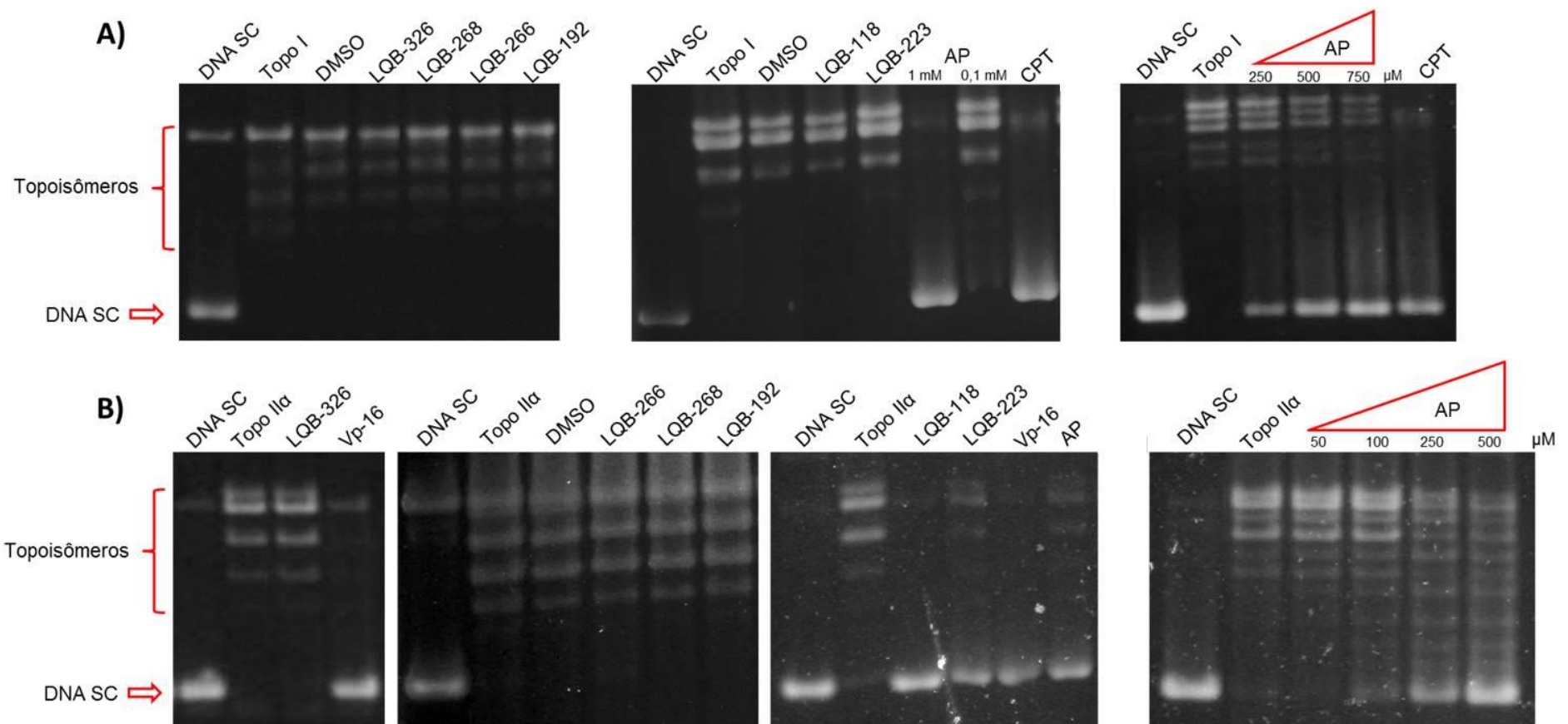


Figura 5.5: Efeito dos compostos ácido pomólico (AP) e LQBs na inibição do relaxamento do DNA catalisado pelas enzimas hTopo I (A) e hTopo II α (B). DNA SC: controle com DNA superenovelado (*supercoiled*, banda indicada pela seta) sem adição das enzimas; Topoisômeros: bandas de DNA relaxado geradas pela ação das enzimas DNA topoisomerasas; Topo I ou Topo II α : controle da atividade da enzima na ausência de inibidores; DMSO: controle da atividade da enzima na ausência de inibidores e na presença de DMSO; LQBs e AP: compostos avaliados como inibidores das enzimas Topo I e Topo II α . Os LQBs foram avaliados na concentração de 0,1 mM e AP nas concentrações de 0,1 – 1 mM; CPT: camptotecina, inibidor *poison* de Topo I; VP-16: etoposídeo, inibidor *poison* de Topo II α . Os controles CPT e VP-16 foram utilizados na concentração de 1 mM.

O ensaio de relaxamento do DNA também demonstrou que o composto AP apresentou atividade inibitória sobre ambas as enzimas hTopo I e hTopo II α , sendo considerado um inibidor dual dessas enzimas. Adicionalmente foi feita uma curva de dose-resposta para avaliar a potência de ação do composto AP sobre essas enzimas a fim de verificar se havia diferenças de interação deste composto com as enzimas hTopo I e hTopo II α . Foi verificado que a ação do AP sobre a hTopo I é iniciada a partir de 250 μ M de concentração desse composto e que a interação dele com a hTopo II α se inicia a partir de 100 μ M (Figura 5.5).

Atualmente, existe um grande interesse nesses compostos duais, pois um único agente farmacológico que iniba ambas as topoisomerasas parece combinar as propriedades dos inibidores específicos individuais. Assim, compostos duais apresentariam atividade antitumoral mais promissora, pois atuariam em uma população maior de células. Além disso, ofereceriam menores efeitos tóxicos secundários, em comparação com a associação da utilização de dois inibidores de topoisomerasas diferentes (KOH; NISHIO; SAIJO, 2005; SALERNO, *et al.*, 2010).

5.3 Potencial de intercalação dos compostos AP, LQB-118 e LQB-223 ao DNA

O ensaio de abertura do DNA (também chamado de ensaio *unwinding*) foi realizado para avaliar a capacidade dos compostos AP, LQB-118 e LQB-223 de se intercalarem ao DNA. Compostos intercaladores de DNA podem gerar resultados falso-positivos no ensaio de relaxamento do DNA usado para fazer uma triagem dos compostos inibidores de topoisomerasas. Por isso, a avaliação da intercalação desses compostos ao DNA foi realizada para distinguir intercaladores de DNA de inibidores diretos das enzimas topoisomerasas (WEBB & EBELER, 2003; PALCHAUDHURI; HERGENROTHER, 2007; NEVES *et al.*, 2013).

Como mostrado na Figura 5.6 nenhum dos compostos avaliados induziu um superenovelamento do DNA comparado ao brometo de etídio, utilizado como controle de intercalação ao DNA. Isto é, nenhum dos compostos gerou a banda de DNA SC que pode ser visualizada no controle positivo com Br.Etd. Ao contrário, os compostos AP, LQB-118 e LQB-223 apresentaram uma atividade semelhante à camptotecina,

controle positivo para a inibição da DNA topoisomerase. Logo, o bloqueio da atividade das topoisomerases no relaxamento do DNA, causado por esses compostos no ensaio anterior (Figura 5.5), foi devido à inibição da enzima topoisomerase e não à intercalação ao DNA.

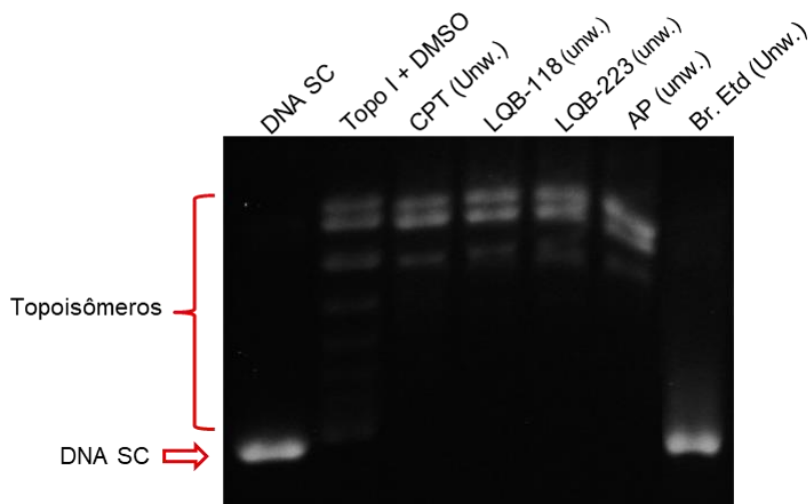


Figura 5.6: Análise do potencial de intercalação ao DNA pelos compostos LQB-118, LQB-223 e ácido pomólico (AP) através do ensaio de abertura do DNA (*unwinding*). DNA SC: controle com DNA superenovelado (banda indicada pela seta) sem adição da enzima; Topo I: controle da atividade da enzima na ausência de inibidores e na presença de 1% DMSO; Topoisômeros: bandas de DNA relaxado geradas pela ação das enzimas DNA topoisomerases; CPT: camptotecina, inibidor *poison* de Topo I; Br.Etd: brometo de etídio, intercalador de DNA. Todos os compostos foram utilizados na concentração de 1 mM.

5.4 Caracterização do tipo de inibição provocada pelos compostos AP, LQB-118 e LQB-223 sobre as enzimas DNA topoisomerases humana

Inibidores *poison* de topoisomerases como o etoposídeo e a camptotecina diferem dos inibidores catalíticos quanto ao mecanismo de ação. Os inibidores catalíticos diminuem a velocidade de reação da enzima sem levar ao acúmulo de DNA clivado, como acontece com os inibidores *poison* que estabilizam o complexo de clivagem da enzima associada ao DNA. Para distinguir esses dois tipos de inibidores foi feita a análise da clivagem do DNA em eletroforese de gel de agarose 1% contendo 0,5 µg/mL de Br.Etd. A presença do Br.Etd. nos géis de agarose torna possível a separação das bandas de DNA clivado (DNA *nicked*, clivado em uma única fita da

molécula de DNA, ou DNA linear, clivado em ambas as fitas) resultantes da atuação de um inibidor *poison*, das demais formas de DNA (DNA superenovelado e DNA relaxado).

Como pôde ser visualizado na Figura 5.7, nenhum composto avaliado sobre a hTopo I ou hTopo II α levou ao aparecimento de uma banda de DNA clivado detectável, como ocorre com os controles de inibição do tipo *poison*. Estes dados sugerem que todos os compostos avaliados atuam como inibidores catalíticos das topoisomerases.

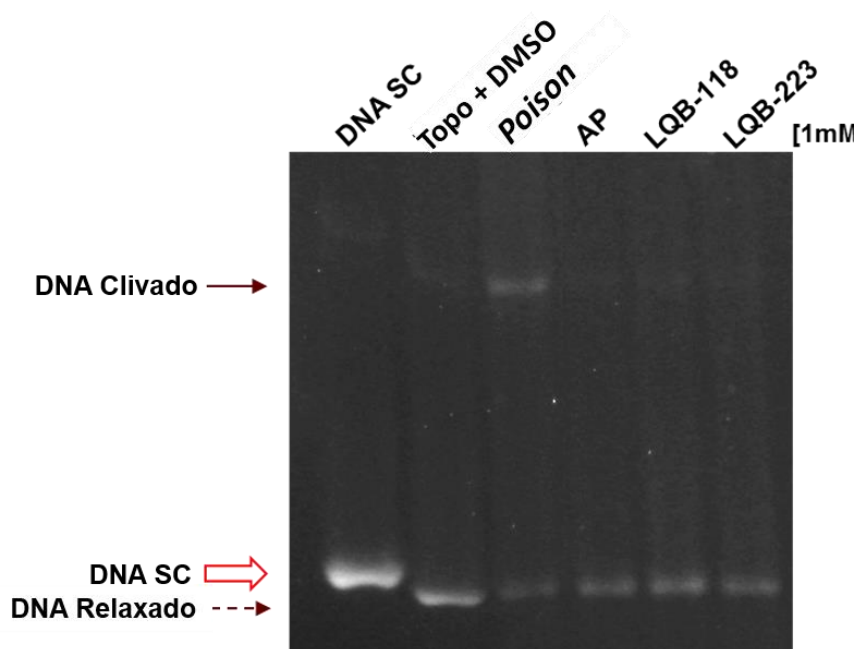


Figura 5.7: Análise do mecanismo de inibição das DNA topoisomerases pelos compostos LQB-118, LQB-223 e ácido pomólico (AP) mediante a análise da clivagem do DNA por eletroforese em gel de agarose a 1% (na presença de brometo de etídio). DNA SC: controle negativo representado pelo DNA superenovelado (banda indicada pela seta vermelha vazada) sem adição da enzima; Topo + DMSO: controle da atividade da enzima na ausência de inibidores e na presença de 1% DMSO; DNA clivado (seta vermelha sólida); DNA relaxado (banda indicada pela seta vermelha pontilhada); *Poison*: controle positivo de inibição.

Atualmente, a maioria dos inibidores de topoisomerases utilizados na quimioterapia antitumoral é do tipo *poison*. Existe, então, um grande interesse no desenvolvimento de novos inibidores do tipo catalítico, uma vez que os inibidores do tipo *poison*, como VP-16, estão associados ao desenvolvimento de leucemias secundárias (EZOE, 2012). Já os inibidores catalíticos de Topo II α podem modular os efeitos citotóxicos dos *poison* e sobrepujar o fenômeno MDR (LARSEN; ESCARGUEIL; SKLADANOWSKI, 2003). Outra vantagem potencial é a eficácia dos

inibidores catalíticos não ser dependente do nível de expressão de Topo II α . Como acontece com VP-16 e seus derivados, a ação dos inibidores *poisons* é, muitas vezes, diretamente proporcional ao nível de expressão das enzimas topoisomerases (POMMIER, 2013).

Uma vez que as células resistentes apresentam baixos níveis de DNA topoisomerases e, portanto, não respondem aos medicamentos *poisons* utilizados, os inibidores catalíticos mostram ser compostos promissores para o tratamento antitumoral, incluindo o fenótipo MDR (TAKIGAWA *et al.*, 1992; ALPSOY; YASA; GUNDUZ, 2014; ZHANG *et al.*, 2012; XU; LIN; ZHANG, 2006).

Até hoje, existem pouquíssimos inibidores catalíticos de Topo II α utilizados na clínica, como Aclarubicin (Aclacinomycin A[®]), utilizado no tratamento da leucemia mieloblástica e linfoma (CASE *et al.*, 1987; POGORELČNIK; PERDIH; SOLMAJER, 2013a), MST-16 (Sobuzoxane[®]), desenvolvido no Japão como um agente antitumoral para leucemia e linfomas (ANDOH, 1998; SAKAI & MUROTANI, 2010; TOYODA *et al.*, 2014) e ICRF-187 (Zinecard[®], Cardioxane[®]) que é utilizado como cardioprotetor nos Estados Unidos, Canadá e Europa (KOLARIC, 1995; HASINOFF; HERMAN, 2007; POGORELČNIK; PERDIH; SOLMAJER, 2013a).

5.5 Construção e validação de um modelo computacional em 3D da hTopo II α

Para a construção do modelo tridimensional da hTopo II α pelo programa Modeller foram utilizadas duas sequências de referência, uma vez que a qualidade dos modelos gerados por este programa é maior quando utilizado até três sequências de referência, mais do que isso leva a construção de modelos danificados (LARSSON, 2008). Esse modelo foi otimizado com valores mínimos de DOPE (Figura 5.8).

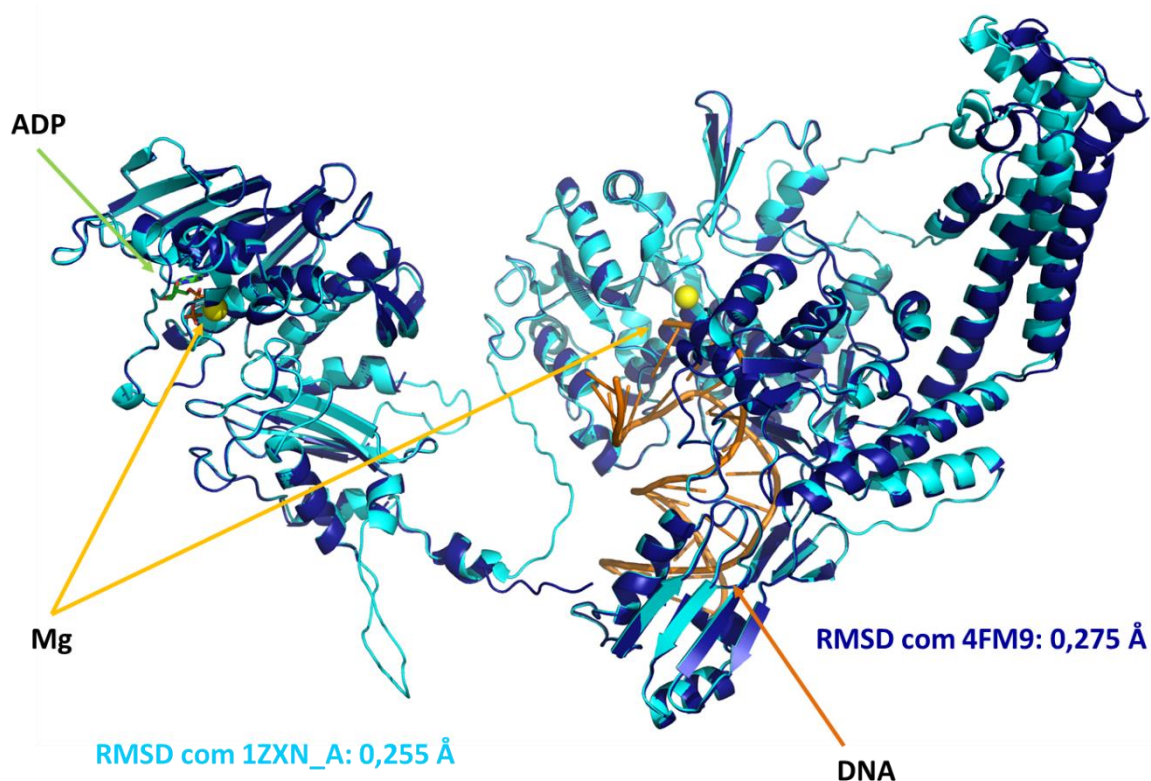


Figura 5.8: Estrutura tridimensional da enzima topoisomerase II α completa construída com utilização do programa Modeller. Em ciano, modelo de menor DOPE (M59) e em azul escuro, os modelos de referência usados na modelagem (1ZXN e 4FM9). Em laranja, o fragmento de DNA, em verde o ADP (que também está indicado por uma seta da mesma cor) e em amarelo, os íons magnésio (Mg⁺²), representados pelas duas esferas da mesma cor. Os valores de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) entre hTopo II α e as estruturas 1ZXN e 4FM9 foram 0,255 Å e 0,275 Å, respectivamente.

Esse modelo foi submetido ao refinamento das cadeias laterais e *loops*. A estrutura obtida foi avaliada quanto a sua qualidade através do gráfico de Ramachandran que determina a quantidade de resíduos nas regiões energeticamente favoráveis e desfavoráveis (VYAS *et al.*, 2012). Pela análise do gráfico de Ramachandran (Figura 5.9) o modelo da enzima hTopo II α apresentou 97,3% dos resíduos nas regiões favoráveis, 2,3% nas regiões permitidas e 0,3% nas regiões desfavoráveis.

Em relação à validação da estrutura tridimensional da proteína, o gráfico Errat avalia as estatísticas da ausência de interações entre diversos átomos e calcula o valor da função de erro, resultando em um fator de qualidade igual a 79,04, indicando o modelo como adequado (Figura 5.9).

Após o alinhamento estrutural de hTopo II α e II β , o valor de RMSD resultante entre eles foi de 1,4 Å, considerando somente átomos de carbono alfa.

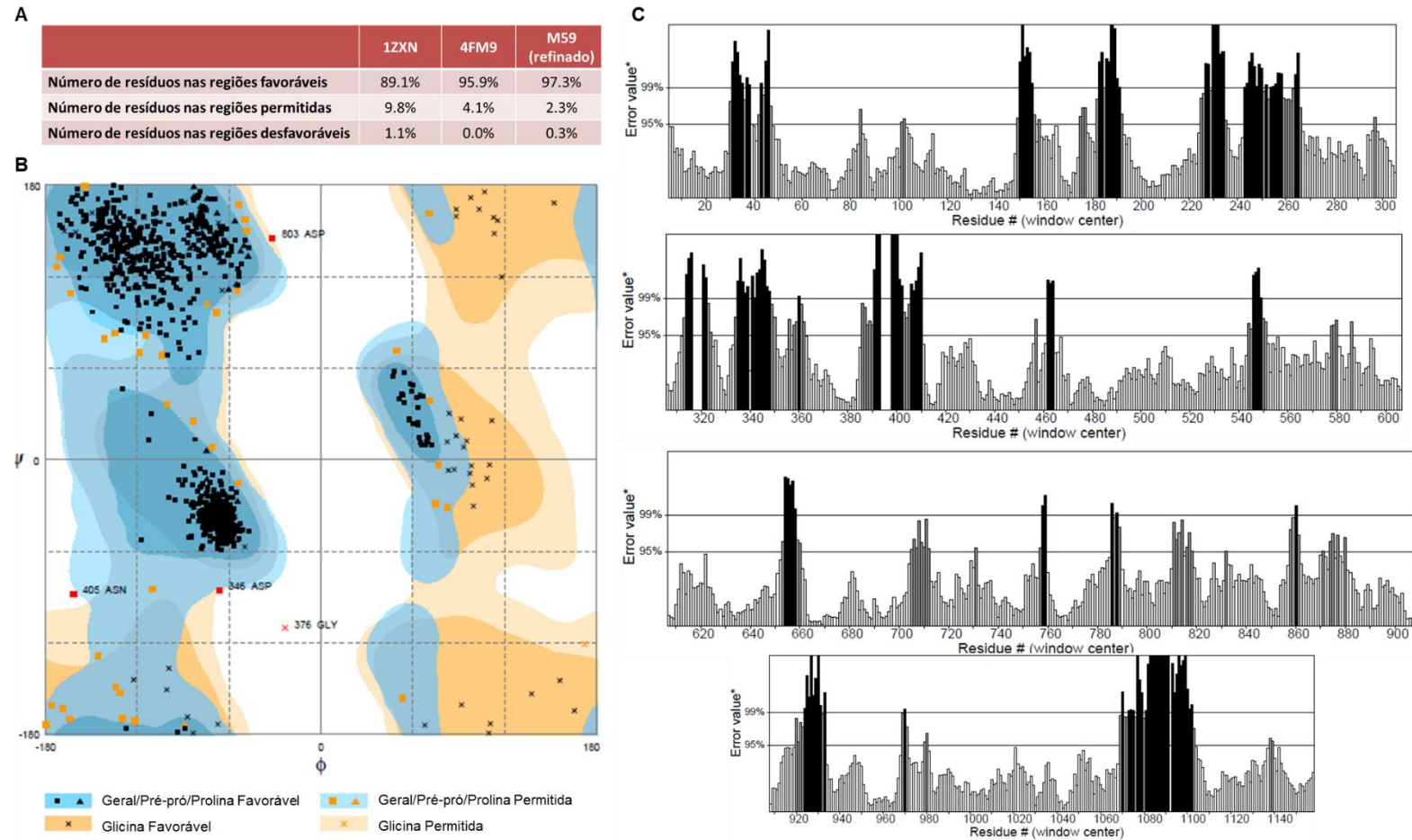


Figura 5.9: Validação e análise da qualidade da estrutura tridimensional completa de hTopo II α gerada pelo programa Modeller. A) A tabela mostra a quantidade de resíduos nas regiões energeticamente favoráveis e desfavoráveis encontrados no gráfico de Ramachandran para os modelos de referência (1ZXN e 4FM9) e para a estrutura otimizada que foi construída (M59); B) Gráfico de Ramachandran mostrando a distribuição dos resíduos da estrutura M59 nas regiões energeticamente favoráveis e desfavoráveis; C) Gráfico Errat mostrando as regiões com probabilidade de erro da estrutura M59 que foi validada com um fator de qualidade igual a 79,04 por esta metodologia.

5.6 Docking Molecular

Para avançar na avaliação do modo de ligação dos compostos AP, LQB-118 e LQB-223 nas enzimas topoisomerasas, foi analisado o modo de ligação desses compostos no sítio de clivagem do DNA e também em todas as outras cavidades nas enzimas topoisomerasas (*docking* cego).

Assim, como o AP foi o único composto que inibiu a hTopo I nos ensaios bioquímicos, iniciamos os experimentos de *docking* molecular com este composto. O *docking* cego do AP na hTopo I resultou em 917 soluções que foram reunidas em quatro grupos, indicados por círculos vermelhos na Figura 5.10a. Apesar do TTC, o ligante *poison* de hTopo I, estar presente no segundo grupo de interações com esta enzima, ele não está localizado no maior grupo populacional e isto pode sugerir que o AP não tem preferência de interação no mesmo sítio de ligação ao TTC. A fim de explorar melhor a possibilidade de interação do AP no sítio de ligação ao TTC, avaliamos o *docking* no sítio de clivagem do DNA ligado ao TTC na hTopo I. Todas as interações geradas neste ensaio apresentaram valores energéticos altamente positivos (106,5 Kcal / mol) (Figura 5.10a caixa superior), sugerindo baixa possibilidade de interação do AP nessa região de ligação do TTC na hTopo I.

Para a interação do AP com as enzimas hTopo II α e hTopo II β , o *docking* cego revelou que todas as soluções geradas, respectivamente 932 e 908, foram reunidas em apenas um grupo para cada enzima e que em ambas estava localizado fora do sítio de clivagem do DNA ligado ao EVP (Figura 5.10b-c). Além disso, foram gerados resultados semelhantes aos do *docking* do AP na mesma região da enzima hTopo I, isto é, valores de energia altamente positivos (224,8 Kcal / mol para hTopo II α e 129,9 Kcal / mol para hTopo II β) (Figura 5.10b-c caixa superior para cada enzima).

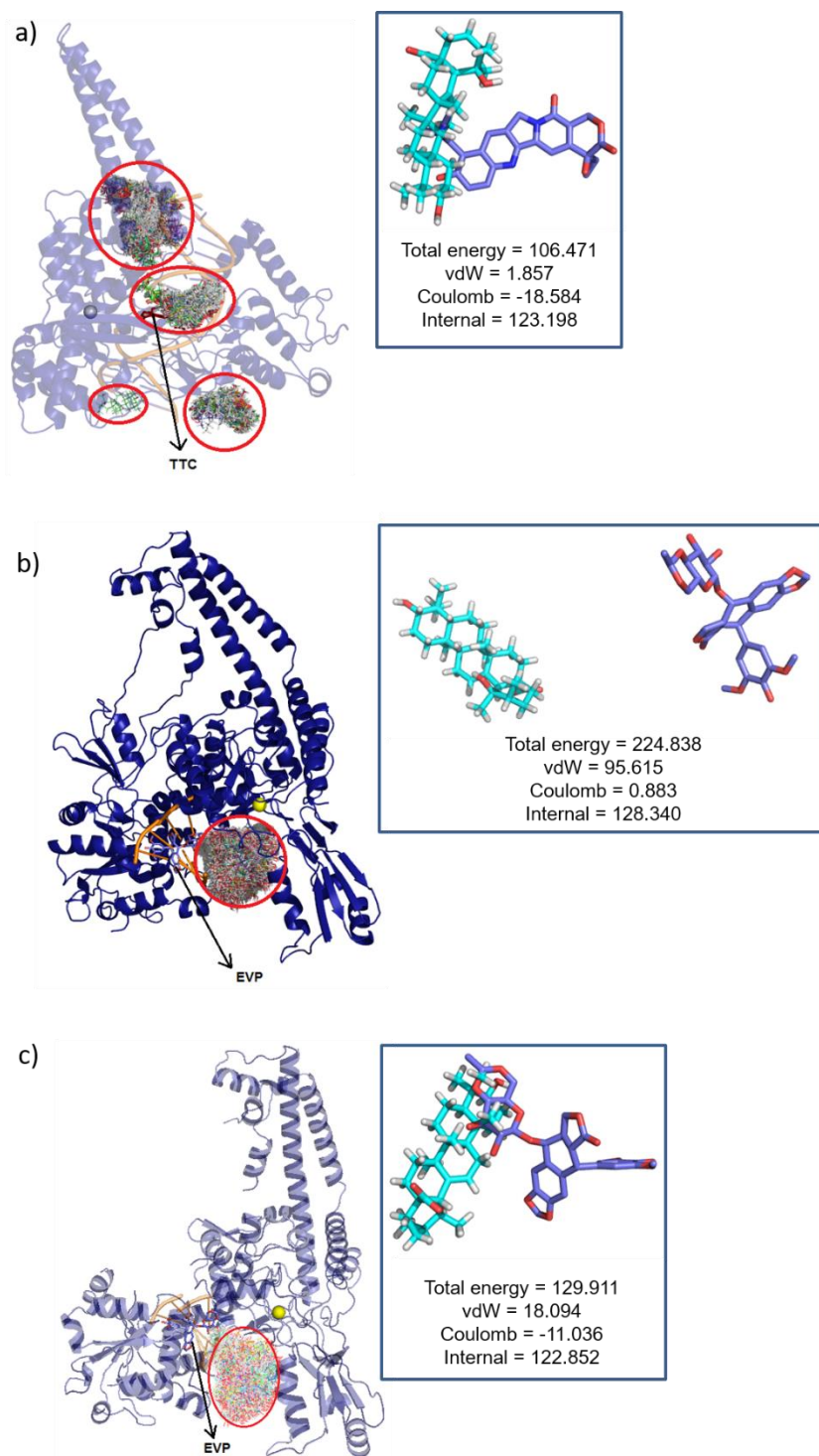


Figura 5.10: Resultado de *docking* do modo de ligação do ácido pomólico (AP) às DNA topoisomerasas: *docking* cego do AP na hTopo I (a), hTopo II α (b) e hTopo II β (c). Os círculos vermelhos indicam os locais de ligação preferencial no *docking* cego com 917 conformações (a), 932 conformações (b) e 908 conformações (c). TTC: ligante topotecano. EVP: ligante etoposídeo. As caixas mostram a interação do AP no sítio de ligação dos *poisons* TTC na hTopo I (a) e EVP na hTopo II α (b) e hTopo II β (c). As estruturas cristalográficas do TTC (a) e do EVP (b e c) são mostrados em azul e as estruturas resultantes do *docking* com AP são mostradas em ciano. Todos os valores de energia exibidos dentro das caixas estão em kcal / mol.

Para realizar o docking nas enzimas hTopo II, inicialmente foi feito o *redocking* do ligante EVP no sítio de ligação da hTopo II β . O *redocking* resultou em um valor de RMSD de 0,18 Å entre a conformação de mais baixa energia obtida pelo *docking* e a conformação encontrada na estrutura resolvida experimentalmente por difração de raio-x (código PDB 3QX3). Esse resultado é um indicador de que os parâmetros utilizados no *docking* são adequados para o sistema em estudo.

Em seguida, o EVP foi submetido ao *docking* na região da hTopo II α (equivalente à região da ligação na hTopo II β). O resultado foi um valor de RMSD de 0,43 Å entre a conformação de mais baixa energia obtida pelo *docking* e a conformação encontrada na estrutura do PDB 3QX3.

Essas regiões de interação do EVP com as enzimas hTopo II α e II β foram, então, utilizadas nos cálculos de *docking* dos ligantes LQB-118 e LQB-223 nestas enzimas para a abordagem de *docking* no sítio ativo da enzima de ligação ao DNA e inibição por EVP. Todas as estruturas ancoradas por essa abordagem apresentaram energias totais de ligação positivas, sugerindo que não há interações favoráveis observadas entre os ligantes e as enzimas hTopo II α e II β no sítio de ligação do EVP (Tabela 5.1). Esses dados corroboram os dados experimentais que mostraram que o mecanismo de inibição das topoisomerases por estes compostos é diferente do etoposídeo.

Tabela 5.1: Resultados do *docking* das topoisomerases com os compostos LQB-118 e LQB-223 ancorados na região do sítio de EVP e do *docking* cego feito sobre os modelos 3QX3 do PDB (hTopo II β) e M59 (hTopo II α), construído através do Modeller.

Modelagem computacional	Energia Total (Kcal/mol)	
	<i>Docking</i> - sítio de VP-16	<i>Docking</i> cego
Topo II α com LQB-118	5,15	-2,74
Topo II β com LQB-118	4,95	0,07
Topo II α com LQB-223	48,44	17,22
Topo II β com LQB-223	55,66	16,11

Em seguida, buscando elucidar a região de preferência de ligação desses ligantes nas enzimas topoisomerases, foi realizado o *docking* cego. Essa abordagem mostrou energias totais de ligação entre as enzimas topoisomerases e os ligantes mais baixas (Tabela 5.1). Nessa abordagem, o ligante LQB-118 mostrou ser o composto mais promissor uma vez que apresentou energias negativas de ligação, o

que o torna mais favorável para a interação nesse sítio (Tabela 5.1). Além disso, a energia de interação desse ligante com a hTopo II α (-2,74 kcal/mol) foi menor do que com a hTopo II β (0,07 kcal/mol), mostrando que a preferência de ligação deste composto é pela isoforma alfa. Esse resultado apresenta potencial relevância clínica visto que a inibição de hTopo II β está associada à genotoxicidade, induzindo quebras e translocações no *locus* MLL, podendo ocasionar neoplasias secundárias relacionadas ao tratamento, principalmente LMA secundária (AZAROVA *et al.*, 2007; AZAROVA *et al.*, 2010; COWELL *et al.*, 2012).

Na Figura 5.11 é possível observar o resultado do *docking* do LQB-118 nas enzimas topoisomerase II α e II β . O *docking* desse ligante com a hTopo II β resultou em 909 soluções reunidas em três grupos principais, G1, G2 e G3, com as correspondentes populações de 96,25%, 2,1% e 1,65%, respectivamente. Vale ressaltar que nenhum desses agrupamentos foi identificado no mesmo local de ligação do EVP. No entanto, como mostrado na Tabela 5.1, o *docking* deste ligante na isoforma beta resultou em uma energia total positiva. Já o *docking* do LQB-118 com a hTopo II α resultou em 900 soluções reunidas em sete grupos. Três destes são altamente populosos, e quatro estão distribuídos em vários sítios da proteína. Do total, 861 conformações correspondiam aos três primeiros grupos, 42,88% deles eram parte do grupo G1, 29,77% formaram o segundo grupo G2 e 23% foram acumulados no G3.

A maioria das conformações foi ancorada perto da posição do cofator Mg⁺² e não houve intercalação ao DNA, corroborando com os resultados experimentais que mostraram que esses compostos não são agentes intercaladores do DNA.

Analisando somente em relação às energias de interação, os grupos G2 (região que comporta a estrutura cristalográfica de EVP) e G3 apresentam a maioria das moléculas com menores energias. Embora menor, o grupo G3 apresentou as moléculas com valores de energia mais negativas, ou seja, as conformações com os valores mais baixos de energia de ligação foram localizadas neste grupo, indicando as conformações de LQB-118 com maior estabilidade.

As interações intermoleculares entre o ligante LQB-118 e a enzima hTopo II α foram mapeadas, e pôde-se observar que as conformações pertencentes ao grupo G3, foram as que interagiram mais intensamente com a proteína apresentando os menores valores de energia (Figura 5.11).

Da mesma forma que ocorreu com a hTopo II β , todas as conformações do LQB-118, presentes no grupo mais populoso (G1) e no grupo energeticamente mais favorável (G3), foram encontrados em um local diferente da região de ligação ao EVP.

O *docking* cego de LQB-223 com a hTopo II α resultou em três grupos principais e com a hTopo II β , em dois grupos principais. No entanto, todos os grupos apresentaram energias positivas (cerca de 17,22 Kcal/mol para hTopo II α e aproximadamente 16,11 kcal/mol para hTopo II β) e, conseqüentemente, foram descartados. Mais uma vez, nenhuma das conformações foi encontrada no mesmo sítio de ligação do EVP.

Posteriormente, utilizamos a terceira abordagem do *docking* proposta a fim de avaliar melhor a probabilidade de interação desses ligantes diretamente ao domínio ATPase de hTopo II α .

Sabendo-se que a hidrólise do ATP em ADP e fosfato inorgânico controla os eventos de clivagem/religação do DNA e passagem de um segmento de DNA por outro (BATES; BERGER; MAXWELL, 2011), foi utilizada a sequência 1ZXM do PDB que corresponde a estrutura 3D do domínio ATPase da hTopo II α humana, ligada ao AMP-PNP (*Phosphoaminophosphonic Acid-Adenylate Ester*, um análogo do ATP não hidrolisável) (WEI *et al.*, 2005). Ultimamente, muitos trabalhos têm relatado inibidores catalíticos que interagem nessa conformação do domínio ATPase, como análogos de purina, naftoquinonas, dentre diversos outros compostos heteropolicíclicos (CHENE *et al.*, 2009; FURET *et al.*, 2009; MA *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2013; BAU & KURZ, 2014).

No estudo de *docking*, foi analisada a energia de ligação às moléculas de água, a fim de compreender a importância do solvente na estabilidade dos ligantes associados a hTopo II α . Além disso, foram analisadas as energias totais de ligação, ligação de hidrogênio e os resíduos de proteínas mais importantes associados a essas interações (Figura 5.12).

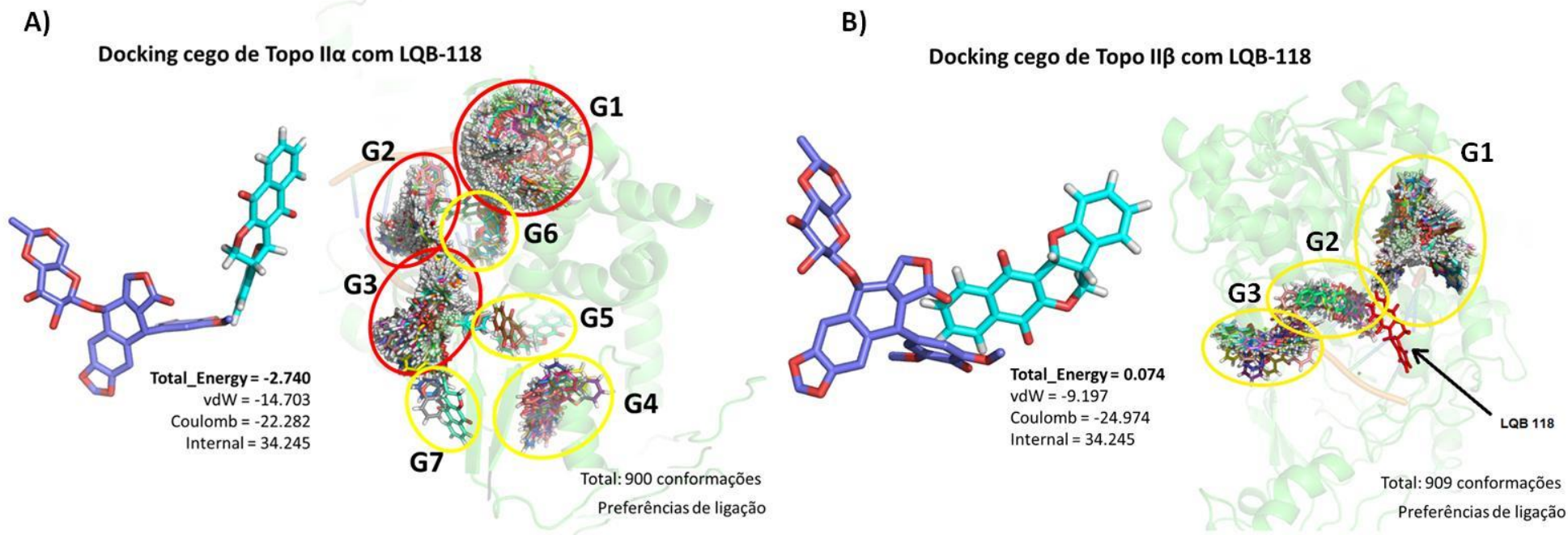
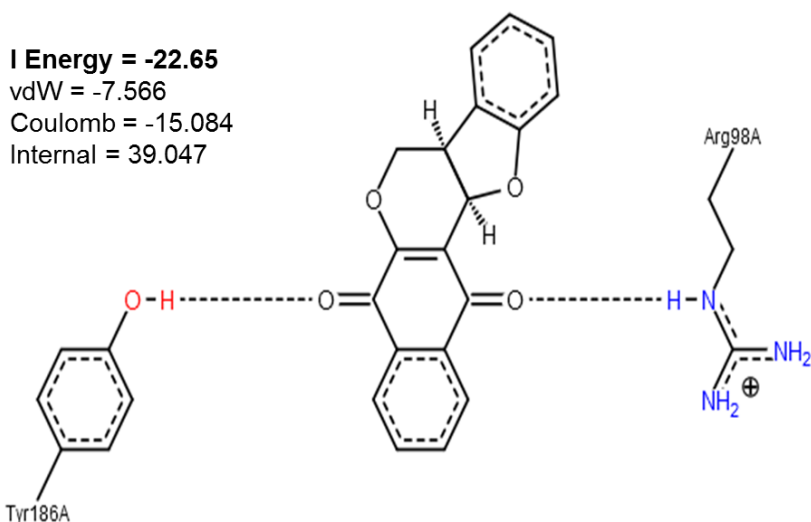


Figura 5.11: Estudo computacional da interação entre o composto LQB-118 e as enzimas DNA topoisomerases. A) Avaliação da preferência de ligação do LQB-118 em qualquer região da hTopo II α por *docking* cego. G1 representa o maior grupo com 42,88% das conformações do ligante interagindo com a proteína; G2 corresponde a 29,77% das conformações; G3 representa o menor grupo, com 23% das conformações, no entanto, estas apresentam os valores energéticos mais baixos. (B) Avaliação da preferência de ligação do LQB-118 em qualquer região da hTopo II β por *docking* cego. As conformações foram agrupadas em três regiões: G1, G2 e G3, com populações de 96,25%, 2,1% e 1,65%, respectivamente. Foram analisadas 900 conformações de possibilidades de ligações do LQB-118 com a hTopo II α e 909 conformações para hTopo II β . As áreas com as interações preferenciais foram demarcadas em círculos amarelos e vermelhos (Maior porcentagem de preferência de ligação das conformações do LQB-118). Em azul, a estrutura cristalográfica do EVP e em ciano, o *docking* do LBQ-118.

Os resultados do *docking* dessa terceira abordagem mostraram que a ancoragem dos compostos LQB-118 e LQB-223 na hTopo II α apresentou conformações com baixos níveis energéticos (-22,65 kcal/mol e -20,38 kcal/mol, respectivamente), indicando uma alta afinidade pelo domínio ATPase desta enzima (Figura 5.12).

A) Docking de LQB-118 na região ATPase de Topo II α



B) Docking de LQB-223 na região ATPase de Topo II α

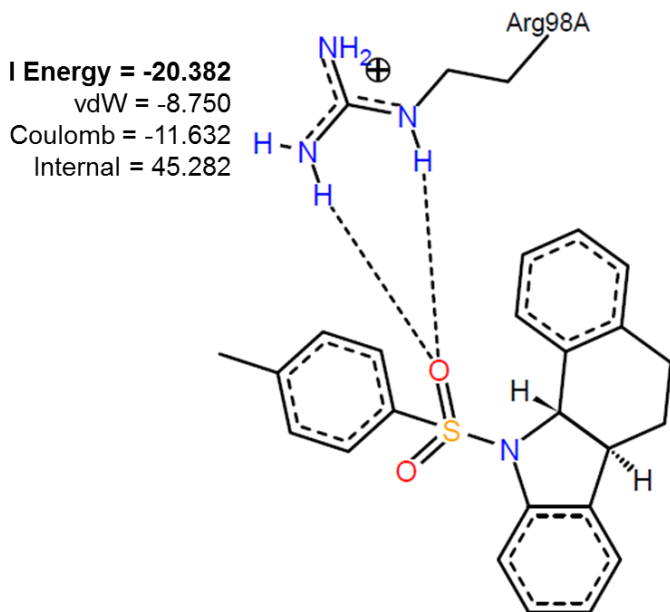


Figura 5.12: Resultados do *docking* com LQB-118 (A) e LQB-223 (B) ancorados na região ATPase (PDB: 1ZXM) de hTopo II α , mostrando as energias em kcal/mol e os resíduos que interagem com a enzima neste domínio. As linhas tracejadas indicam ligações de hidrogênio, pontes de sal e interações metálicas. As imagens foram geradas com o programa PoseView e PyMOL.

As interações por ligações de hidrogênio são importantes para o processo de reconhecimento e estabilidade entre enzima – ligante (WANG *et al.*, 2008; MA *et al.*, 2011). O composto LQB-118 faz interações por ligações de hidrogênio com os resíduos Tyr186A e Arg98A (Figura 5.12a) e não apresenta interações por ligações de hidrogênio com a água. O composto LQB-223 faz interações por ligações de hidrogênio com moléculas de água e com o resíduo Arg98A (Figura 5.12b). Além disso, ambos os compostos avaliados interagiram com o íon magnésio. Apesar de mostrarem interações com resíduos diferentes, ambos os compostos apresentaram energias negativas de ligação com a hTopo II α semelhantes. Sugerindo uma interação altamente favorável entre os ligantes e o sítio de ligação ao ATP da hTopo II α .

Parte II: Desenvolvimento e caracterização das linhagens de leucemias agudas resistentes ao etoposídeo

5.7 Efeito da indução de resistência ao etoposídeo

As linhagens CEM-R e U937-R, resistentes a 1 μ M de VP-16 foram desenvolvidas através do cultivo dessas linhagens com concentrações crescentes desse fármaco. Foi possível perceber que o crescimento das linhagens resistentes era diferente das linhagens parentais. As linhagens resistentes CEM-R e U937-R, apresentaram algumas células de grande tamanho que foram se acumulando ao longo do cultivo celular (Figura 5.13). O aumento de tamanho observado pode estar relacionado à maior dificuldade das células resistentes em se dividir, uma vez que as células das linhagens parentais mantidas em cultura pelo mesmo período de tempo, não apresentam essas células maiores (Figura 5.13).

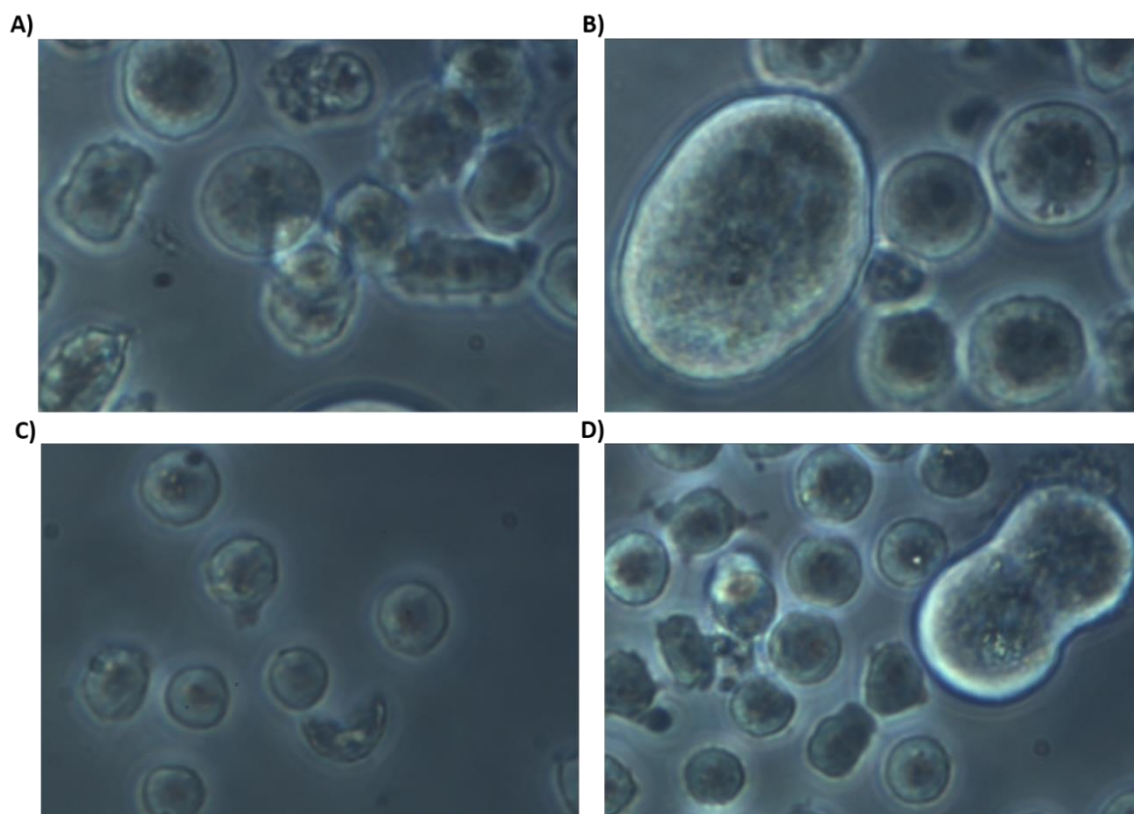


Figura 5.13: Análise morfológica das células das linhagens de leucemias agudas parentais e resistentes ao etoposídeo (VP-16). Imagens das células U937 (A), U937-R (B), CCRF-CEM (C) e CEM-R (D) adquiridas no microscópio de campo claro Nikon Eclipse E200 usando o programa Nis Element F 2.30 (*Nikon Instruments, Melville, NY, EUA*), no aumento de 40X.

Corroborando com as alterações na morfologia das células resistentes, as células das linhagens parentais se multiplicam mais rapidamente do que as células das linhagens resistentes. Foi observado maior número de células vivas nas linhagens CCRF-CEM e U937 parentais, em relação às linhagens resistentes às diferentes concentrações de VP-16 (Figura 5.14). Após 24, 48 ou 72 h de cultivo foi possível observar uma diferença de cerca de duas vezes mais células nas linhagens parentais do que nas linhagens resistentes, tanto em LLA quanto em LMA. As células resistentes das linhagens de LLA apresentam o crescimento um pouco mais lento do que as células resistentes de LMA quando comparadas às parentais (crescimento da CEM-R foi 2 vezes menos do que o da CCRF-CEM, enquanto que o crescimento da U937-R foi 1,5 vezes menor do que da U937) (Figura 5.14).

Essa redução na viabilidade celular é observada em diversos modelos de seleção *in vitro* de linhagens resistentes a quimioterápicos, sendo uma das principais dificuldades para indução de linhagens resistentes, pois mesmo expostas a baixas concentrações dos fármacos, eles causam alguma citotoxicidade (KAPOOR *et al.*, 1995; MAHON *et al.*, 2000).

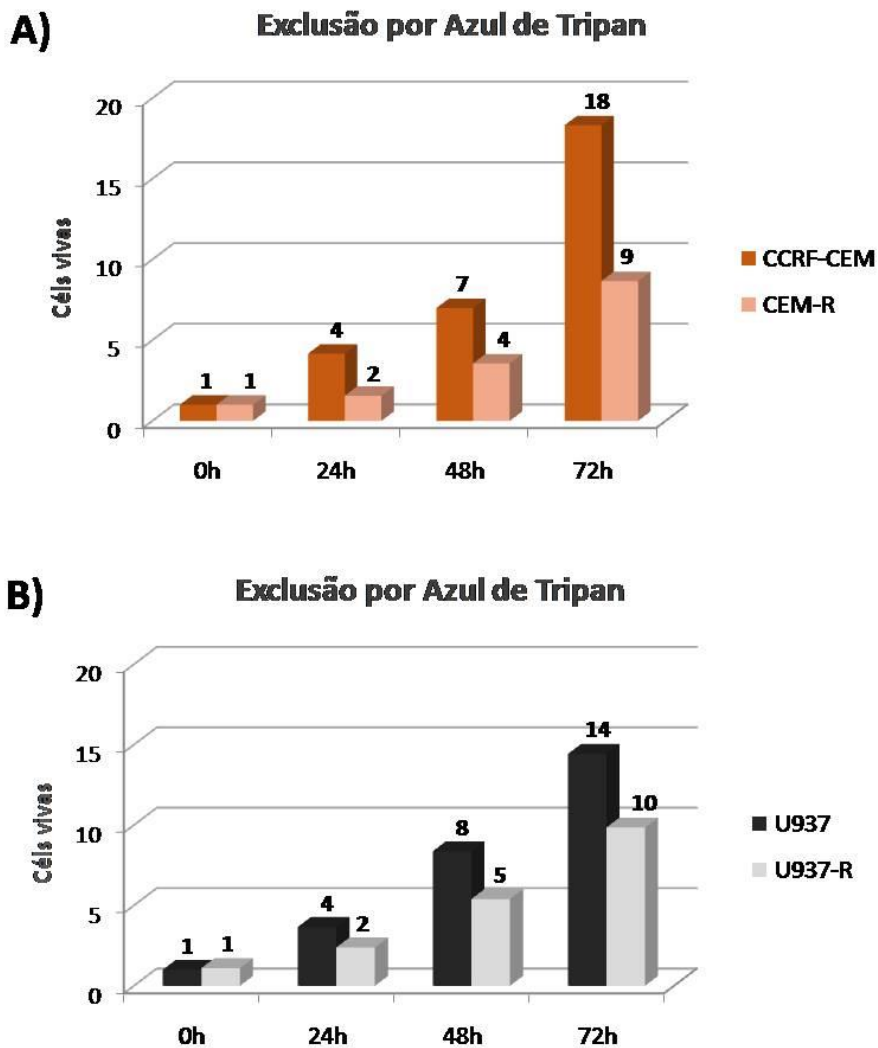


Figura 5.14: Quantidade de células de leucemias agudas vivas ao longo do tempo (24, 48 e 72 h) após a indução de resistência com VP-16. A) Linhagens de LLA: CCRF-CEM e CEM-R (resistentes a 1 μM de VP-16). B) Linhagens de LMA: U937 e U937-R (resistente a 1 μM de VP-16).

Tanto as linhagens de LMA quanto as de LLA resistentes ao VP-16 apresentaram reduções em torno de 50% da proliferação celular das linhagens parentais já em 24 h e isso é mantido com o aumento do tempo de cultivo das células. Essa menor taxa proliferativa das linhagens resistentes é compatível com a possível redução dos níveis proteicos de topoisomerasas nessas células, dificultando a ocorrência dos processos de de replicação e transcrição celular e, conseqüentemente, impactando na proliferação dessas células ao longo do tempo.

5.8 Análise do padrão cromossômico após indução de resistência com etoposídeo

A resistência a agentes antitumorais é um grande desafio no tratamento do câncer. Alguns tumores são resistentes à terapia primária e outros se tornam resistentes durante o tratamento, mostrando a necessidade do desenvolvimento de modelos celulares para o estudo dos mecanismos envolvidos com a aquisição de resistência (FUNATO *et al.*, 2004).

As quatro linhagens de leucemias agudas (U937, U937-R, CCRF-CEM e CEM-R) apresentaram um cariótipo complexo (com três ou mais alterações cromossômicas), característico de tipos celulares neoplásicos. Cariótipos complexos estão associados com a resistência ao tratamento, ao prognóstico desfavorável e a baixa taxa de sobrevida em pacientes com LMA (STYCZYNSKI & HAUS, 2006). Em contrapartida, a hiperdiploidia (presença de mais de 50 cromossomos) é característica de bom prognóstico em pacientes com LLA (HARRISON & FORONI, 2002; STYCZYNSKI & HAUS, 2006).

As linhagens parentais U937 e CCRF-CEM, apresentaram um cariótipo hiperdiploide (com mais de 50 e mais de 80 cromossomos, respectivamente). Todavia, ambas as linhagens apresentaram apenas uma única população.

A linhagem U937 apresenta o seguinte cariótipo: 55,X,-Y,+der(1)del(1)(p32),+2,+der(3)t(1;3)(q32;q28),del(5)(q21),+7,+9,add(10)(p15),del(11)(q21),+der(11)add(11)(p15),+12,add(14)(p11),add(15)(p11),+19,-22,+3mar (Figura 5.15). Diferente da linhagem parental, a linhagem de LMA resistente ao VP-16, denominada U937-R, apresentou duas subpopulações coexistindo na mesma cultura, uma com cariótipo: 45,XY,-5,+der(6)del(6)(q14),-10,+mar em 60% das metáfases analisadas (Figura 5.16) e outra com 45,XY-2,-6,+der(6)del(6)(q14),-10,+mar (Figura 5.16) em 40% das metáfases analisadas. Este cariótipo mostrou ser totalmente diferente da linhagem parental (U937). Contudo, não há relatos na literatura de uma linhagem U937 resistente ao VP-16. Estas alterações podem ser derivadas da instabilidade genética das linhagens celulares submetidas à pressão seletiva pela indução de resistência ao VP-16, resultando em ganho ou perda de cromossomos, deleções parciais ou totais além de novos rearranjos cromossômicos (BIGNOLD; COGHLAN; JERSMANN, 2006).

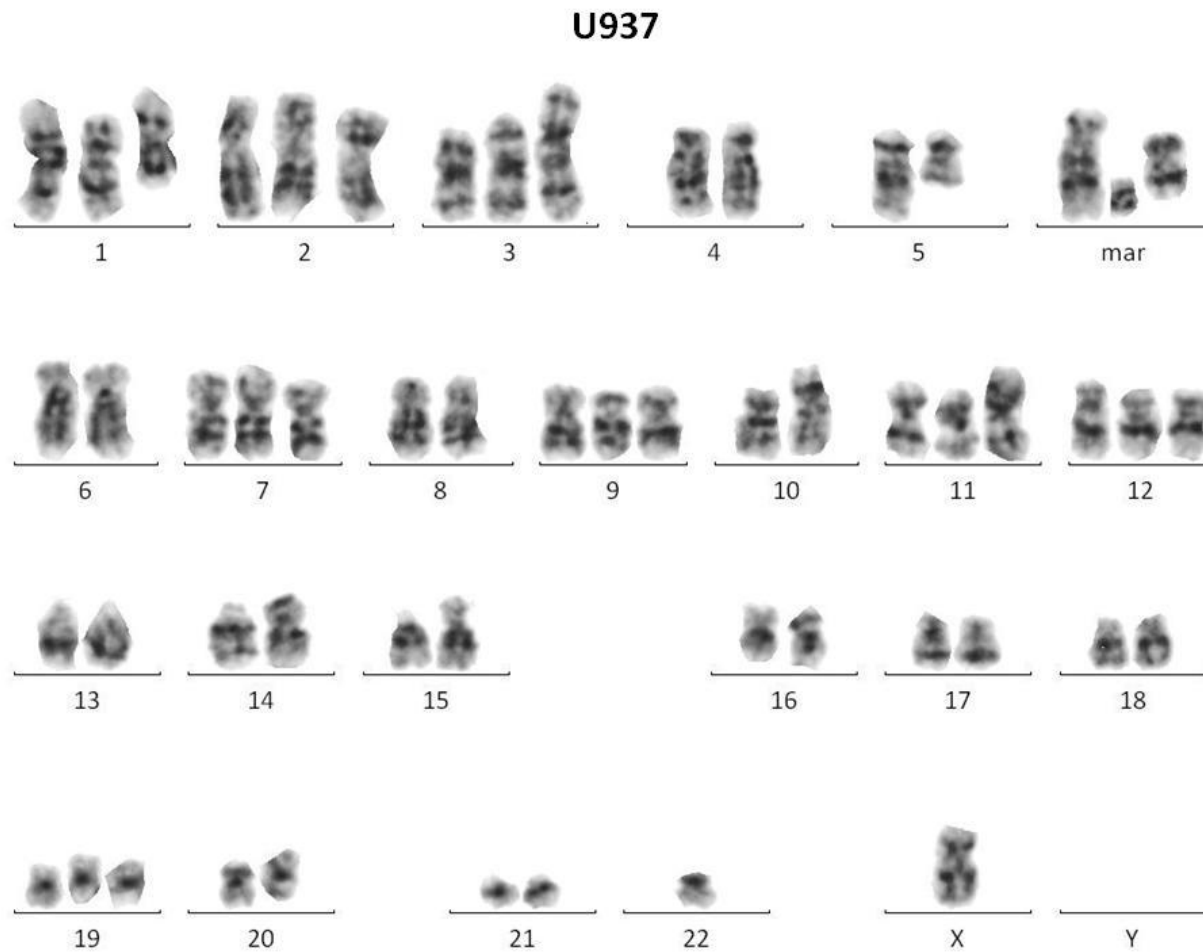


Figura 5.15: Análise citogenética da linhagem de leucemia mielóide aguda U937 realizada por bandeamento G. Os números indicam a numeração dos cromossomos; X: cromossomo X; Y: cromossomo Y ausente; mar: cromossomos marcadores (sem padrão de bandas definido).

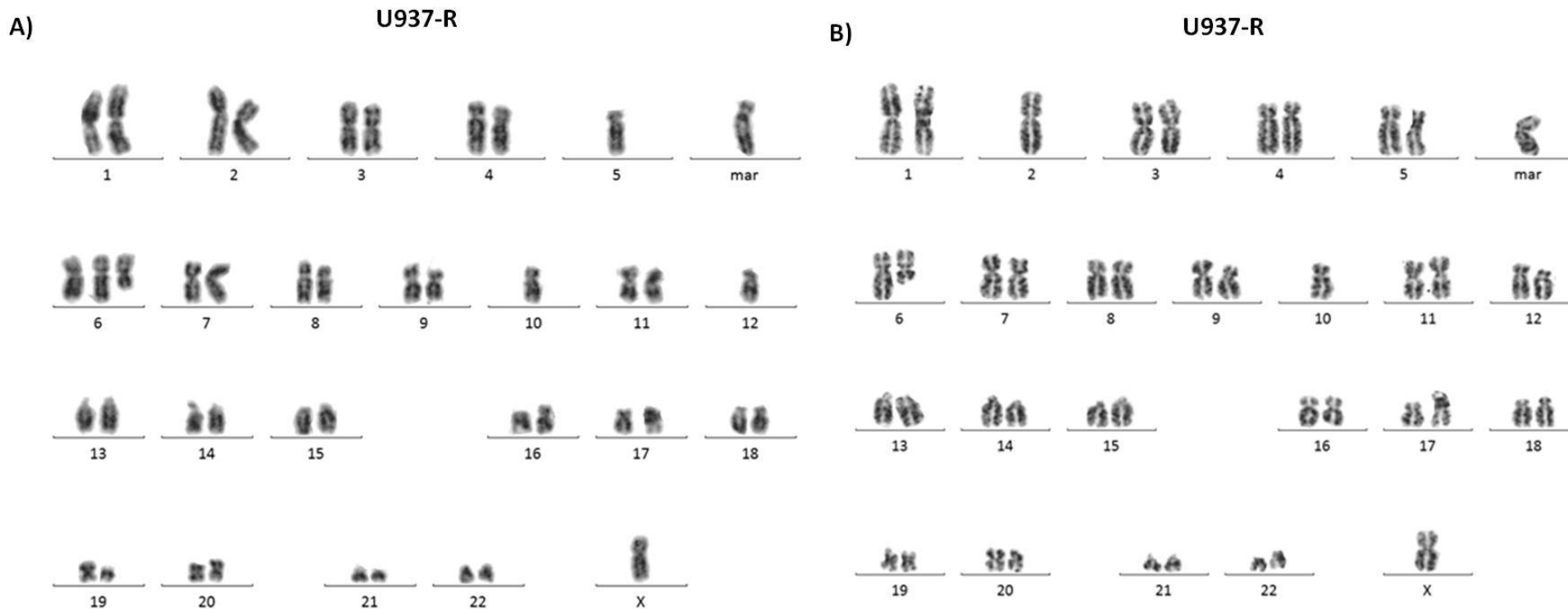


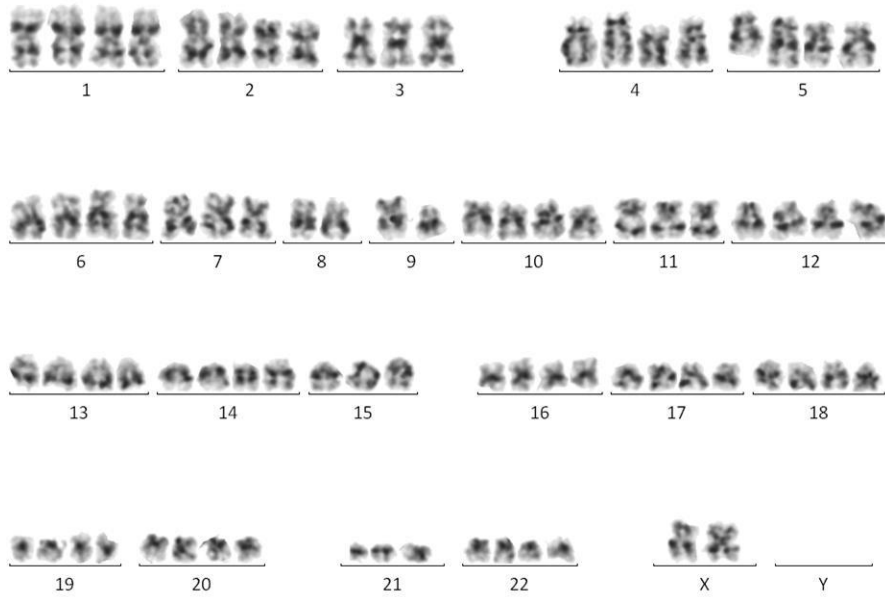
Figura 5.16: Análise citogenética da linhagem de leucemia mieloide aguda resistente ao etoposídeo, U937-R, realizada por bandeamento G. A) Subpopulação encontrada em 60% das metáfases. B) Subpopulação encontrada em 40% das metáfases. Os números indicam a numeração dos cromossomos; X: cromossomo X; mar: cromossomos marcadores (sem padrão de bandas definido).

Já a linhagem CCRF-CEM possui o cariótipo: 81,XX,+1,+1,+2,+2,+3,+4,+4,+5,+5,+6,+6,+7,+der(7),del(7q),+10,+10,+11,+12,+13,+13,+13,+14,+14,+15,+16,+16,+17,+18,+18,+19,+20,+20,+21,+22,+mar (Figura 5.17). Na linhagem de LLA resistente ao VP-16, denominada CEM-R, o número cromossômico variou entre 81 - 85 cromossomos apresentando na maioria das metáfases o seguinte cariótipo: 81,XX,+1,+2,+2,+3,+3,+4,+7,+8,+9,+10,+11,+12,+12,+13,+14,+15,+16,+18,+19,+20,+21,+21,+13mar (Figura 5.17). Diferente da linhagem parental (CCRF-CEM), que não apresentou nenhum cromossomo marcador (cromossomos sem padrão de bandas definido), a linhagem CEM-R apresentou um ganho de 13 cromossomos marcadores. Isto pode ser explicado pelo mecanismo de ação do VP-16, uma vez que o tratamento com este fármaco inibe a topoisomerase II α , aprisionando-a no complexo de clivagem ligada ao DNA. Isto pode resultar na clivagem da dupla hélice e, conseqüentemente, em quebras nos cromossomos (PENDLETON *et al.*, 2014).

Durante o tratamento contínuo com drogas citotóxicas, clones minoritários citogeneticamente distintos podem ser selecionados e passam a predominar na cultura celular levando ao aparecimento de um clone resistente. Além disso o tratamento prolongado com o quimioterápico pode culminar em uma nova organização do padrão cromossômico com a presença de novas alterações numéricas ou estruturais resultando na resistência à morte celular e sobrevivência da célula (FUNATO *et al.*, 2004; CORCES *et al.*, 2014).

A)

CCRF-CEM



B)

CEM-R

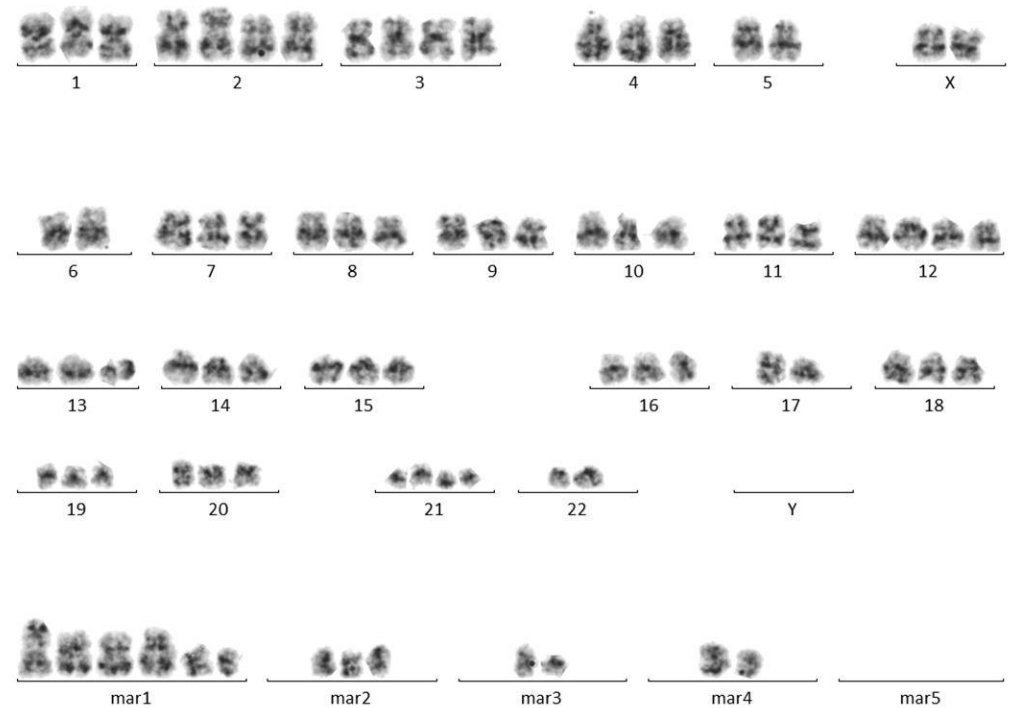


Figura 5.17: Análise citogenética das linhagens de de leucemia linfóide aguda parental e resistente ao etoposídeo realizada por bandeamento G. A) CCRF-CEM. B) CEM-R. Os números indicam a numeração dos cromossomos; X: cromossomo X; Y: cromossomo Y ausente; mar: cromossomos marcadores (sem padrão de bandas definido).

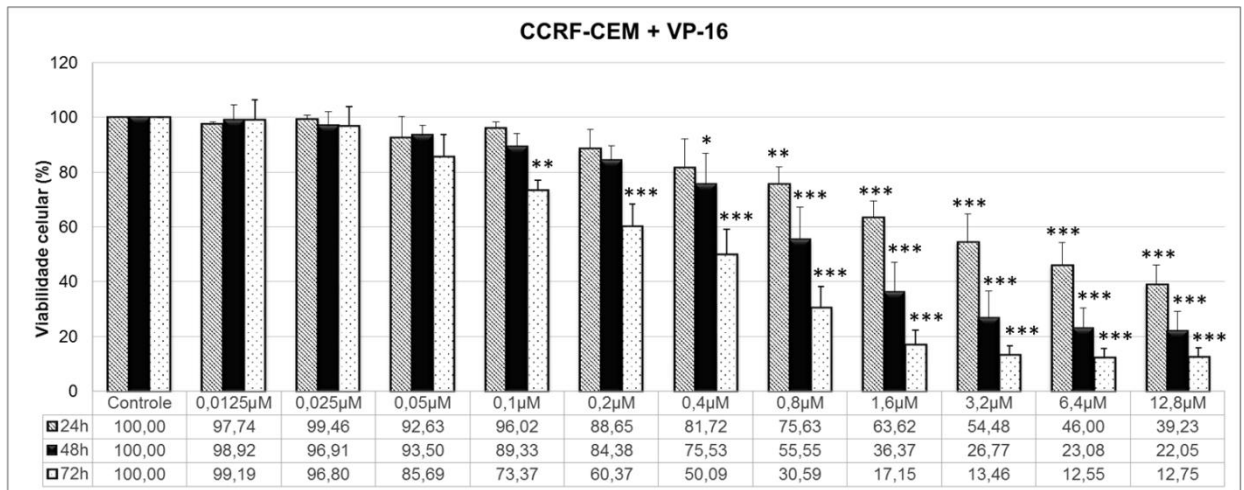
5.9 Viabilidade celular das linhagens de leucemias agudas parentais e resistentes ao etoposídeo

Como as linhagens resistentes foram desenvolvidas mediante a exposição contínua ao VP-16, para seguir com a caracterização das mesmas, buscamos investigar a resposta destas linhagens frente o tratamento com diversas concentrações de VP-16, comparando com as linhagens parentais.

Para tanto, primeiro investigamos a viabilidade celular das linhagens parentais U937 e CCRF-CEM ao tratamento com VP-16. Na Figura 5.18 é possível observar que tanto a linhagem CCRF-CEM quanto a U937 tiveram redução do percentual de células viáveis de maneira tempo e dose – dependente ao compararmos o tratamento com o controle. Essa redução foi estatisticamente significativa a partir de 72 h com 0,1 μM de VP-16 na CCRF-CEM, em torno de 25% de redução do percentual de células viáveis ($p < 0,01$) e a partir de 72 h com 0,8 μM de VP-16 na U937, aproximadamente 50% de redução da viabilidade celular ($p < 0,001$).

Visto que a concentração clínica do fármaco VP-16 é equivalente a 1 μM , verificamos também o perfil de viabilidade celular dessas linhagens quando expostas a concentrações semelhantes a utilizada no tratamento de pacientes. Analisando a Figura 5.18 podemos perceber que a concentração mais próxima a esse valor (isto é, 0,8 μM) reduziu a viabilidade celular de forma significativa ($p < 0,001$) nos três tempos avaliados na CCRF-CEM, chegando a 70% de redução em 72 h. Na linhagem U937, a exposição a 0,8 μM de VP-16 levou a redução significativa de cerca de 50% apenas em 72 h ($p < 0,001$) e o dobro dessa concentração (1,6 μM) reduz a viabilidade celular com significância estatística em todos os tempos avaliados com $p < 0,001$.

A)



B)

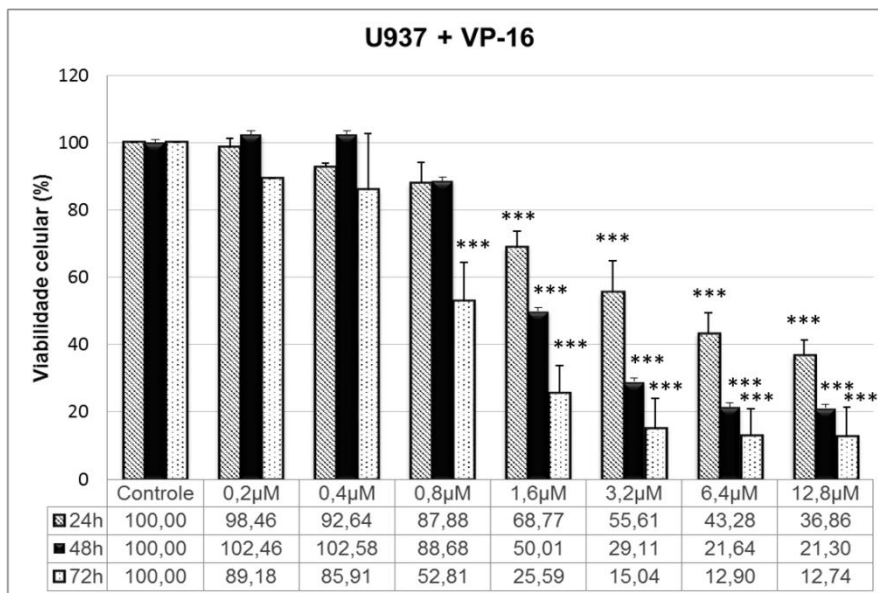


Figura 5.18: Viabilidade celular das linhagens CCRF-CEM (A) e U937 (B), avaliada por MTT após o tratamento com diversas concentrações de VP-16 por 24, 48 e 72 h. Análise estatística: ANOVA, seguido pelo pós-teste Bonferroni ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$). Os gráficos demonstram as médias e os desvios padrão de no mínimo três experimentos independentes.

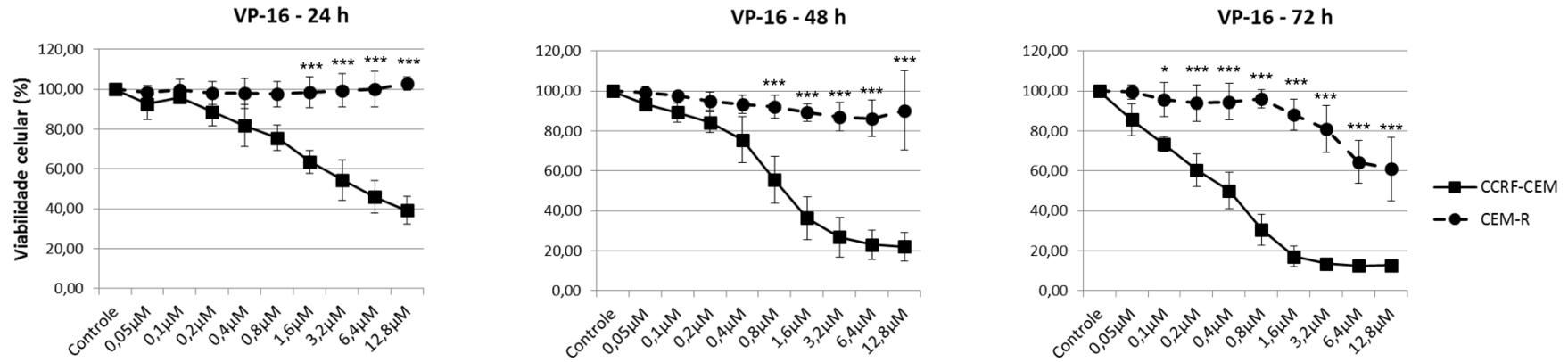
Em seguida, buscamos avaliar diferenças no perfil de viabilidade celular entre as linhagens parentais e resistentes, e, se de fato houve a aquisição do fenótipo de resistência ao VP-16, além de avaliar a potência desta resistência. Para isso, a viabilidade celular das linhagens de leucemias agudas parentais ou resistentes foi avaliada por MTT, após tratamento com diversas concentrações de VP-16 (0,05 – 12,8 μM), por 24, 48 e 72 h.

Na Figura 5.19 é possível observar que o fármaco VP-16 reduziu bastante a viabilidade celular das linhagens CCRF-CEM e U937 e com mínimas alterações na viabilidade das células CEM-R e U937-R. Estas últimas somente apresentaram redução da viabilidade quando expostas às maiores concentrações de VP-16 e nos maiores tempos do tratamento. Ainda assim, a redução máxima da viabilidade na linhagem CEM-R foi de cerca de 40% com 6,4 μM e 12,8 μM em 72 h ($p < 0,001$). Nos tempos de 24 h e 48 h praticamente não houve redução da viabilidade celular desta linhagem que permaneceu com cerca de 90 – 100% das células viáveis.

A linhagem U937-R apresentou redução da viabilidade celular nos tempos anteriores de 24 h e 48 h, no entanto, esta redução também foi restrita aos pontos de maior concentração de VP-16. Como por exemplo, na concentração de 12,8 μM a redução da viabilidade observada foi tempo-dependente, de cerca de 30%, 60% e 80% em 24 h, 48 h e 72 h, respectivamente. Todas essas reduções na viabilidade celular citadas anteriormente, assim como a redução de 40% da viabilidade celular gerada na concentração de 6,4 μM em 72 h foram estatisticamente significativas ($p < 0,001$). Com exceção desses pontos, as demais concentrações e tempos avaliados nas linhagens CEM-R e U937-R representados na Figura 5.19 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto a redução da viabilidade celular ao compararmos as linhagens resistentes com as parentais, permanecendo com cerca de 90 – 100% das células viáveis após o tratamento.

As análises estatísticas mostradas na Figura 5.19 foram realizadas entre as linhagens parentais e resistentes. Dessa maneira, a significância estatística obtida na maioria dos pontos comparados entre as linhagens parentais e resistentes comprova a diferença entre as linhagens e que a exposição a concentrações contínuas e graduais de VP-16 realmente induziu o fenótipo de resistência a esse fármaco.

A)



B)

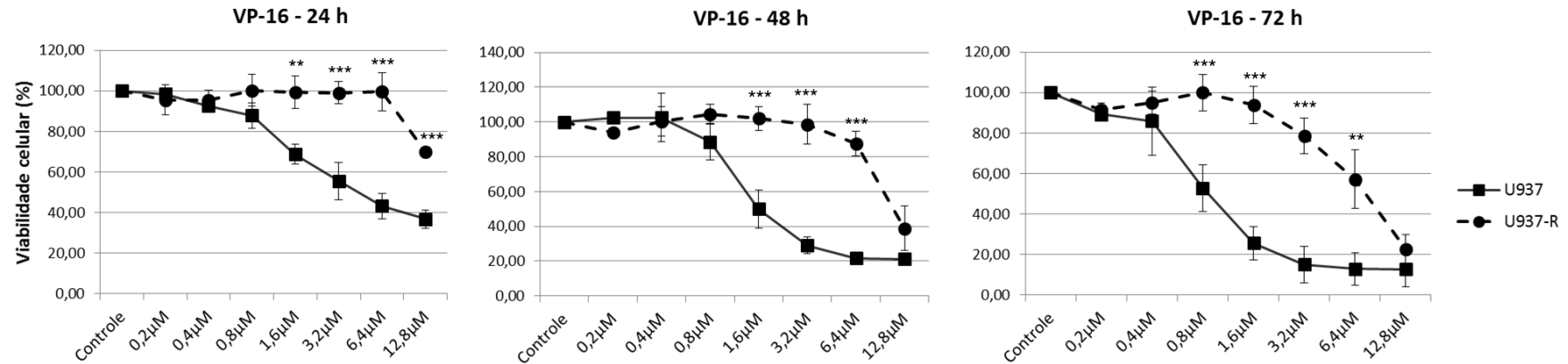


Figura 5.19: Efeito da exposição a diferentes concentrações de VP-16 durante o período de 24, 48 e 72 h na viabilidade celular das linhagens de (A) leucemia linfóide aguda parental (CCRF-CEM) e resistente (CEM-R) ao VP-16 e (B) leucemia mieloide aguda parental (U937) e resistente (U937-R) ao VP-16. As análises estatísticas (ANOVA, seguido pelo pós-teste Bonferroni) foram realizadas comparando a linhagem parental com a resistente ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$). Os gráficos demonstram as médias e os desvios padrão de no mínimo três experimentos independentes.

5.10 Potência de resistência ao etoposídeo

Com o objetivo de avaliar o nível de resistência ao VP-16, foi calculado o IC₅₀ deste fármaco nas linhagens CEM-R e U937-R. Estes dados foram comparados com os valores de IC₅₀ das linhagens CCRF-CEM e U937, respectivamente, visando estabelecer uma relação que informe o quão mais resistente ao VP-16 às linhagens desenvolvidas são quando comparadas às linhagens parentais.

A tabela da Figura 5.20 mostra que na linhagem CEM-R só foi possível calcular o IC₅₀ para o tratamento com VP-16 após 72 h. Por se tratar de uma linhagem resistente, esta não atingiu 50% da viabilidade celular nos tempos anteriores de 24 h e 48 h, inviabilizando o cálculo do IC₅₀ em tempos mais precoces. O mesmo ocorreu com a linhagem U937-R tratada com VP-16 por 24 h que não teve o IC₅₀ gerado para este ponto, uma vez que este tempo de tratamento não reduziu 50% da viabilidade celular (Figura 5.19).

Além disso, a Figura 5.20 também mostra que enquanto a linhagem parental de LLA precisa de 0,34 µM de VP-16 para reduzir à metade a viabilidade celular induzida por este fármaco em 72 h, a linhagem resistente precisa de 13,8 µM deste fármaco, no mesmo período de tempo. Logo, a concentração necessária para atingir 50% de redução da viabilidade celular é quarenta vezes maior na linhagem de LLA resistente ($13,8\mu\text{M} / 0,34\mu\text{M} = 40,6$). Isso caracteriza uma relação na qual a linhagem CEM-R é quarenta vezes mais resistente ao tratamento com VP-16 por 72 h do que a linhagem CCRF-CEM.

Da mesma forma, a diferença de concentração de VP-16 necessária para reduzir 50% da viabilidade celular nas linhagens de LMA U937 e U937-R em 72 h é de cerca de oito vezes (isto é, $7,25\mu\text{M} / 0,86\mu\text{M} = 8,4$). Logo, a linhagem U937-R é oito vezes mais resistente ao tratamento com VP-16 por 72 h, do que a linhagem U937.

A)

Valores de IC50				
Fármacos x Tempo	CCRF-CEM	CEM-R	U937	U937-R
VP-16 - 24 h	4,40	x	3,98	x
VP-16 - 48 h	0,95	x	1,62	11,20
VP-16 - 72 h	0,34	13,8	0,86	7,25

B)

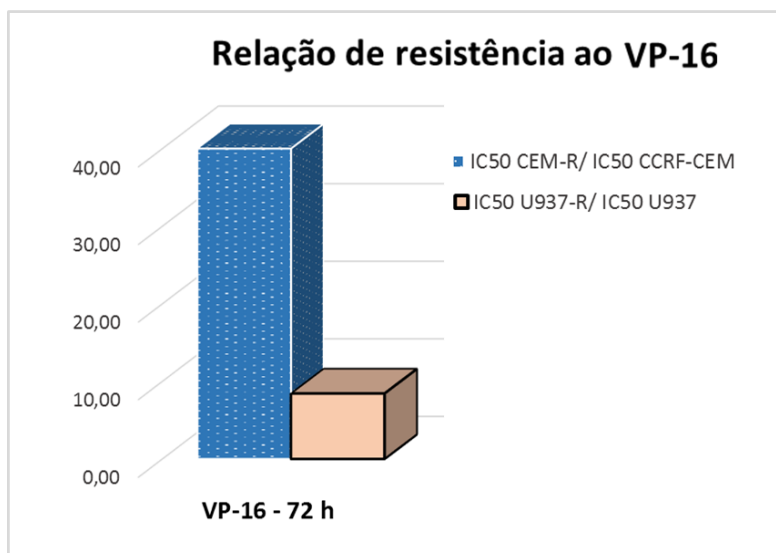


Figura 5.20: Aquisição de resistência ao etoposídeo (VP-16) pelas linhagens de leucemias agudas. A) A tabela mostra os valores de IC_{50} das linhagens CCRF-CEM, CEM-R, U937 e U937-R em resposta ao tratamento com VP-16 por 24 h, 48 h e 72 h. Os valores de IC_{50} foram calculados através de regressão não linear logística. O “x” indica que o IC_{50} não foi calculado para os pontos marcados, por não atingir 50% de viabilidade celular na condição avaliada. B) O gráfico mostra os níveis de resistência adquiridos durante o desenvolvimento das linhagens resistentes ao VP-16 através da razão entre o IC_{50} das linhagens resistentes em relação às parentais, mediante ao tratamento com VP-16 por 72 h. Unidade de concentração: μM .

5.11 Viabilidade celular das linhagens parentais e resistentes a outros quimioterápicos usados no tratamento das leucemias agudas

Uma vez que linhagens com fenótipo MDR apresentam resistência ao fármaco ao qual foram desenvolvidas e também a outros quimioterápicos ao qual não foram expostas inicialmente, avaliamos o efeito do tratamento das linhagens de leucemias agudas parentais e resistentes a outros quimioterápicos usados no tratamento de neoplasias, tais como: daunorrubicina, idarrubicina e doxorubicina (Figura 5.21).

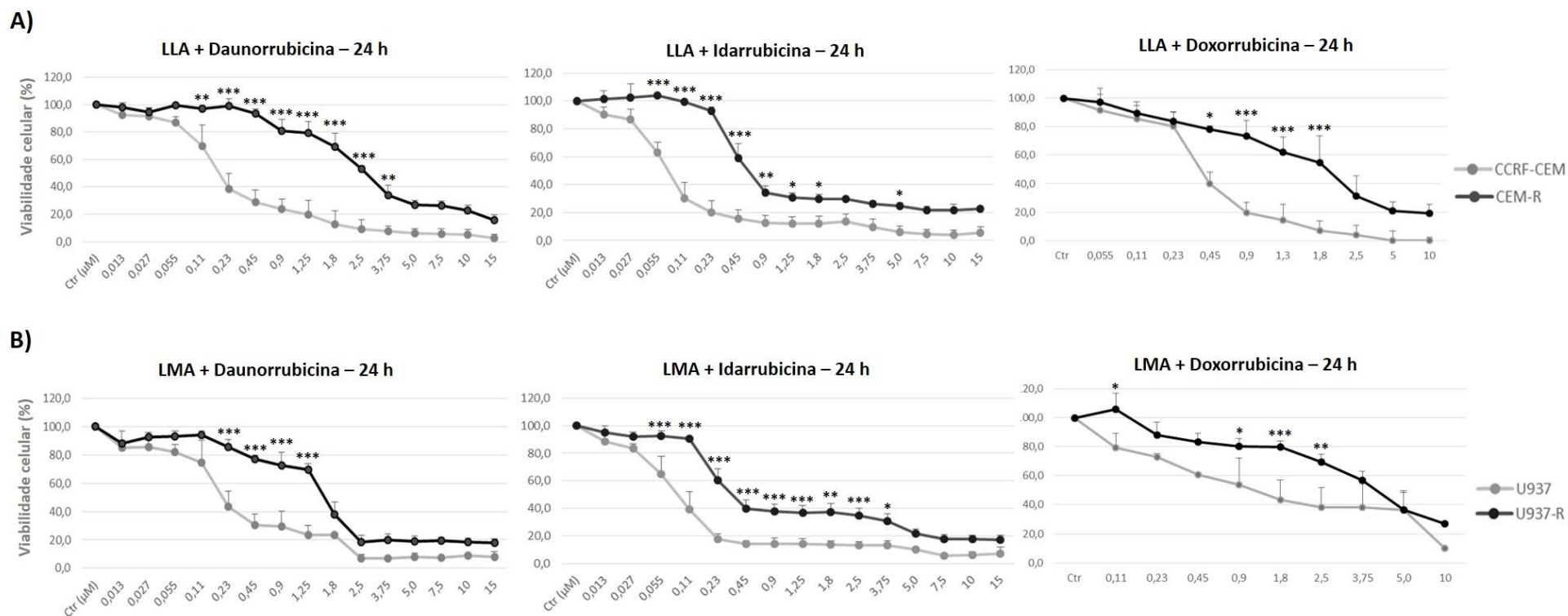


Figura 5.21: Efeito da exposição a diferentes concentrações de daunorubicina, idarrubicina e doxorubicina durante o período de 24 h na viabilidade celular das linhagens de: A) leucemia linfóide aguda parental (CCRf-CEM) e resistente (CEM-R); B) leucemia mieloide aguda parental (U937) e resistente (U937-R). As análises estatísticas (ANOVA, seguido pelo pós-teste Bonferroni) foram realizadas comparando a linhagem parental com a resistente (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). Os gráficos demonstram as médias e os desvios padrão de três experimentos independentes.

Como pode ser visualizado na Figura 5.21 as linhagens CEM-R e U937-R apresentaram uma maior resistência ao tratamento com os três fármacos avaliados do que as linhagens parentais CCRF-CEM e U937. Além disso, avaliando a redução da viabilidade celular na concentração equivalente a utilizada na clínica (1 μ M), ponto de 0,9 μ M no gráfico, é possível perceber que a redução da viabilidade celular é baixa nas linhagens resistentes. A maior redução, em torno de 65% ocorreu com a utilização da idarrubicina, no entanto, os demais fármacos induziram níveis de redução da viabilidade celular em apenas 20 – 30% com daunorrubicina e doxorrubicina nas linhagens resistentes tanto de LLA quanto de LMA.

Esses resultados reafirmam a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de pacientes resistentes a quimioterapia vigente, uma vez que aumentar a concentração desses fármacos não é uma boa opção devido a existência dos diversos efeitos colaterais.

5.12 Expressão e função das proteínas transportadoras de efluxo

As linhagens de leucemias agudas parentais e resistentes ao VP-16 foram caracterizadas quanto ao perfil MDR, a fim de verificar se haveria diferenças na expressão e função das proteínas transportadoras de efluxo Pgp e BCRP entre essas células.

Como pode ser observado na Figura 5.22 todas as linhagens avaliadas apresentaram valores de RIF acima do ponto de corte de 1,1 para os ensaios de expressão de Pgp, demonstrando que tanto as linhagens resistentes quanto as parentais, de LMA e LLA, expressam essa proteína. Contudo, as linhagens resistentes ao VP-16 (U937-R e CEM-R) apresentaram um aumento na expressão da Pgp quando comparadas às linhagens parentais. Esse aumento foi principalmente evidenciado na linhagem U937-R que passou a expressar 15 vezes mais a proteína Pgp do que a linhagem parental U937. A linhagem CEM-R teve um aumento de 2,4 vezes na expressão da Pgp quando comparada à linhagem parental CCRF-CEM (Figura 5.22).

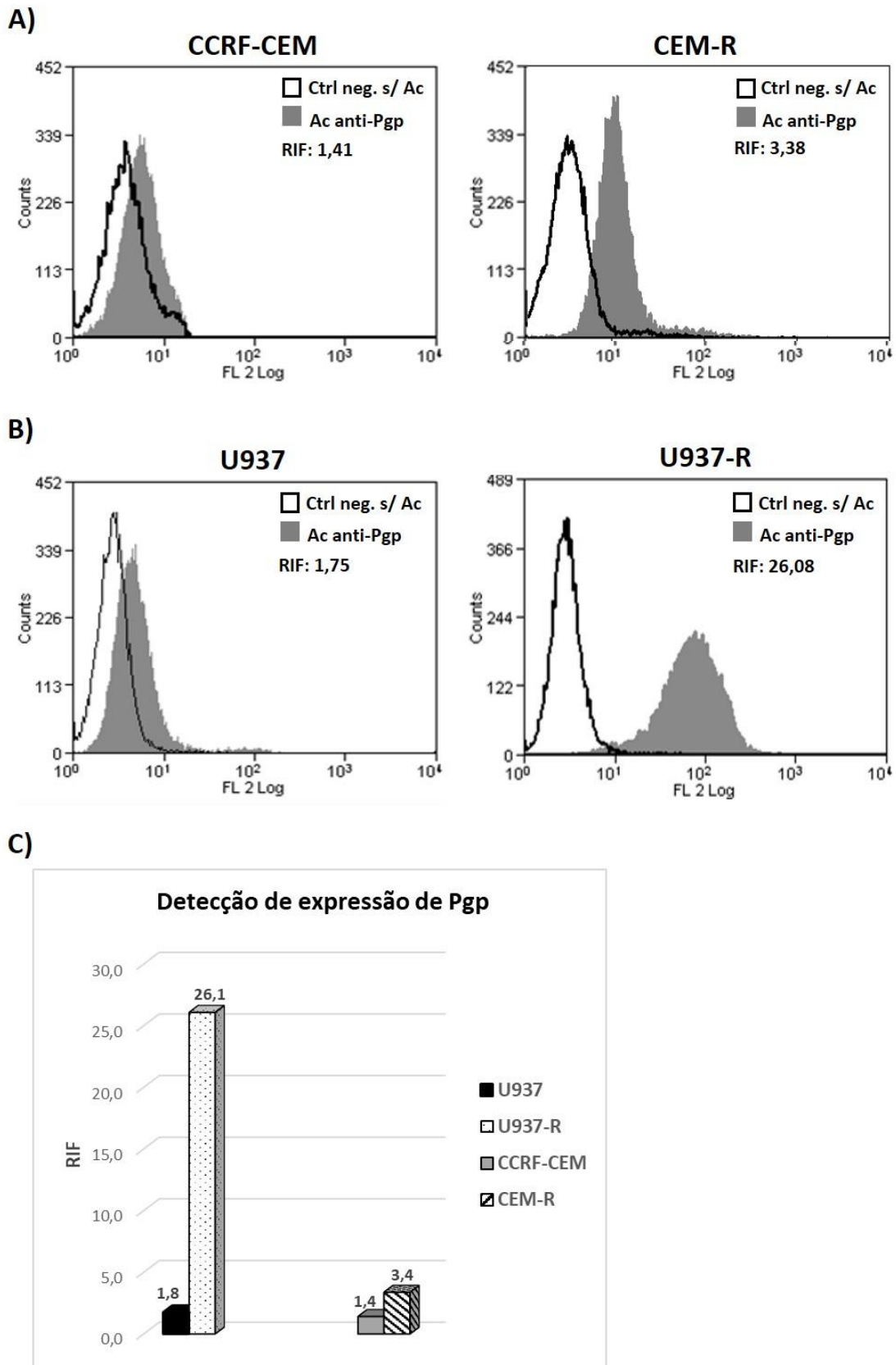


Figura 5.22: Expressão da proteína transportadoras de efluxo Pgp avaliada por citometria de fluxo nas linhagens de LLA (A) e LMA (B). Gráfico representativo de três experimentos independentes com os percentuais de expressão de Pgp (C). RIF: valores da razão das médias de intensidade de fluorescência. Valores de RIF $\geq 1,1$ são considerados positivos para a expressão de Pgp.

Este resultado tem potencial relevância para a caracterização das linhagens resistentes, visto que a Pgp está associada ao fenômeno MDR por atuar na extrusão ative fármacos para o meio extracelular, evitando que estes se acumulem no interior da célula e, por conseguinte, reduzindo o efeito dos mesmos (FUKUDA & SCHUETZ, 2012; TEW, 2012). Dessa forma, seguimos na caracterização do perfil MDR e passamos a investigar se essas linhagens, bem como as linhagens parentais, possuíam também a proteína Pgp ativa e funcional. Além da Pgp também verificamos se a proteína BCRP estava com a sua função de extrusão de xenobióticos ativa nas linhagens resistentes e parentais de leucemias agudas. Para isso, foram feitos ensaios visando investigar a atividade das proteínas Pgp e BCRP na extrusão de corantes fluorescentes e, então, mensurar a atividade destas proteínas como bombas de efluxo.

Nesses ensaios foi verificado que a Pgp estava ativa nas linhagens de LLA avaliadas, tanto na parental quanto na resistentes ao VP-16. No entanto, os valores de RIF gerados estavam no limiar ou levemente acima do ponto de corte ($RIF \geq 1,1$) para considerar a positividade para o ensaio funcional. Portanto, esse não parece ser o mecanismo majoritário para a aquisição do fenótipo de resistência presente na linhagem CEM-R, que chega a ser 40 vezes mais resistente do que a CCRF-CEM nos ensaios de viabilidade celular com VP-16 (Figura 5.20). Além disso, as linhagens de LMA avaliadas não apresentaram a proteína Pgp funcional, visto que a mesma não exibiu atividade de extrusão dos corantes fluorescentes na linhagem parental, assim como na resistente ($RIF < 1,1$) (Figura 5.23a). Apesar da linhagem U937-R expressar 15 vezes mais a proteína Pgp em relação à linhagem parental, isso não resultou em uma maior atividade desta proteína como bomba de efluxo.

Em relação à atividade da BCRP esta foi encontrada ativa em todas as linhagens de leucemias agudas avaliadas, tanto na LLA quanto na LMA, incluindo as células resistentes e parentais. Contudo, os valores de RIF encontrados também estavam no limiar ou levemente acima do ponto de corte ($RIF = 1,2$ na CCRF-CEM e na CEM-R e $RIF = 1,1$ na U937 e U937-R) e não foram alterados entre as linhagens resistentes comparadas às parentais (Figura 5.23b).

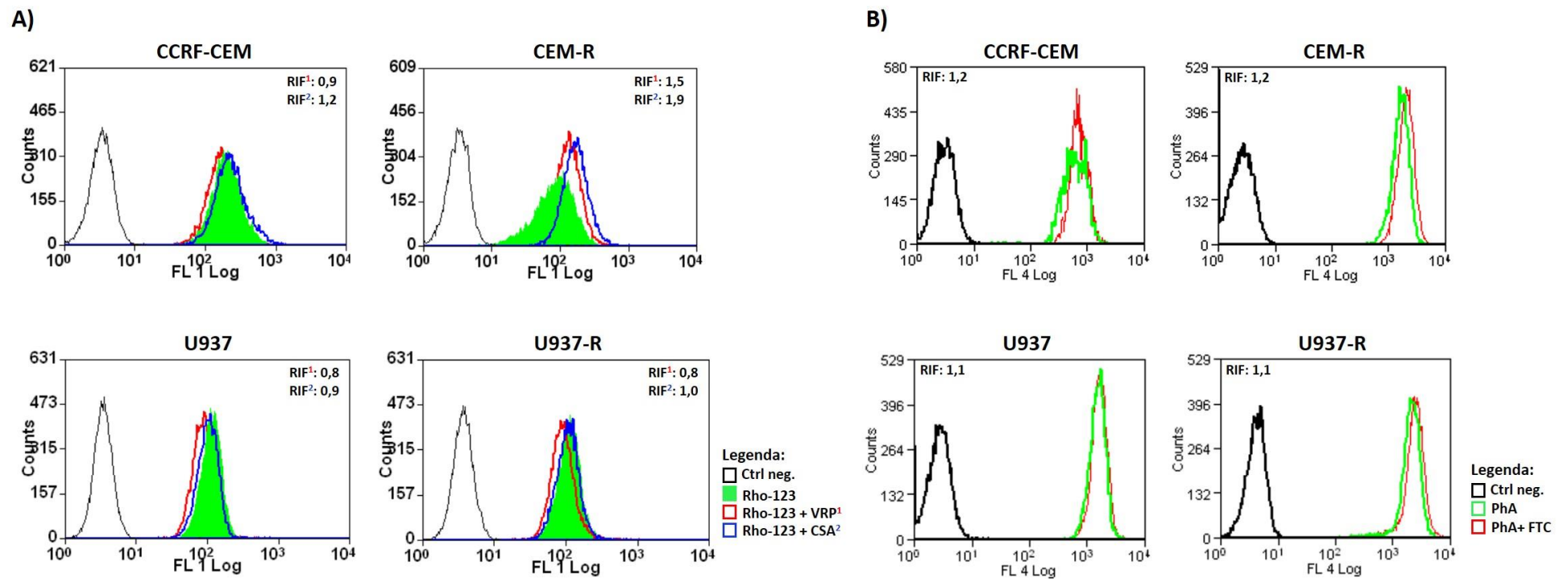


Figura 5.23: Avaliação por citometria de fluxo da atividade das proteínas transportadoras de efluxo Pgp (A) e BCRP (B) na função de extrusão de corantes fluorescentes nas linhagens de leucemia linfóide aguda (LLA) e leucemia mielóide aguda (LMA). Rho-123: Rodamina-123; VRP: Verapamil; CSA: Ciclosporina A; PhA: Pheophorbide A e FTC: Fumitremorgin C; RIF: valores da razão das médias de intensidade de fluorescência. Gráficos representativos de três experimentos independentes com os valores de RIF para a atividade de Pgp e BCRP. Valores de RIF $\geq 1,1$ são considerados positivos para a função de bombas de efluxo.

Esses dados demonstram que os níveis aumentados de expressão da Pgp detectados nas linhagens resistentes, especialmente os altos níveis de Pgp encontrados na U937-R, não estão associados à sua função como proteína transportadora de efluxo. Da mesma forma não há um aumento na atividade de extrusão de moléculas pela proteína BCRP entre as linhagens resistentes e parentais, tanto de LLA quanto de LMA, sugerindo que a aquisição do fenótipo de resistência apresentado por estas linhagens é independente do efluxo de fármacos ocasionado pelas proteínas transportadoras da família ABC.

Apesar do papel clássico da Pgp ser associado à extrusão de fármacos, diversos trabalhos relataram uma influência direta da Pgp na função de proteínas envolvidas em vias de regulação, incluindo a progressão da apoptose (PALLIS *et al.*, 2000; RUEFLI; JOHNSTONE, 2003; JOHNSTONE *et al.*, 2000; FLETCHER *et al.*, 2010; BREIER *et al.*, 2013). A atividade anti-apoptótica mediada pela Pgp protege as células neoplásicas da ação dos quimioterápicos e vem sendo atribuída à interferência na formação do complexo de sinalização de indução de morte celular na membrana plasmática, a supressão de ativação de caspases (IDRISS *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2011) e à alteração na regulação de p53 (HE *et al.*, 2010).

Em relação à proteína BCRP a sua detecção já foi associada à resistência às antraciclinas (fármacos que atuam inibindo as topoisomerasas) (SARGENT *et al.*, 2001) e foi correlacionada a um pior prognóstico de pacientes com LMA, incluindo resistência a quimioterapia (STEINBACH *et al.*, 2002; BENDERRA *et al.*, 2004; SUVANNASANKHA *et al.*, 2004). Contudo, como pode ser visualizado na Figura 5.23, todas as linhagens de LMA e LLA avaliadas, apesar de positivas para BCRP apresentaram baixos níveis de atividade desta proteína (variação de RIF entre 1,1 a 1,2). Esses resultados nos levam a questionar o quanto a evidência da presença e função destas proteínas transportadoras de efluxo de fato contribui para o desenvolvimento do fenótipo de resistência nas linhagens U937-R e CEM-R.

Outros trabalhos com indução de resistência aos inibidores de topoisomerasas já relataram que os altos níveis de resistência foram alcançados como resultado da sinergia entre os níveis reduzidos de RNAm de Topo II α , acompanhado por uma diminuição da atividade desta enzima, e podendo estar associados ou não a superexpressão de bombas de efluxo (MATSUMOTO *et al.*, 2001). Logo, é provável

que a indução de resistência através da adaptação celular a uma pressão crescente de exposição à farmacos, utilize mais do que um mecanismo.

5.13 Perfil de expressão das proteínas topoisomerases e da família Akt

Após a investigação dos níveis de expressão e função das proteínas transportadoras de efluxo, observamos que a aquisição da resistência ao VP-16 parece não estar associada somente a estas proteínas classicamente associadas ao perfil MDR. Sabendo-se que o VP-16 tem como alvo a inibição da enzima Topo II, analisamos os níveis de expressão proteica das DNA topoisomerases.

Para tanto avaliamos por *western blot* os níveis das proteínas hTopo I, hTopo II α e hTopo II β . A Figura 5.24a mostra redução no nível proteico de hTopo II α e hTopo II β na linhagem CEM-R comparada à linhagem parental. Em relação à hTopo I foi observado um efeito oposto, isto é, aumento do conteúdo desta proteína na linhagem resistente.

O aumento do nível de expressão da hTopo I em um cenário onde há baixos níveis de hTopo II α e hTopo II β sugere a ocorrência de uma compensação nos níveis de hTopo I quando hTopo II está alterada. Como as enzimas topoisomerases são essenciais para diversos processos relacionados ao crescimento e divisão celular, esse mecanismo de compensação parece ser importante para garantir a viabilidade das células que entrariam em colapso caso houvesse redução ao mesmo tempo de todas as proteínas topoisomerases. Essa correlação já foi visualizada em outros estudos, no qual a diminuição nos níveis de Topo II α foi compensada por um aumento dos níveis de Topo I em células P388 (leucemia em camundongos) resistentes a m-AMSA (TAN *et al.*, 1989). A correlação inversa também foi observada em células estaminais cancerosas. Neste modelo, a diminuição da atividade de Topo I levou a redução da sensibilidade a camptotecina, inibidor de Topo I, e esta foi acompanhada pelo aumento da atividade de Topo II α e maior sensibilidade ao etoposídeo, inibidor de Topo II α (PELEG *et al.*, 2014). A existência dessa correlação pode ser interessante para aprimorar o tratamento de pacientes resistentes, com a inclusão de fármacos que tenham a Topo I como alvo.

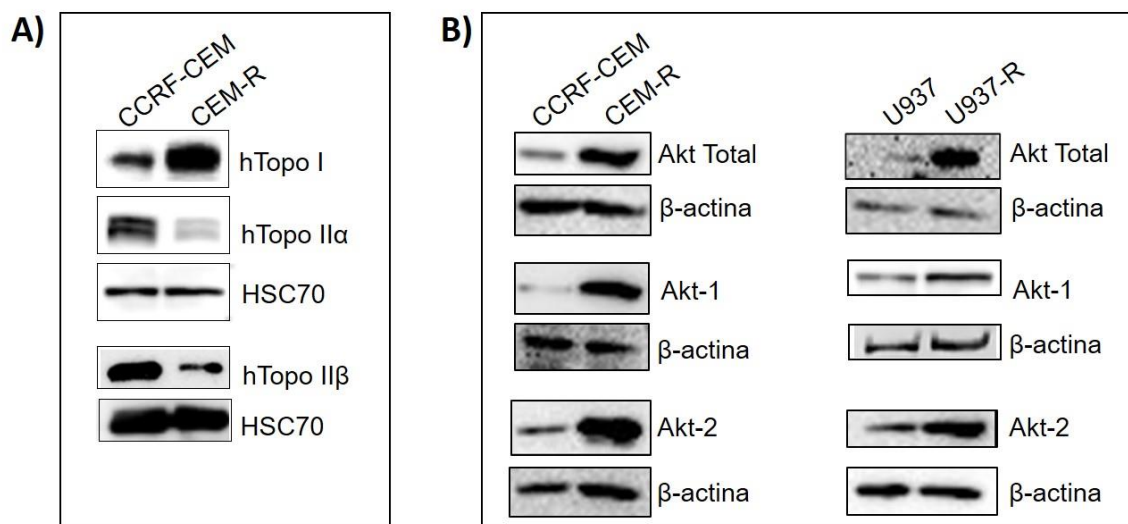


Figura 5.24: Análise do conteúdo proteico das DNA topoisomerases (A) e das proteínas da família Akt (B) nas linhagens de leucemias agudas resistentes comparadas às parentais. A expressão de HSC-70 ou de β -actina foi utilizada como controle endógeno para a expressão das DNA topoisomerases e das proteínas da família Akt, respectivamente. Figura representativa de três experimentos independentes.

Em seguida foi feita a avaliação de proteínas da família Akt, uma vez que essas proteínas estão envolvidas com a maior sobrevivência celular e costumam estar constitutivamente ativadas na maioria das neoplasias, incluindo as leucemias agudas que superexpressam Akt (GRANDAGE *et al.*, 2005). Como pode ser observado na Figura 5.24b, tanto a proteína Akt total quanto as suas isoformas Akt-1 e Akt-2 encontram-se mais expressas nas linhagens resistentes CEM-R e U937-R quando comparadas às linhagens parentais CCRF-CEM e U937. Esse aumento sugere uma contribuição para a resistência terapêutica dessas linhagens. Já foi visto tanto em células de LMA primária quanto em linhagens celulares que a ativação de Akt protege as células contra os agentes quimioterapêuticos, incluindo citarabina e etoposídeo (FRANSECKY; MOCHMANN; BALDUS, 2015), destacando o papel da via de Akt na resistência à quimioterapia. Portanto, esses resultados sugerem uma contribuição dos alvos DNA topoisomerases (II α e II β) e Akt (tanto a total quanto suas isoformas -1 e -2) na contribuição para o desenvolvimento do fenótipo MDR dessas linhagens.

5.14 Perfil de expressão dos microRNAs miR-23a, miR-143 e miR-485-3p nas linhagens de leucemias agudas parentais e resistentes ao etoposídeo

Uma vez que as análises do perfil de expressão proteica das DNA topoisomerasas mostraram alterações nos níveis destas enzimas, fomos investigar se estas alterações poderiam ser consequência de modificações pós-traducionais. Para tanto, analisamos os níveis de expressão de microRNAs associados à regulação direta ou indireta de Topo II α e Topo II β . Para isso, avaliamos os níveis de expressão dos microRNAs miR-23a, miR-143 e miR-485-3p nas linhagens de leucemias agudas, parentais e resistentes ao VP-16, por PCR em tempo real.

Conforme pode ser observado na Figura 5.25a, o nível de expressão do miR-143 apresentou um grande aumento nos dois experimentos realizados tanto na linhagem U937-R (aumento de cerca de 115 e 40 vezes em cada experimento) quanto na linhagem CEM-R (aumento de 4,7 e 3,2 vezes) comparadas às linhagens parentais. O miR-143 se liga à região 3' UTR de Topo II α , regulando diretamente a tradução desta proteína. Logo, o aumento desse microRNA leva à redução traducional da Topo II α . Alguns trabalhos já associaram os altos níveis do miR-143 com a redução da expressão de Topo II α , além da redução de proliferação celular e resistência a quimioterapia (UGRAS *et al.*, 2011; SRIKANTAN *et al.*, 2011). Srikantan e colaboradores mostraram que o controle da tradução de Topo II α influencia na eficácia do tratamento com doxorrubicina, uma vez que após a redução dos níveis de Topo II α em células HeLa, em consequência da superexpressão de microRNAs com alvo em Topo II α , estas células tornaram-se resistentes ao tratamento.

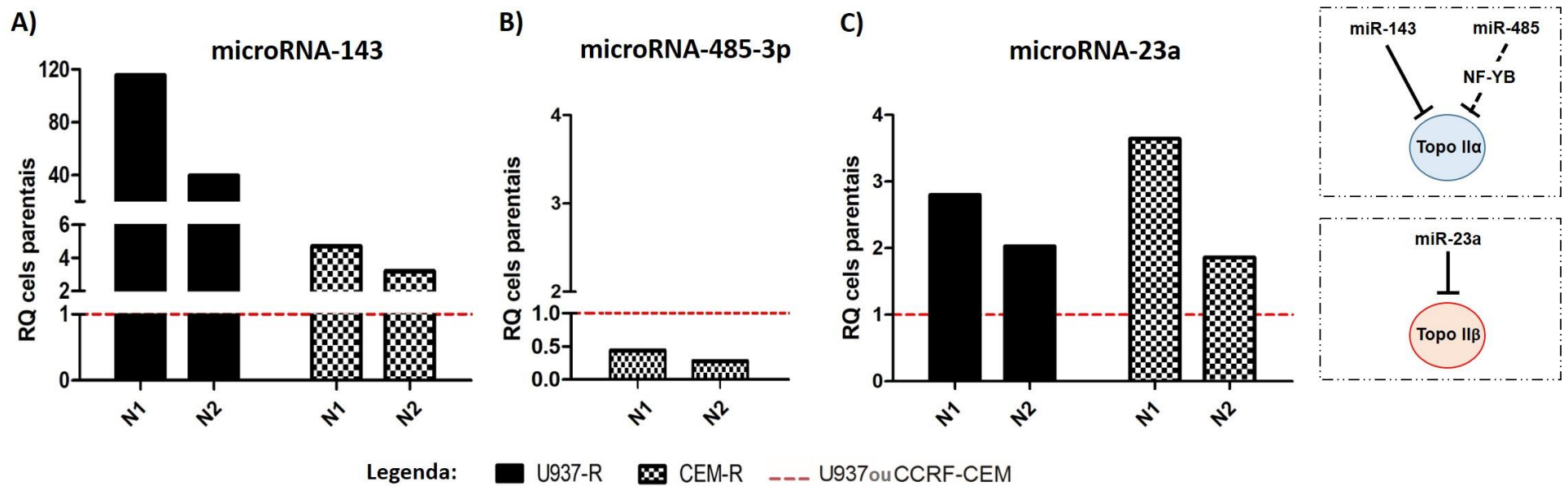


Figura 5.25: Níveis de expressão do microRNA-143 (A), microRNA-485-3p (B) e microRNA-23a (C) nas linhagens de leucemias agudas resistentes U937-R e CEM-R em relação às parentais U937 e CCRF-CEM, respectivamente. RQ: expressão relativa dos microRNAs às linhagens parentais. As expressões dos microRNAs foram normalizadas com o endógeno RNU6b. Os gráficos demonstram dois experimentos independentes nas linhagens de LMA e LLA (N1 e N2) por PCR em tempo real, para cada microRNA. A linha pontilhada em magenta indica o nível de expressão dos microRNAs da linhagem parental utilizada como referência. As caixas a direita destacam o mecanismo de ação dos microRNAs avaliados que se ligam diretamente (miR-143) ou indiretamente (miR-485) ao alvo Topo II α e diretamente ao alvo Topo II β (miR-23a).

Outro microRNA avaliado foi o miR-485-3p que se encontra reduzido na linhagem CEM-R quando comparada à linhagem parental CCRF-CEM, apresentando valores de expressão de 0,4 e 0,3 em cada experimento. Isso representa uma redução de 60 e 70% em relação à linhagem parental, cuja expressão é referenciada como 1,0 ou 100% de expressão (Figura 5.25b).

Este microRNA atua na inibição de Topo II α de forma indireta, uma vez que sua ligação ocorre no sítio 3' UTR do fator de transcrição NF-YB, reduzindo a expressão deste. Por sua vez, NF-YB regula negativamente a expressão de Topo II α , de forma que quando os níveis de NF-YB estão altos, os níveis de Topo II α estão baixos e vice-versa (CHEN *et al.*, 2011). Logo, com a redução da expressão do miR-485-3p, como vimos nesse trabalho, há um aumento dos níveis de NF-YB e conseqüentemente uma diminuição dos níveis de Topo II α . Chen e colaboradores observaram que em células de LLA resistentes ao teniposídeo, e em células de rabdosarcoma resistentes ao etoposídeo, ocorria baixa expressão do miR-485-3p, um aumento de NF-YB e baixos níveis proteicos de Topo II α . Além disso, esse efeito foi revertido após a superexpressão deste microRNA (CHEN *et al.*, 2011). Alguns trabalhos na literatura têm associado os baixos níveis deste microRNA com níveis reduzidos de Topo II α , perfil MDR, além de estarem associados a regulação da proliferação celular, apoptose, migração e metástase em tumores sólidos (CHEN *et al.*, 2011; FORMOSA *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2013; LOU *et al.*, 2016).

Também avaliamos o envolvimento da Topo II β para o fenótipo de resistência através da análise do miR-23a que se liga diretamente à região 3' UTR dessa enzima, regulando a tradução da proteína Topo II β . Como pode ser observado na Figura 5.25c, o nível de expressão do miR-23a aumentou em ambas as linhagens resistentes avaliadas. Na linhagem U937-R esse aumento foi de 2,8 e 2 vezes em cada um dos dois experimentos realizados e na linhagem CEM-R o aumento foi de 3,6 e 1,9 vezes em cada experimento comparados às linhagens parentais. Diversos trabalhos já associaram os altos níveis do miR-23a com a redução da expressão de Topo II β , sendo considerado um agente da quimiorresistência e um marcador da progressão tumoral (PENG *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2011; PÉREZ-SAYÁNS *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2010).

Estes resultados (altos níveis de miR-143 e miR-23a e baixos níveis de miR-485-3p nas linhagens resistentes) sugerem um papel das enzimas topoisomerasas, mais especificamente da Topo II, no fenótipo de resistência apresentados pelas células U937-R e CEM-R.

Já foi descrito que a maioria das linhagens celulares resistentes a inibidores de topoisomerasas apresentam essa resistência mediada por alterações nessas enzimas (baixos níveis de RNAm, mutações e atividade reduzida da enzima) (HOLOHAN *et al.*, 2013; VASSETZKY *et al.*, 1995; MATSUMOTO *et al.*, 2001). No entanto, pouco se sabe sobre o papel dos microRNAs na aquisição deste fenótipo de resistência. Neste trabalho demonstramos a ocorrência de modificações pós-traducionais, como alteração na expressão de microRNAs que regulam as enzimas topoisomerasas, o que sugere uma relação dessas modificações pós-traducionais com a indução de resistência nas linhagens de LMA e LLA avaliadas.

Parte III: Efeito antineoplásico (incluindo anti-MDR) dos novos compostos nas linhagens resistentes

5.15 Atividade citotóxica dos compostos LQB-118, LQB-223 e Ácido Pomólico nas linhagens de leucemias agudas resistentes *versus* parentais

Os inibidores de topoisomerase que atuam estabilizando o complexo de clivagem (inibidores *poison*), como etoposídeo, camptotecina e diversas antraciclinas são amplamente empregados no tratamento das leucemias. No entanto, diversos pacientes apresentam resistência a estes inibidores. Neste contexto, torna-se essencial o desenvolvimento de novos compostos antitumorais efetivos sobre as células resistentes à quimioterapia.

Como os compostos LQB-118, LQB-223 e Ácido Pomólico mostraram inibir bioquimicamente as DNA topoisomerasas, através de um mecanismo de ação diferente dos inibidores destas enzimas utilizados na clínica (inibidores *poison* de topoisomerasas), resolvemos avaliar o potencial citotóxico destes compostos nas linhagens de leucemias agudas parentais e resistentes ao VP-16. Para tanto, a viabilidade celular dessas linhagens foi avaliada por MTT após o tratamento com diversas concentrações destes compostos por 24, 48 e 72 h (Figura 5.26 e Figura 5.27).

As análises estatísticas foram feitas comparando as linhagens parentais com as resistentes, com a finalidade de verificar se as diferenças de viabilidade celular entre essas linhagens seriam estatisticamente significativas. Como pode ser observado na Figura 5.26, os tratamentos com os compostos LQB-118 e LQB-223 não resultaram em diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das

concentrações, e em nenhum dos tempos avaliados, entre as linhagens de LLA parental e resistente. Isto comprova a hipótese de que esses compostos atuam inviabilizando ambas as linhagens a despeito de seu perfil de resistência.

O tratamento com o composto AP nas linhagens de LLA (Figura 5.26) e de LMA (Figura 5.27) apresentou diversos pontos com diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) entre as curvas referentes às linhagens parentais e resistentes ao VP-16. Isso indica que este composto atuou na redução da viabilidade celular de maneira diferente entre as linhagens parentais e resistentes ao VP-16. Isto é, a redução da viabilidade celular da linhagem resistente foi menor do que a redução na linhagem parental para uma mesma concentração e tempo de tratamento com AP. Ainda assim, em altas concentrações e principalmente em maiores tempos, o AP reduziu a viabilidade das células resistentes em até 80% na linhagem resistente de LLA (CEM-R), no tempo de 72 h (concentrações de 5 – 20 μM) (Figura 5.26). No entanto, na linhagem resistente de LMA (U937-R), o tratamento com a maior concentração e nos maiores tempos de exposição ao fármaco (20 μM de AP durante 48 h e 72 h) levou a redução de no máximo 40% da viabilidade celular (Figura 5.27).

Em relação ao tratamento com os compostos LQB-118 e LQB-223 nas linhagens de LMA (Figura 5.27), o perfil de resposta também apresentou alguns pontos com diferenças estatísticas significativas ($p < 0,01$) entre as curvas referentes às linhagens parentais e resistentes ao VP-16. No entanto, os compostos LQB-118 e LQB-223 reduziram a viabilidade das células resistentes até cerca de 90% e 80% respectivamente, nas linhagens de LMA tratadas com concentrações a partir de 6,25 μM desses compostos, nos tempos de 48 h e 72 h (Figura 5.27). Nas linhagens de LLA, o tratamento com LQB-118 e LQB-223 reduziu a viabilidade das células resistentes com a mesma potência com que reduziu as células parentais em todas as concentrações e tempos avaliados, de forma que não houve diferenças estatísticas significativas entre esses tratamentos (Figura 5.26).

Estes resultados indicam uma maior atividade dos compostos LQBs nas células resistentes comparados ao AP. Enquanto o tratamento com o AP não atingiu 50% de redução da viabilidade das células de LMA resistentes, os LQBs promoveram altos níveis de redução da viabilidade celular, em torno de 90%. Isso sugere uma maior capacidade em contornar os mecanismos MDR apresentados pelos LQBs e, portanto, seguiremos com eles para melhor investigar seu mecanismo de ação nos próximos experimentos.

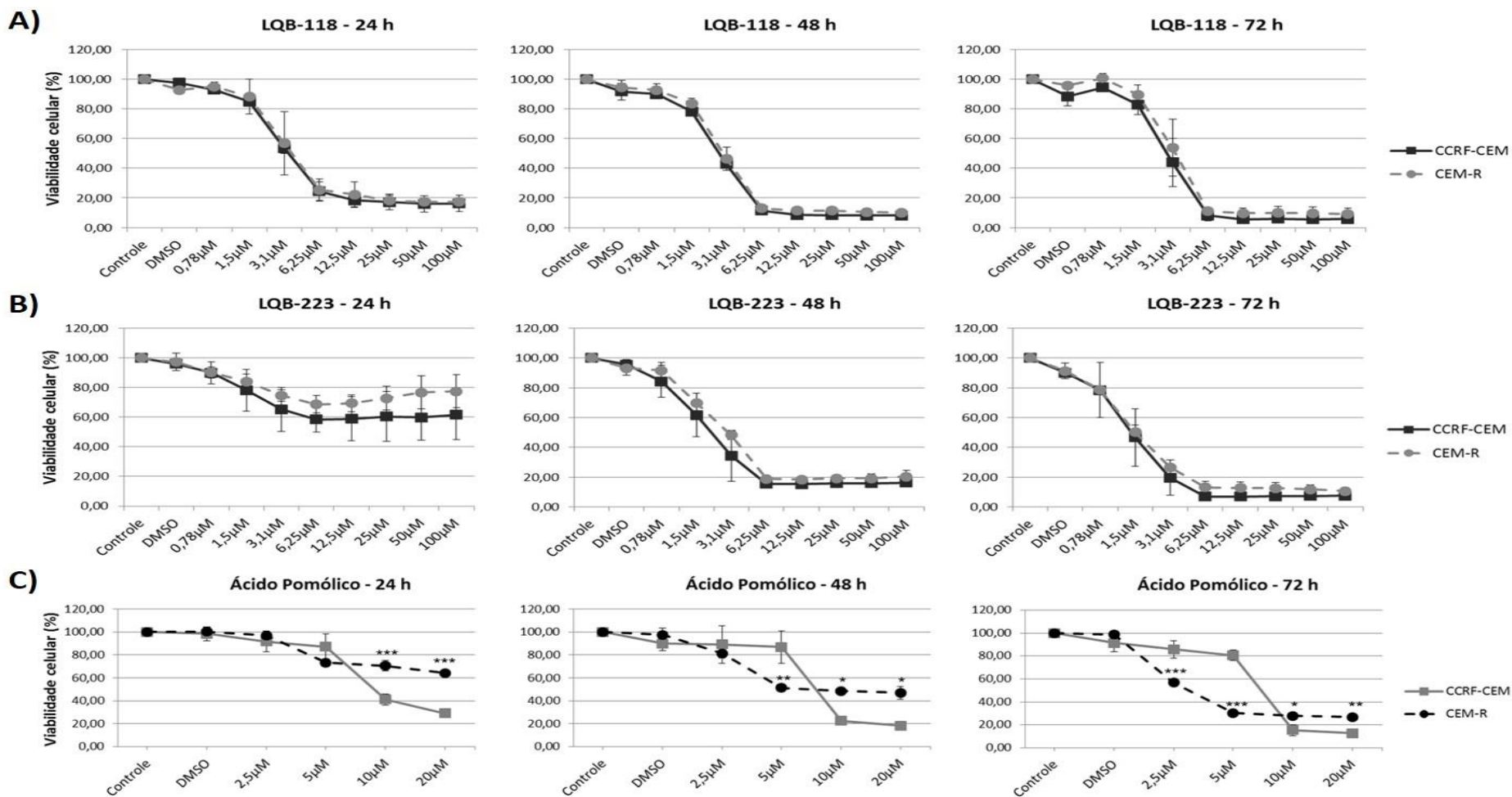


Figura 5.26: Efeito citotóxico dos compostos LQB-118 (A), LQB-223 (B) e Ácido Pomólico (C) após 24, 48 e 72 h de análise da viabilidade celular por MTT nas linhagens de leucemia linfóide aguda (LLA) parental (CCRF-CEM) e resistente (CEM-R) ao etoposídeo. As análises estatísticas (ANOVA, seguido pelo pós-teste Bonferroni) foram realizadas comparando a linhagem parental com a resistente (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). Os gráficos demonstram as médias de no mínimo três experimentos independentes.

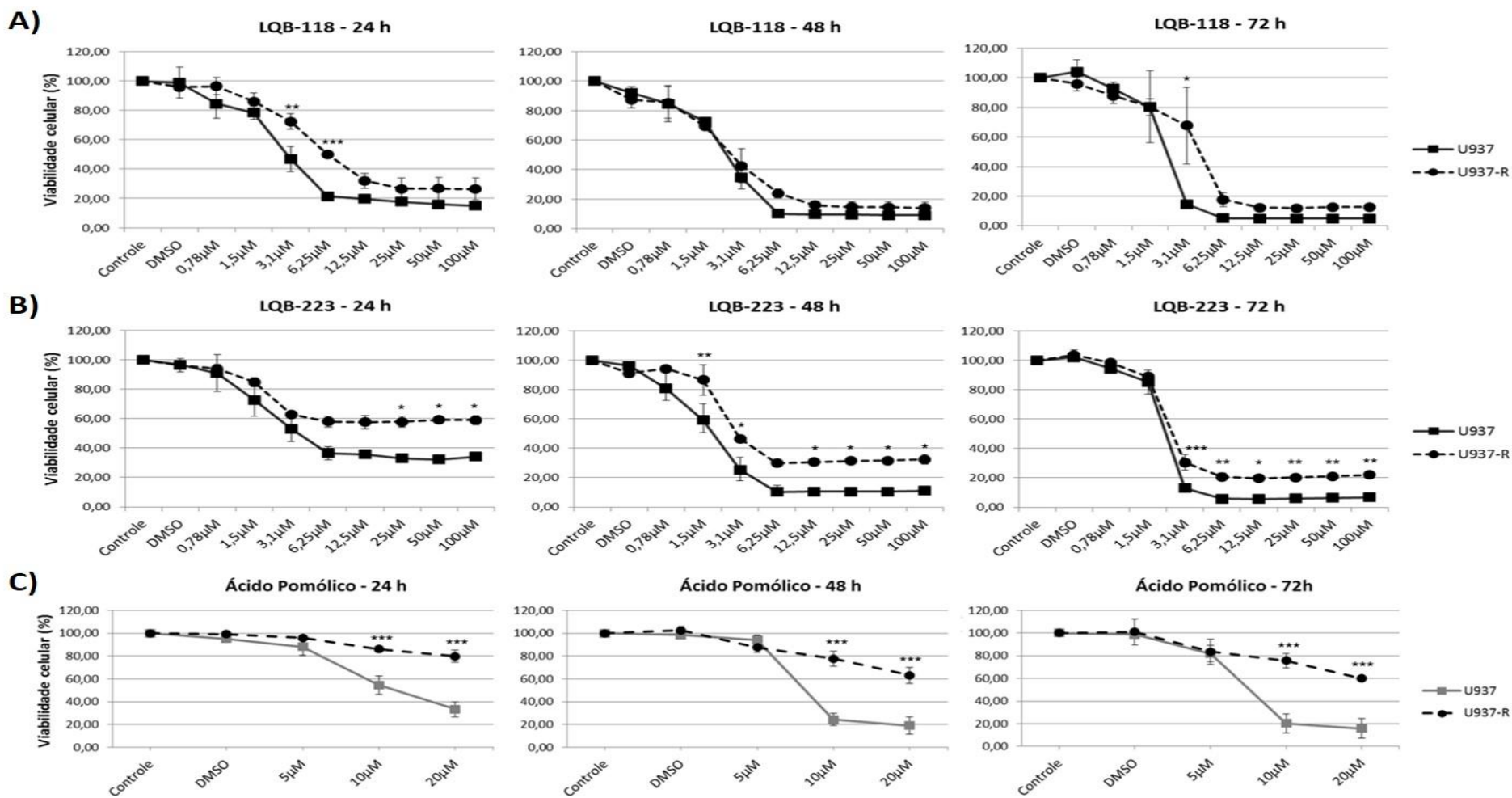


Figura 5.27: Efeito citotóxico dos compostos LQB-118 (A), LQB-223 (B) e Ácido Pomólico (C) após 24, 48 e 72 h de análise da viabilidade celular por MTT nas linhagens de leucemia mieloide aguda (LMA) parental (U937) e resistente (U937-R) ao etoposídeo. As análises estatísticas (ANOVA, seguido pelo pós-teste Bonferroni) foram realizadas comparando a linhagem parental com a resistente (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). Os gráficos demonstram as médias de no mínimo três experimentos independentes.

5.16 Potencial dos compostos LQB-118 e do LQB-223 na inibição das linhagens de leucemias agudas resistentes *versus* parentais

A fim de avaliar a potência de inibição dos compostos LQBs, foi calculado o IC₅₀ destes compostos nas linhagens CEM-R e U937-R e estes dados foram comparados com os valores de IC₅₀ das linhagens CCRF-CEM e U937, respectivamente.

A Tabela 5.2 mostra que para o composto LQB-223 não foi possível calcular o IC₅₀ para o tratamento por 24 h nas linhagens CCRF-CEM, CEM-R e U937-R, pois estas não atingiram 50% da viabilidade celular neste tempo de tratamento inicial. Além disso, a Tabela 5.2 também mostra que os valores de IC₅₀ calculados tanto para o composto LQB-118, quanto para o LQB-223 foram, na maioria dos pontos avaliados, muito semelhantes entre as linhagens parentais e resistentes ao VP-16. Deve-se ressaltar que a linhagem CEM-R é quarenta vezes mais resistente ao VP-16 e a linhagem U937-R é oito vezes mais resistente a este mesmo fármaco, comparadas às linhagens parentais (Figura 5.20). Portanto, a proximidade entre os valores de IC₅₀ calculados para o tratamento com os LQBs nas linhagens parentais e resistentes, demonstra que esses compostos foram capazes de sobrepujar o mecanismo de resistência e, portanto, conseguiram reduzir a viabilidade celular das linhagens resistentes ao VP-16 em níveis semelhantes aos das linhagens parentais.

Tabela 5.2: Cálculo dos valores de IC₅₀ das linhagens CCRF-CEM, CEM-R, U937 e U937-R em resposta ao tratamento com LQB-118 e LQB-223 por 24 h, 48 h e 72 h. Unidade de concentração: µM.

Valores de IC ₅₀				
Fármacos x Tempo	CCRF-CEM	CEM-R	U937	U937-R
LQB-118 - 24 h	3,3	3,40	2,89	6,01
LQB-118 - 48 h	2,73	2,88	2,34	2,51
LQB-118 - 72 h	2,81	3,16	2,08	3,81
LQB-223 - 24 h	x	x	3,23	x
LQB-223 - 48 h	1,94	2,57	1,81	2,88
LQB-223 - 72 h	1,42	1,51	2,10	2,21

Obs: Os valores de IC₅₀ foram calculados através de regressão não linear logística. O “x” indica que o IC₅₀ não foi calculado para esse ponto por não atingir 50% de viabilidade na condição avaliada.

Após o cálculo do IC₅₀ foram escolhidas as concentrações e os tempos utilizados para o tratamento das linhagens de LMA e LLA parentais e resistentes ao VP-16 para os ensaios de ciclo celular e indução de morte celular.

Para o tratamento das linhagens U937 e U937-R, foram escolhidas as concentrações de 3 µM e 6 µM dos compostos LQB-118 e LQB-223 no tempo de 24 h. O tratamento das linhagens CCRF-CEM e CEM-R foi avaliado com as concentrações de 1,5 µM, 3 µM e 6 µM dos compostos LQB-118 e LQB-223 no tempo de 48 h.

5.17 Efeito dos compostos LQB-118 e LQB-223 na indução de morte celular nas linhagens de leucemias agudas resistentes *versus* parentais

A investigação da taxa de indução de morte celular pelos compostos LQB-118 e LQB-223 foi feita pelo ensaio de Anexina V/Pi e por quantificação de indução de fragmentação do DNA por citometria de fluxo, nas linhagens de LMA e LLA parentais e resistentes ao VP-16, após o tratamento com esses compostos por 24 ou 48 h.

O tratamento por 48 h com 3µM e 6 µM de LQB-118 ou de LQB-223 nas linhagens de LLA resultou em aproximadamente 20% e 60% de marcação celular positiva para Anexina V, respectivamente (Figura 5.28). Em relação às linhagens de LMA, 24 h de tratamento com 3µM e 6 µM de LQB-118 ou de LQB-223 resultou em aproximadamente 50% e 70% de positividade para Anexina V, respectivamente (Figura 5.29). Ambas as concentrações de 3µM e 6 µM de LQB-118 e LQB-223 usadas no tratamento das células de LLA e LMA apresentaram significância estatística quando comparados à condição controle, contendo somente o veículo.

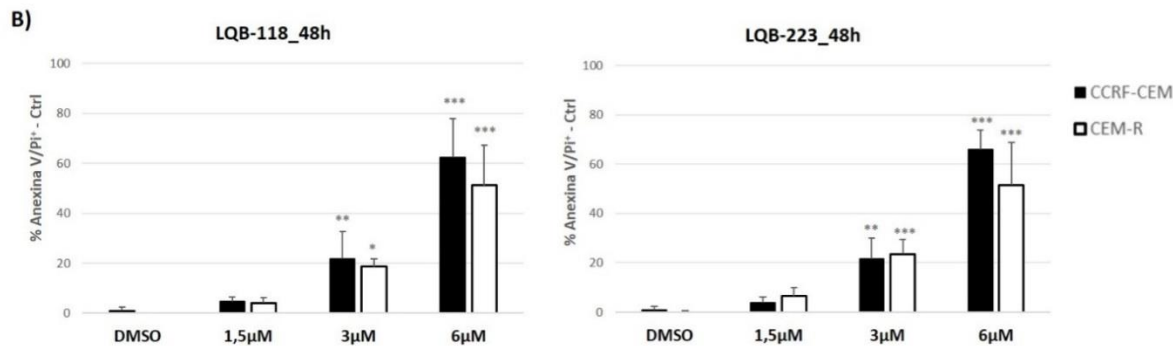
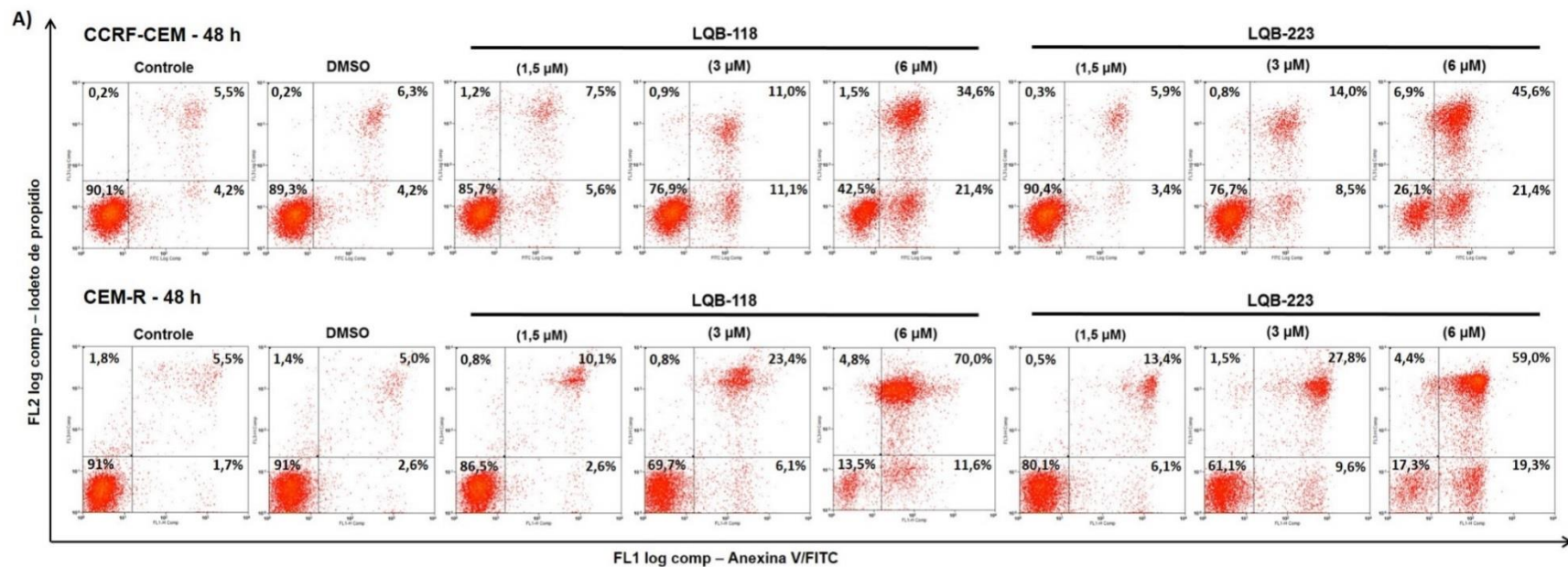


Figura 5.28: Efeito dos LQBs – 118 e – 223 na indução de morte celular nas linhagens resistente e parental de leucemia linfóide aguda (LLA), avaliados no ensaio de marcação de células anexina V⁺ por citometria de fluxo, após incubação por 48 h. A) Histogramas representativos de no mínimo três experimentos independentes. B) Gráficos contêm a média da porcentagem de células marcadas com anexina V/PI. As análises estatísticas (ANOVA, seguido pelo pós-teste Bonferroni) foram realizadas comparando: a linhagem parental com a resistente (não houve valor de p significativo) e comparando o tratamento com o DMSO (*p < 0,05; **p < 0,01 e ***p < 0,001 em cinza).

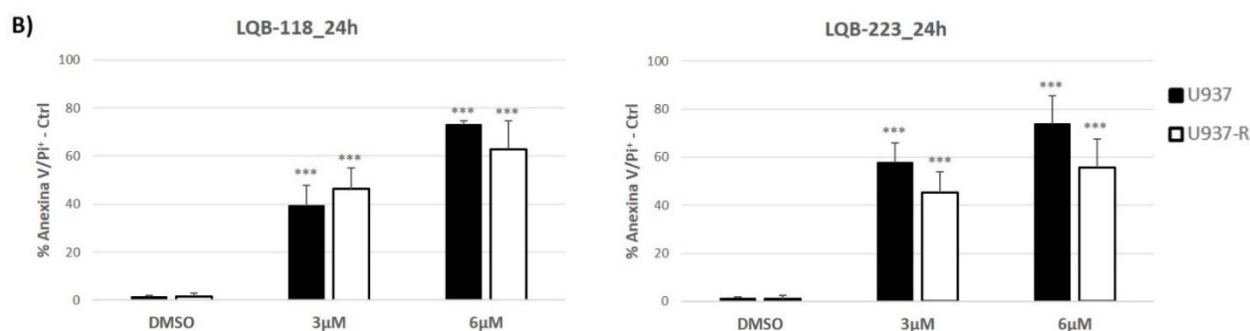
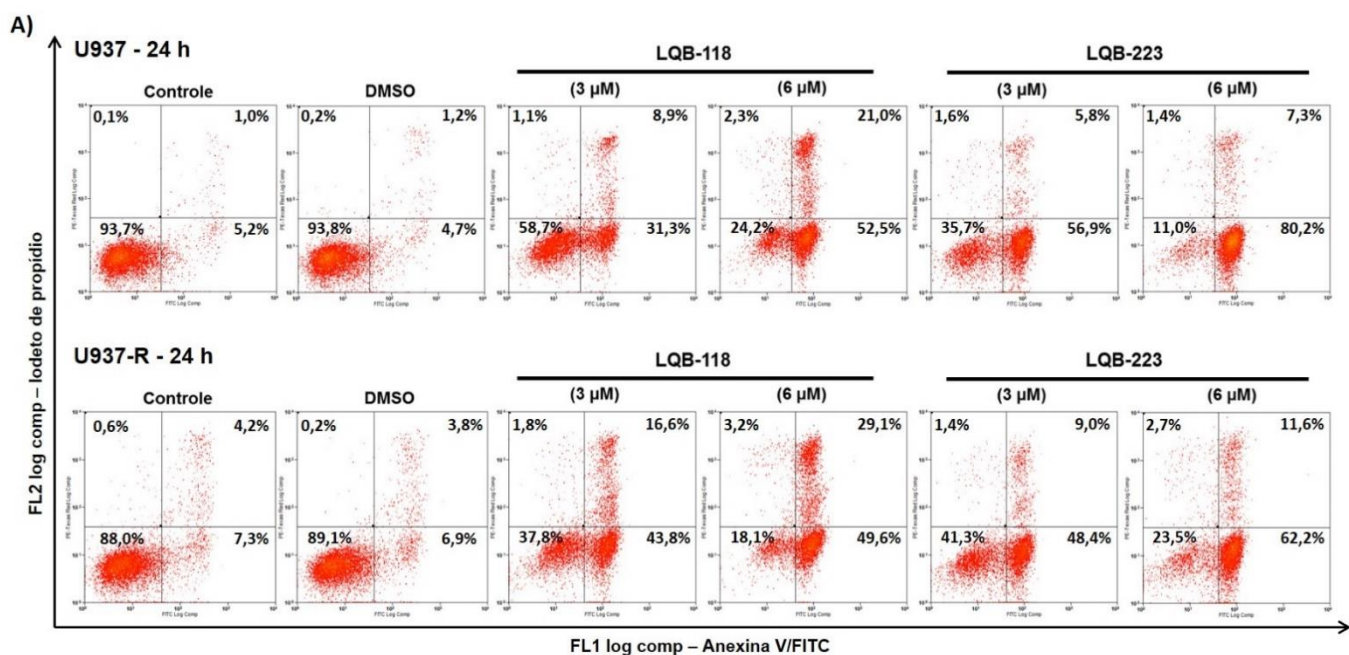


Figura 5.29: Efeito do LQB-118 e do LQB-223 na indução de morte celular nas linhagens resistente e parental de leucemia mieloide aguda (LMA), avaliados no ensaio de marcação de células anexina V⁺ por citometria de fluxo, após incubação por 24 h. A) Histogramas representativos deno mínimo três experimentos independentes. B) Gráficos contêm a média da porcentagem de células marcadas com anexina V/Pi. As análises estatísticas (ANOVA, seguido pelo pós-teste Bonferroni) foram realizadas comparando: a linhagem parental com a resistente (não houve valor de p significativo) e comparando o tratamento com o DMSO (***) p < 0,001 em cinza).

A Figura 5.28 e a Figura 5.29 mostram que a indução de morte celular produzida pelos compostos LQB-118 e LQB-223 apresentou percentuais semelhantes entre as linhagens resistentes e parentais de forma que não houve significância estatística entre essa comparação (resistente x parental) em nenhuma concentração dos compostos avaliados. Esses resultados de indução de morte celular corroboram com os de redução de viabilidade celular, indicando que os LQBs atuam inviabilizando

as células e induzindo morte celular tanto nas células resistentes quanto nas parentais de intensidade semelhante, conseguindo sobrepujar os mecanismos MDR.

Na Figura 5.30 é possível observar que o tratamento com os compostos LQB-118 e LQB-223 gerou fragmentação do DNA tanto nas linhagens parentais quanto nas resistentes. A indução de fragmentação do DNA foi maior após o tratamento com o composto LQB-223 (6 μ M), aproximadamente 50% nas linhagens de LMA e cerca de 30% nas linhagens de LLA após 24 e 48 h de tratamento, respectivamente. O tratamento com o composto LQB-118, apresentou uma maior taxa de fragmentação de DNA nas linhagens de LMA (cerca de 40% e 30% para U937 e U937-R, respectivamente) após incubação com 6 μ M por 24 h. Nas linhagens de LLA as taxas de fragmentação de DNA foram menores, cerca de 20% e 10% para CCRF-CEM e CEM-R, respectivamente, após incubação com 6 μ M por 48 h. Isso reflete a maior resistência ao tratamento das linhagens de LLA (cuja a resistência adquirida ao VP-16 é de 40 vezes) comparadas às de LMA (com resistência de 8 vezes) (Figura 5.20).

A ausência de significância estatística entre a taxa de fragmentação de DNA causada pelos compostos LQBs nas linhagens resistentes comparadas às parentais, tanto de LMA quanto de LLA, demonstra que a atuação desse composto é independente do perfil de resistência da célula.

A Figura 5.31 e a Figura 5.32 mostram os histogramas representativos da indução de fragmentação do DNA causada pelos compostos LQBs nas linhagens de LLA e LMA, respectivamente. Esses resultados de marcação celular com Anexina V e indução de fragmentação de DNA são indicativos de indução de apoptose nessas células (WLODKOWIC; SKOMMER; DARZYNKIEWICZ, 2012).

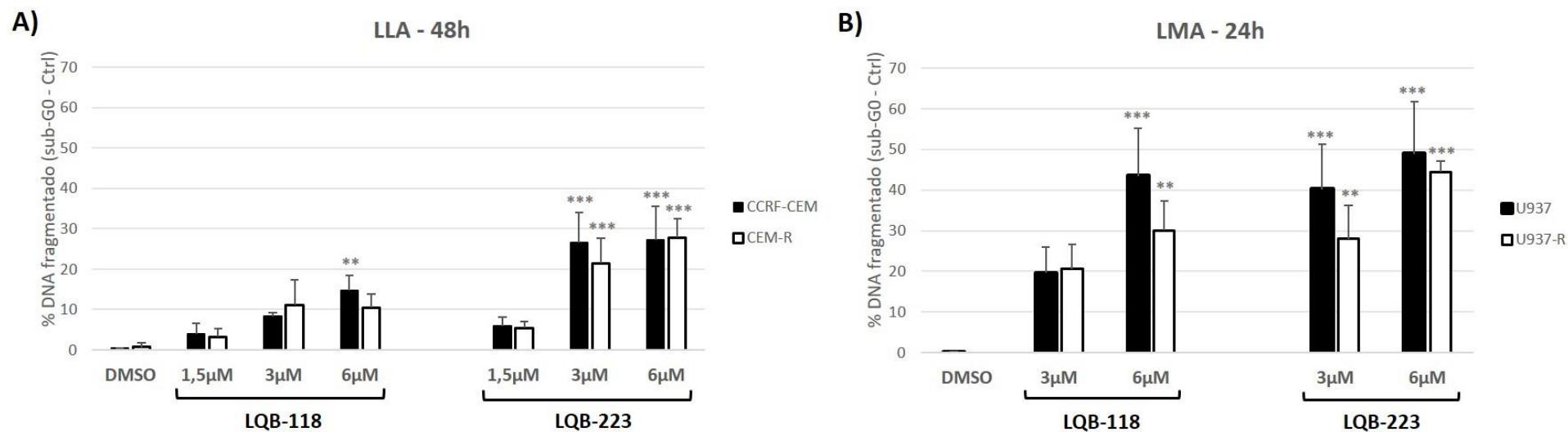


Figura 5.30: Efeito do LQB-118 e do LQB-223 na indução de fragmentação do DNA nas linhagens parentais e resistentes de LLA (A) tratadas por 48 h e LMA (B) tratadas por 24 h com os compostos. Os gráficos contêm a média de da porcentagem de fragmentação de DNA das células em sub-G0/G1 de no mínimo três experimentos independentes. As análises estatísticas (ANOVA, seguido pelo pós-teste Bonferroni) foram realizadas comparando: a linhagem parental com a resistente (não houve valor de p significativo) e comparando o tratamento com o DMSO (**p < 0,01 e ***p < 0,001 em cinza).

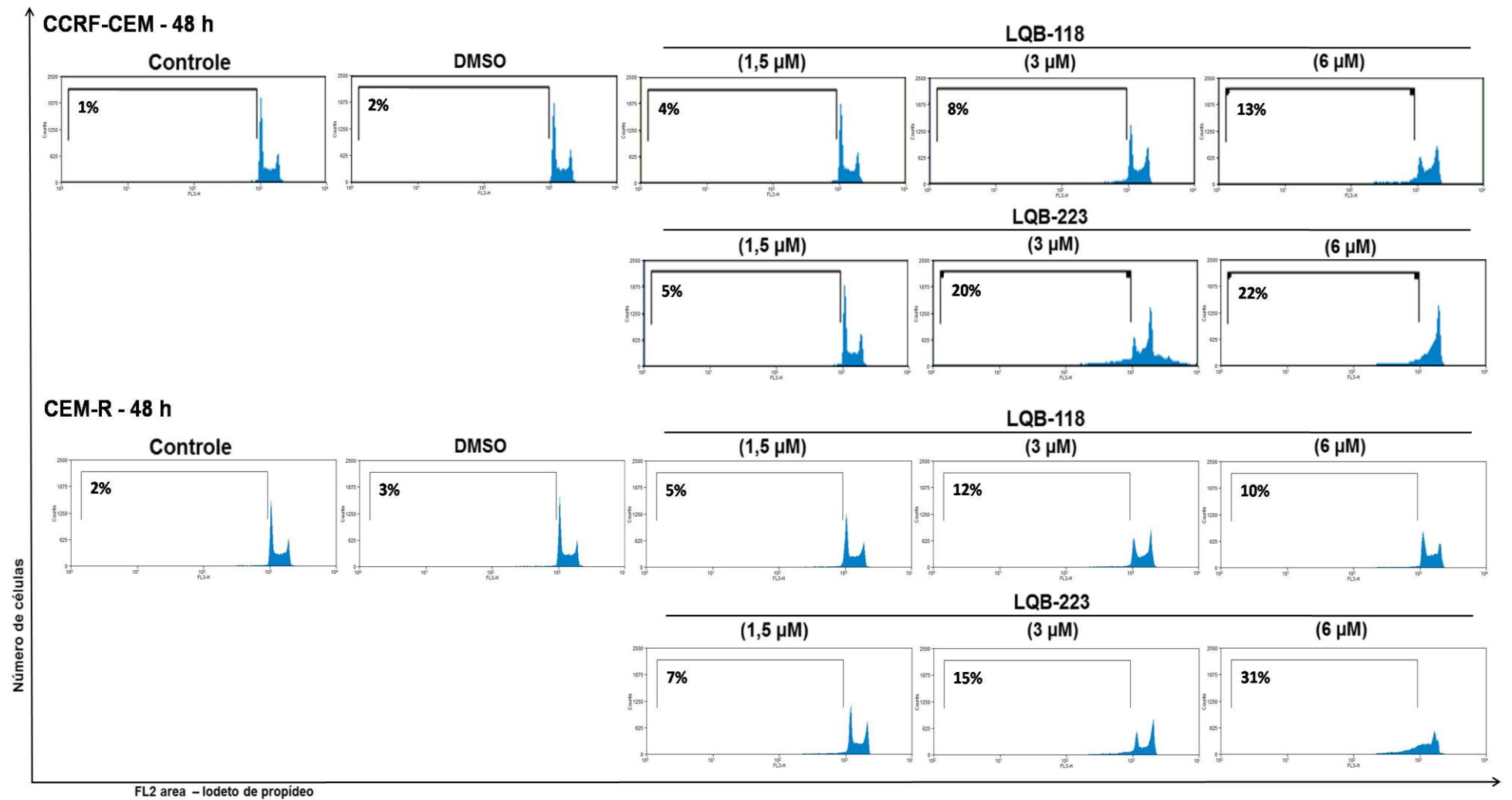


Figura 5.31: Histogramas representativos da indução de de fragmentação do DNA causada pelos compostos LQB-118 e LQB-223 nas linhagens de leucemia linfóide aguda (LLA) resistente e parental.

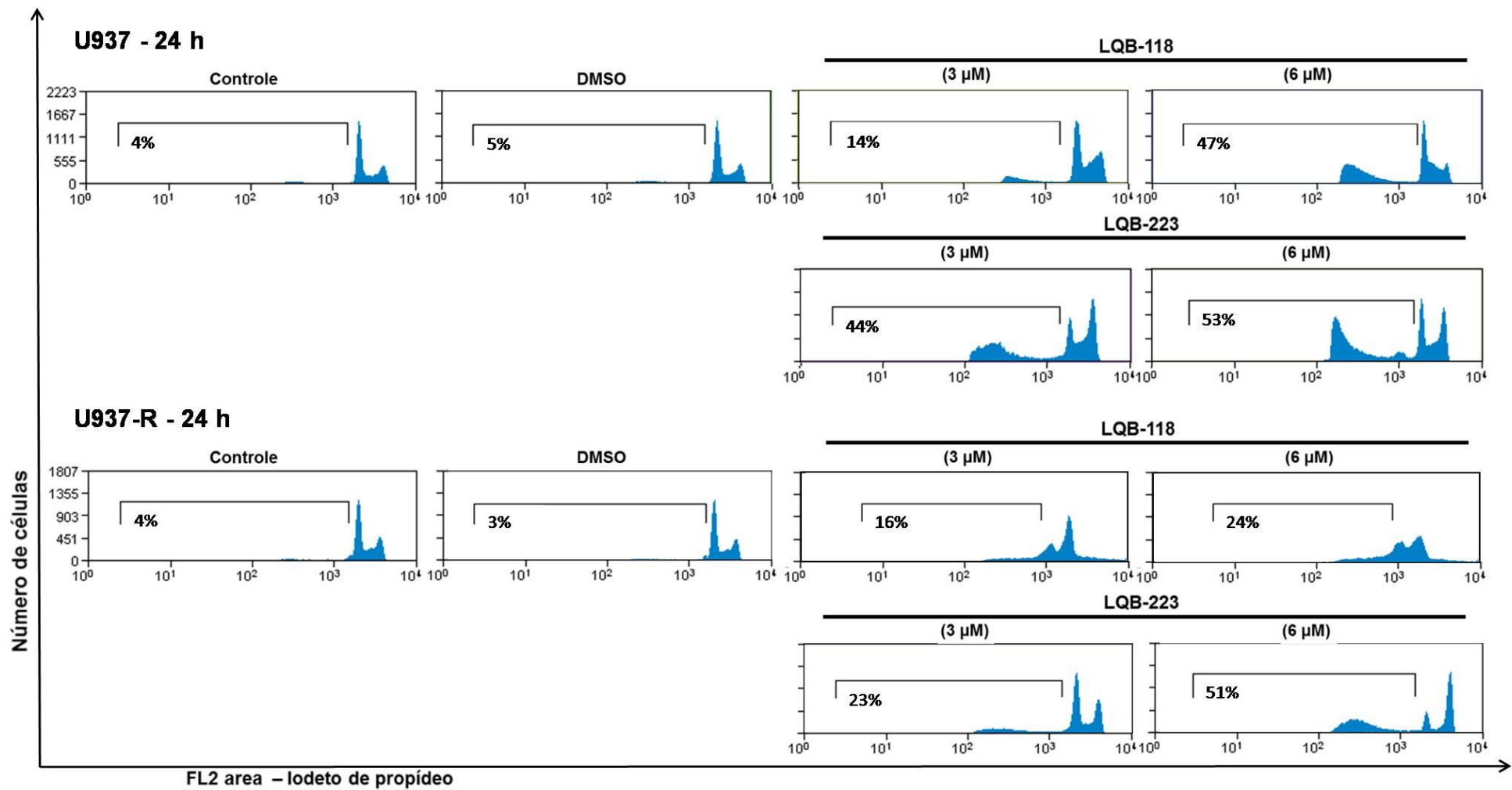


Figura 5.32: Histogramas representativos da indução de de fragmentação do DNA causada pelos compostos LQB-118 e LQB-223 nas linhagens de leucemia mieloide aguda (LMA) resistente e parental.

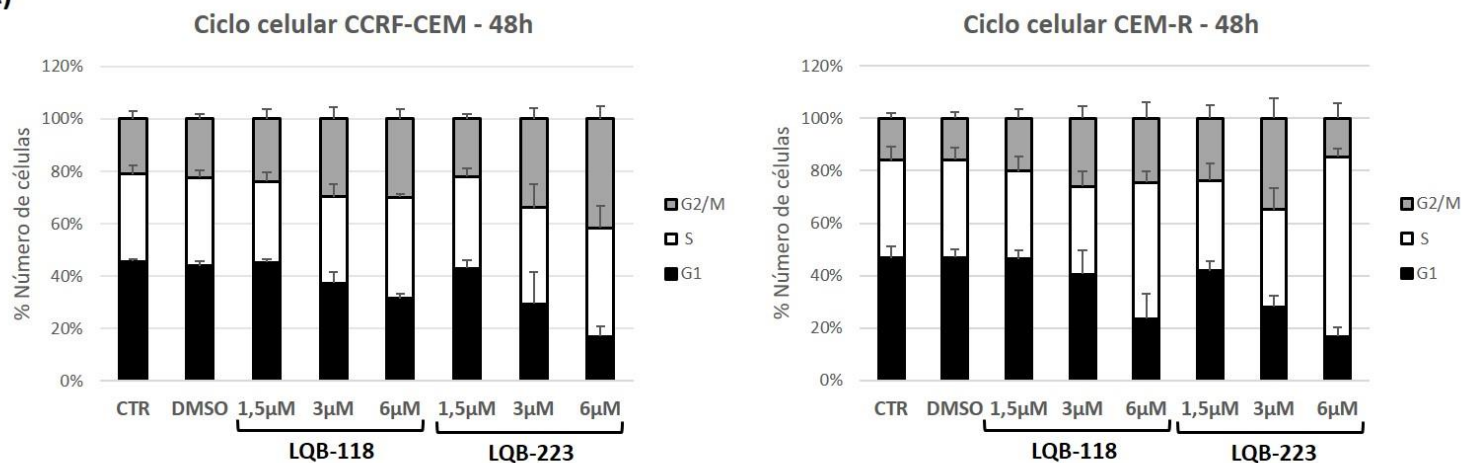
5.18 Efeito dos compostos LQB-118 e LQB-223 no ciclo celular das linhagens de leucemias agudas resistentes *versus* parentais

Para avaliar se os efeitos anti-proliferativos de LQB-118 e LQB-223 resultaram em alterações no perfil do ciclo celular, o conteúdo de DNA foi avaliado por citometria de fluxo após os tratamentos. Como mostrado na Figura 5.33, 3 μ M e 6 μ M de LQB-223 induziram um grande acúmulo de células em G2/M após 24 h de tratamento nas linhagens U937 e U937-R. Concentrações de 1,5 μ M e 3 μ M desse mesmo composto também induziram acúmulo de células em G2/M após 48 h de tratamento nas linhagens CCRF-CEM, e CEM-R, enquanto que a concentração mais alta, de 6 μ M, induziu acúmulo de células em G2/M na linhagem CCRF-CEM e em S na linhagem CEM-R.

O composto LQB-118 (Figura 5.33) induziu, um leve acúmulo de células em S após 24 h de tratamento com 3 μ M e 6 μ M na linhagem U937. Na linhagem resistente U937-R, o tratamento com 3 μ M e 6 μ M induziu um acúmulo de células em G2/M e S, respectivamente. No tratamento da LLA, concentrações de 3 μ M e 6 μ M de LQB-118 induziram um leve acúmulo de células em G2/M nas linhagens parental e resistente, e a concentração mais alta, de 6 μ M, induziu um acúmulo de células em S na linhagem CEM-R. Mostrando que concentrações maiores levam a paradas em fases anteriores do ciclo, principalmente nas células resistentes que apresentam níveis reduzidos de Topo II α e Topo II β e, portanto, terão mais dificuldades para realizar a divisão celular.

A Figura 5.34 e a Figura 5.35 mostram os histogramas representativos do efeito dos LQBs na distribuição de células nas fases do ciclo celular nas linhagens de LLA e LMA, respectivamente. Esses resultados mostram que os compostos LQBs alteram a distribuição das células nas fases do ciclo celular induzindo um acúmulo nas fases S ou G2/M. Esse resultado condiz com a inibição de Topo II, uma vez que essas enzimas são essenciais para os processos de replicação e transcrição celular. Contudo, o acúmulo de células em cada fase variou de acordo com o tipo de linhagem leucêmica tratada (LMA ou LLA), com os fenótipos de resistência das linhagens (parentais ou resistentes) e com os compostos avaliados (LQB-118 ou LQB-223). Isso pode sugerir que além do mecanismo de ação via inibição das topoisomerases apresentado por esses compostos, outros mecanismos contribuem para a redução da viabilidade celular e indução da morte celular após o tratamento com os LQBs.

A)



B)

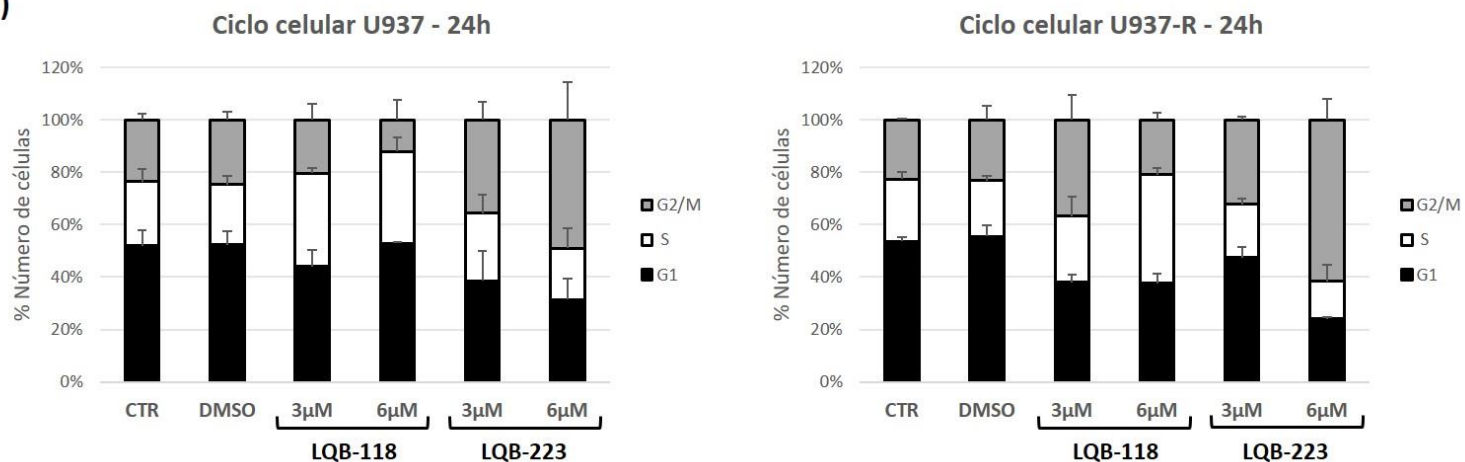


Figura 5.33: Avaliação do efeito dos compostos LQB-118 e LQB-223 no perfil do ciclo celular das linhagens de leucemia linfóide aguda (LLA) (A) tratadas por 48 h e leucemia mieloide aguda (LMA) (B), tratadas por 24 h com esses compostos. Os gráficos contêm a média das células em G1, S e G2/M de três experimentos independentes.

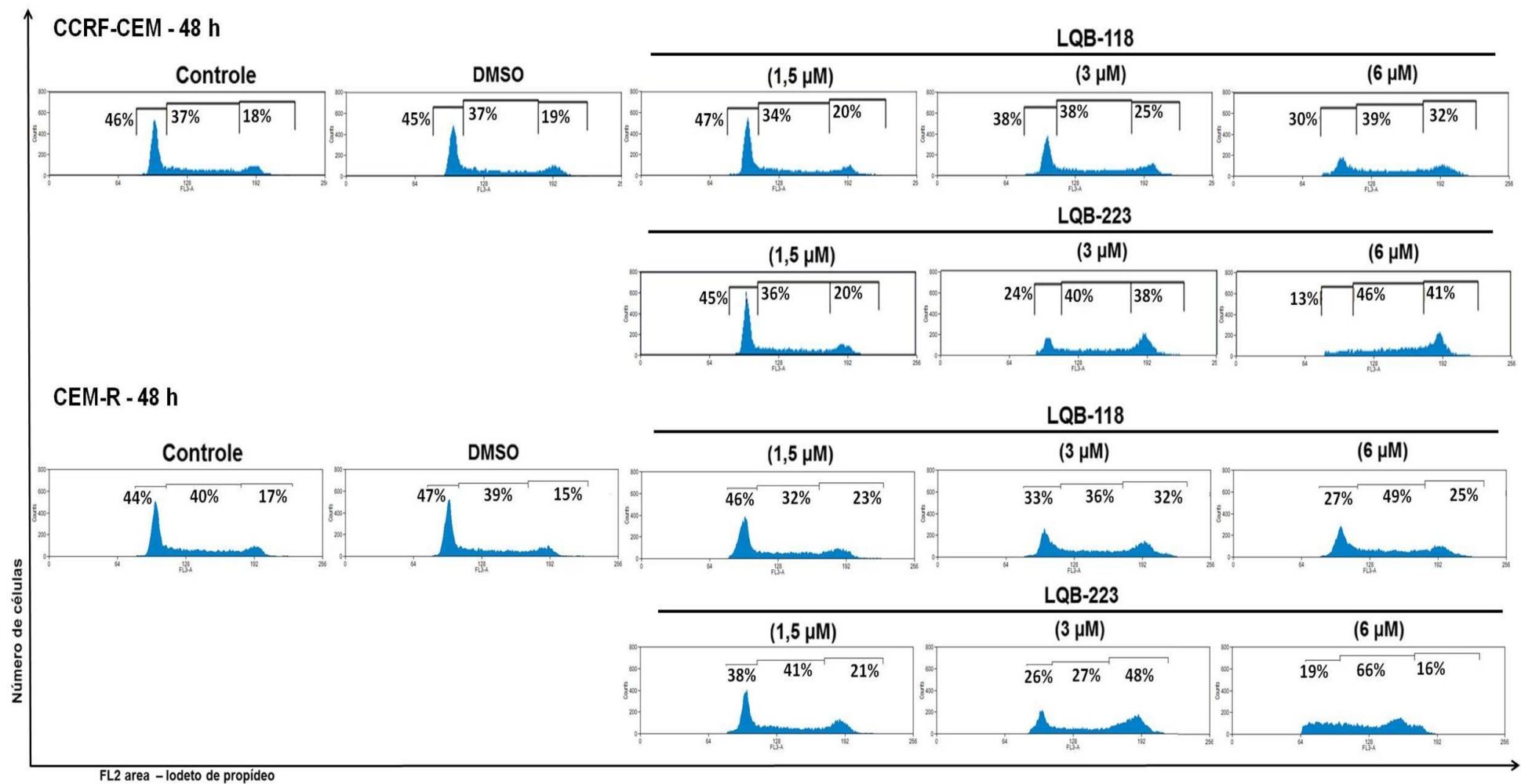


Figura 5.34: Histogramas representativos do efeito dos compostos LQB-118 e LQB-223 no perfil do ciclo celular das linhagens de leucemia linfóide aguda (LLA) resistente e parental.

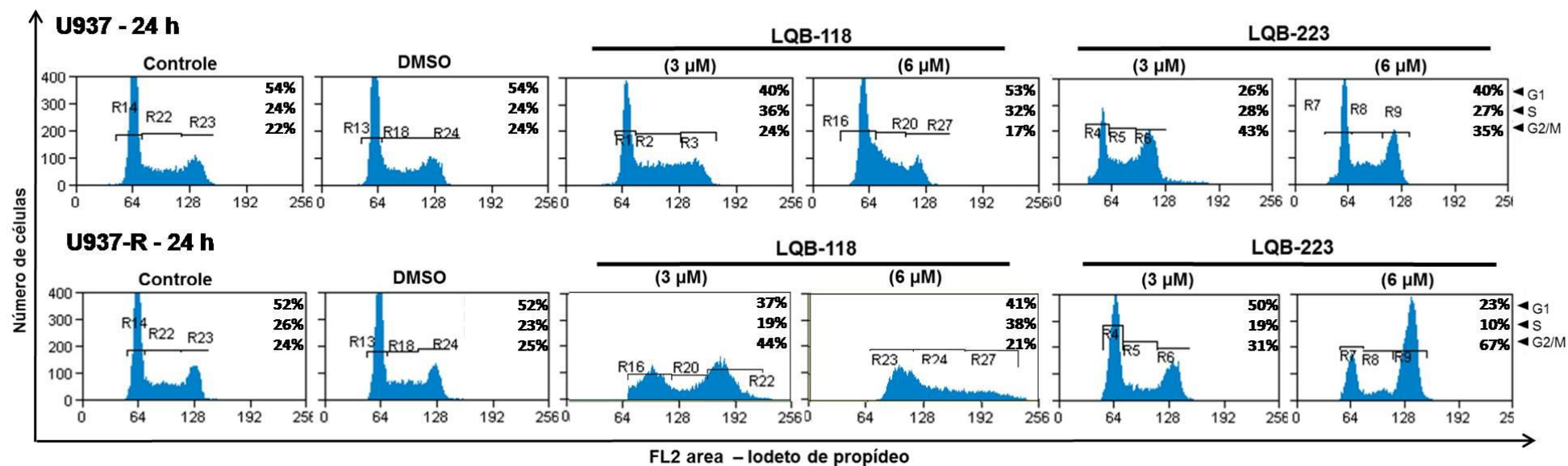


Figura 5.35: Histogramas representativos do efeito dos compostos LQB-118 e LQB-223 no perfil do ciclo celular das linhagens de leucemia mieloide aguda (LMA) resistente e parental.

5.19 Efeito do composto LQB-118 na modulação de Akt nas linhagens de leucemias agudas resistentes *versus* parentais

Uma vez que a proteína Akt está envolvida em diversos processos que contribuem para a progressão e resistência tumoral, buscamos avaliar se esta proteína poderia ser regulada no tratamento com o composto LQB-118.

Como pode ser visualizado na Figura 5.36a o tratamento com 3 μM de LQB-118 durante 24 h reduz completamente os níveis proteicos de Akt na linhagem U937. Na linhagem resistente U937-R este mesmo efeito foi induzido com a concentração de 6 μM do LQB-118. Portanto, LQB-118 promoveu uma redução completa da proteína Akt tanto na célula resistentes quanto na parental. O tratamento das linhagens de LLA induziu um efeito semelhante, 6 μM de LQB-118 por 24 h reduziu totalmente a proteína Akt na linhagem CCRF-CEM, entretanto, na linhagem CEM-R foi necessário 12 μM para que Akt fosse reduzida (Figura 5.36b). Assim como tem ocorrido nos experimentos anteriores apresentados neste trabalho, a linhagem CEM-R foi a mais resistente à redução de Akt, não apresentando uma redução total no conteúdo proteico desta molécula. Apesar da maior resistência, o tratamento com LQB-118 também reduziu o nível de Akt tanto na linhagem resistente quanto na parental na LLA.

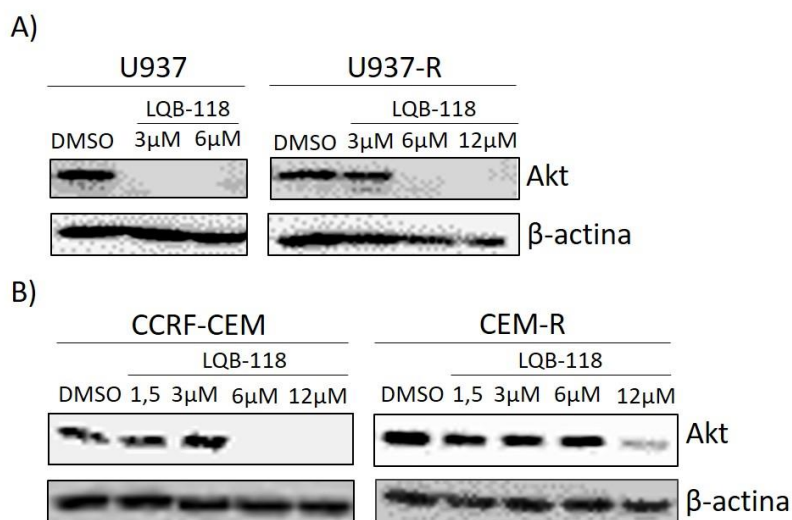


Figura 5.36: Efeito do LQB-118 na modulação dos níveis de Akt após o tratamento com diferentes concentrações (1,5 – 12 μM) do composto, durante 24 h, nas células resistentes ou parentais de leucemia mielóide aguda (A) ou leucemia linfóide aguda (B). DMSO: controle com células sem tratamento e na presença do veículo DMSO. O conteúdo proteico da β -actina foi utilizado como controle endógeno do experimento. Figura representativa de dois experimentos independentes.

Em seguida, como vimos que o composto LQB-118 induz as células à apoptose e que a cascata de sinalização celular ativada na indução da morte celular pode levar a redução de Akt, buscamos avaliar se a redução proteica de Akt após o tratamento com LQB-118 era resultado da indução de morte celular. Como observado na figura Figura 5.37 a redução de Akt por LQB-118 é independente da apoptose, uma vez que mesmo inibindo a apoptose com o inibidor de pan caspase Z-VAD-FMK (Sigma-Aldrich) o LQB-118 continuou reduzindo o conteúdo proteico de Akt em todas as linhagens de leucemias agudas avaliadas, tanto as resistentes quanto as parentais.

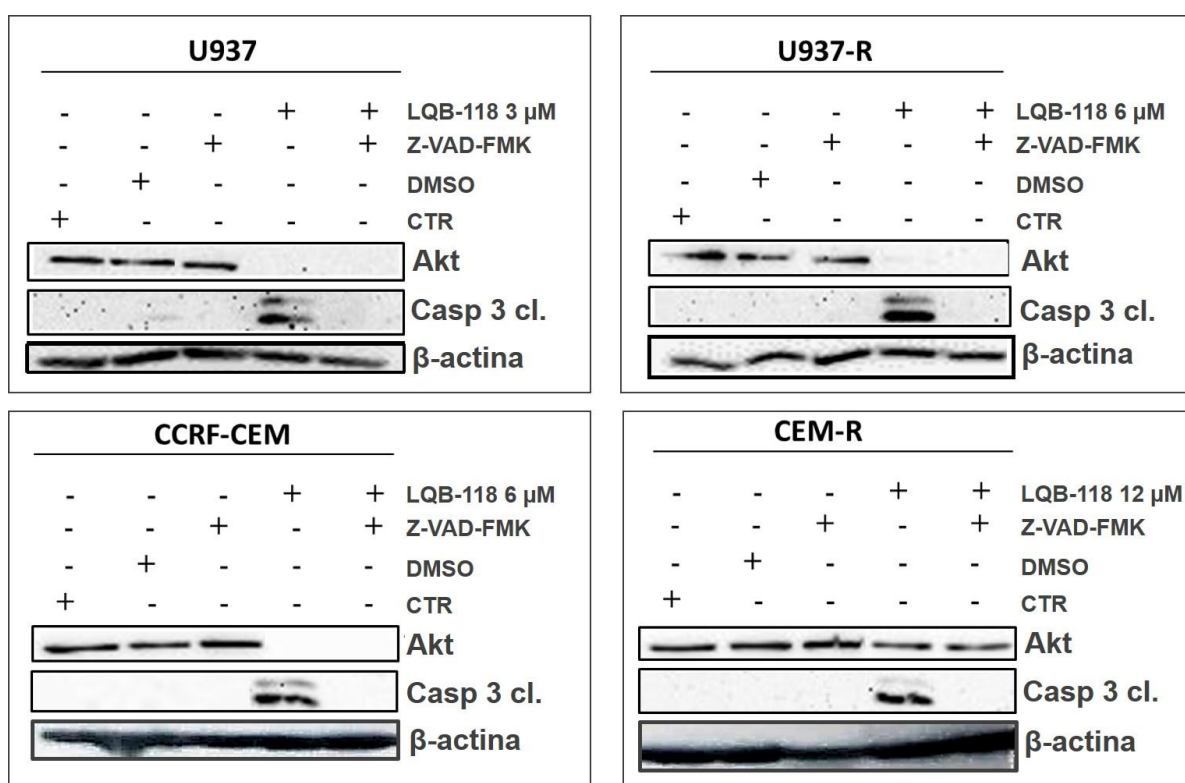


Figura 5.37: Avaliação do efeito da apoptose na modulação dos níveis da proteína Akt após tratamento com LQB-118 por 24h nas linhagens de leucemias agudas resistentes ou parentais. CTR: controle com células sem tratamento; DMSO: controle com células sem tratamento e na presença do veículo DMSO; Z-VAD-FMK: inibidor de pan caspase; Casp 3 cl.: caspase 3 clivada, marcador para a indução de apoptose; β-actina: controle endógeno. Figura representativa de dois experimentos independentes.

Visto que a redução de Akt pelo LQB-118 não ocorreu como consequência da apoptose gerada por este composto, realizamos a cinética de tempo do tratamento com LQB-118, a fim de inferir possíveis mecanismos que estariam levando a redução

de Akt total. A Figura 5.38 mostra que a redução de Akt não é precoce, ocorrendo de forma completa nos maiores tempos de 16 h e 24 h nas linhagens de leucemias agudas resistentes e parentais.

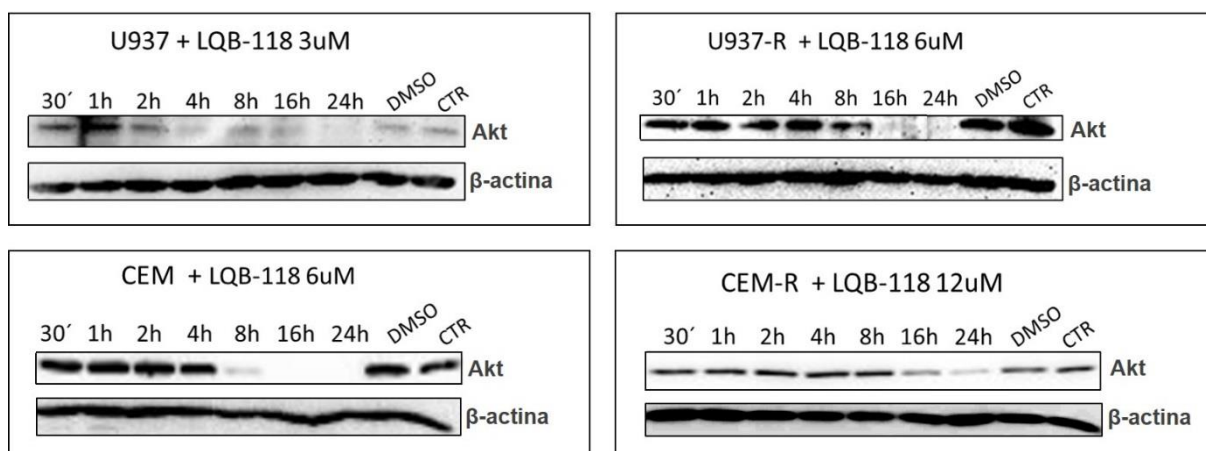


Figura 5.38: Efeito do LQB-118 na modulação dos níveis de Akt nas células resistentes ou parentais de leucemias agudas durante uma cinética de tempo em até 24 h. O conteúdo proteico da β -actina foi utilizado como controle endógeno do experimento. Figura representativa de dois experimentos independentes.

Esses dados sugerem a participação de vias de proliferação celular no efeito antitumoral do composto LQB-118. Uma vez que as vias de PI3K / Akt estão constantemente ativadas nas leucemias agudas (BONGIOVANNI; SACCOMANI; PIOVAN, 2017; GRANDAGE *et al.*, 2005) a regulação de vias de sobrevivência celular representa um importante mecanismo de ação do composto LQB-118. Estudos demonstram que a utilização de inibidores farmacológicos da via PI3K / Akt associados à quimioterapia padrão em células leucêmicas levam a um efeito sinérgico na indução de apoptose, sugerindo um papel relevante dessa via na mediação da resistência à quimioterapia nas leucemias agudas (JEFFREY *et al.*, 2009; FRANSECKY; MOCHMANN; BALDUS, 2015).

Assim como observado em nosso estudo, já foi mostrado que o composto LQB-118 induz apoptose em linhagens celulares de leucemia com fenótipo MDR (MAIA *et al.*, 2011; DE SOUZA REIS *et al.*, 2013) e em células de câncer de próstata resistentes a terapia com androgênio (MARTINO *et al.*, 2014). Além disso, um dos mecanismos de ação do LQB-118 para sua atividade antitumoral é a indução de ROS que já foi vista em células de leucemia mieloide crônica, incluindo células com perfil MDR (NETTO *et al.*, 2010; SALUSTIANO *et al.*, 2010; DE SÁ BACELAR *et al.*, 2013). Também já foi demonstrado que a apoptose celular, a geração de ROS e a

fragmentação de DNA possuem um papel importante na regulação da atividade da via de PI3K / Akt mediada por genotoxinas (ROOS; KAINA, 2013; XU *et al.*, 2012; GANGULY *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2012). Além dos resultados gerados em nosso estudo, outros trabalhos do nosso grupo também demonstraram a redução de Akt total, além da forma fosforilada dessa proteína, em modelos de glioblastoma e leucemia mieloide crônica (DE FARIA *et al.*, 2015; BERNARDO, 2016). Neste trabalho, observamos a redução da proteína Akt total ocorrendo independente da ativação da apoptose. Alguns grupos já observaram a regulação de Akt em resposta a danos ao DNA (ROOS; KAINA 2013; XU *et al.*, 2012) e inibidores catalíticos de Topo II foram implicados na ativação da via de sinalização das quinases ATM e ATR, proteínas centrais na sinalização em resposta a dano no DNA (FUKUDA *et al.*, 2013; DEMING *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2010). Dados ainda não publicados pelo nosso grupo mostram a indução de fosforilação da histona H2AX (γ H2AX), um dos alvos de ATR ativados após estresse na replicação celular, após o tratamento com os LQBs em células de glioblastoma. Fukuda e colaboradores observaram uma redução tanto na proteína Akt total quanto na sua forma fosforilada a partir de 8h de incubação com um composto natural inibidor catalítico da DNA topoisomerasas I e II α , além da indução de γ H2AX (FUKUDA *et al.*, 2013). Logo, a redução de Akt observada nesse trabalho pode estar associada aos danos ao DNA induzidos por LQB-118, uma vez que os danos gerados no DNA ocorrem antes da apoptose, a etapa final resultante da indução desses danos.

Além disso, a diminuição nos níveis de expressão total de Akt, observada após tratamento com LQB-118 também pode estar associada a alguma regulação pós-transcricional. Em um trabalho recente do nosso grupo a família do microRNA-29 (miR-29a, miR-29b, miR-29c) que regula a proliferação e apoptose, mediante a inibição do RNAm de Akt, em diferentes tumores foi avaliada como possível alvo do LQB-118. No entanto, o tratamento com LQB-118 não alterou a expressão desses microRNAs nas células de leucemia mieloide crônica nos tempos avaliados, mas devido a meia vida dos microRNAs não ser muito grande, avaliações em tempos mais precoces são necessárias para refutar ou confirmar a participação dessas moléculas na resposta ao LQB-118 (DE FARIA, 2016). Por fim, as alterações no nível proteico de Akt por LQB-118 também podem ser resultados de modificações pós-traducionais, indução da degradação proteica e/ou inibição da síntese proteica que precisam ser investigados.

6. CONCLUSÕES

- Nossos resultados mostram que a exposição das linhagens CCRF-CEM e U937 a concentrações crescentes de VP-16 foi eficaz na indução da resistência a esse fármaco, gerando linhagens 40 vezes e 8 vezes mais resistentes a este fármaco (CEM-R e U937-R, respectivamente), além de serem resistentes a outros quimioterápicos, tais como: daunorrubicina, idarrubicina e doxorubicina.
- A exposição ao VP-16 na indução de resistência nas linhagens de leucemias agudas levou a uma taxa de proliferação celular inferior às obtidas nas linhagens parentais.
- A caracterização das linhagens resistentes em relação às parentais quanto ao perfil de resistência, mostrou que elas apresentam maior expressão da proteína transportadora Pgp. No entanto, esta expressão não foi correlacionada com um maior aumento de atividade desta proteína ou da BCRP no efluxo de moléculas. Além disso, também foi demonstrado nas linhagens resistentes alteração na expressão de microRNAs que regulam a Topo II α , uma expressão proteica reduzida de hTopo II α , hTopo II β e um aumento na expressão proteica de hTopo I, Akt total, Akt-1 e Akt-2, quando comparadas às linhagens parentais.
- Os compostos ácido pomólico, LQB-118 e LQB-223 apresentaram ação inibitória sobre as enzimas topoisomerases, sendo caracterizados como inibidores catalíticos dessas enzimas.
- Tanto os ensaios bioquímicos quanto os de biologia computacional sugerem que os compostos LQBs não intercalam no DNA e não atuam no sítio de ligação ao VP-16. Além disso, os resultados da modelagem computacional sugeriram que a interação desses compostos é mais favorável no sítio ATPase de Topo II α e que estes apresentam maior afinidade pela Topo II α do que pela Topo II β .
- O composto LQB-118 modula o conteúdo de Akt celular e esta modulação é independente da apoptose.
- Os compostos avaliados reduziram a viabilidade, alteraram o perfil de distribuição de células no ciclo celular e induziram morte celular nas linhagens resistentes comparadas às parentais, sobrepujando o mecanismo MDR e, mostrando ser potenciais compostos para o tratamento nos casos de resistência aos inibidores clássicos de topoisomerases usados na clínica.

7. CONCLUSÃO GERAL

Nossos resultados evidenciaram que os compostos ácido pomólico, LQB-118 e LQB-223 são potentes agentes antitumorais em células de leucemias agudas. Os compostos LQBs se destacaram por serem potentes no tratamento de leucemias agudas com fenótipo MDR, podendo ser uma opção para os pacientes resistentes aos quimioterápicos empregados nos protocolos terapêuticos atuais.

8. PERSPECTIVAS

- Avaliar a interação dos novos compostos com o sítio ATPase de hTopo II α por ensaios bioquímicos.
- Investigar a ocorrência de lesões no DNA e a reversibilidade do DNA clivado nas células tratadas com os novos compostos, como resultado da inibição das topoisomerasas.
- Investigar a modulação de Akt pelo composto LQB-223 e investigar possíveis alterações nos mecanismos de síntese e/ou degradação desta proteína moduladas pelos LQBs.
- Avaliar o efeito da combinação do tratamento com inibidores de topoisomerase (inibidores clássicos usados na clínica) associados com a inibição de proteínas da família Akt, visando o estudo de uma abordagem utilizando quimioterapia combinada.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADJAKLY, M. et al. Genistein and daidzein: different molecular effects on prostate cancer. **Anticancer research**, v. 33, n. 1, p. 39–44, jan. 2013.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 6 Edition ed. [s.l.] Artmed, 2017.

ALPSOY, A.; YASA, S.; GÜNDÜZ, U. Etoposide resistance in MCF-7 breast cancer cell line is marked by multiple mechanisms. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 68, n. 3, p. 351–5, abr. 2014.

ALSNER, J. et al. Identification of an N-terminal domain of eukaryotic DNA topoisomerase I dispensable for catalytic activity but essential for in vivo function. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 18, p. 12408–11, 25 jun. 1992.

ANDOH, T. Bis(2,6-dioxopiperazines), catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II, as molecular probes, cardioprotectors and antitumor drugs. **Biochimie**, v. 80, n. 3, p. 235–46, mar. 1998.

ASCHE, C. Antitumour quinones. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 5, n. 5, p. 449–67, maio 2005.

AWALE, S. et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 1, p. 181–9, 1 jan. 2008.

AZAROVA, A. M. et al. Roles of DNA topoisomerase II isozymes in chemotherapy and secondary malignancies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 26, p. 11014–9, 26 jun. 2007.

AZAROVA, A. M. et al. Genistein induces topoisomerase II β - and proteasome-mediated DNA sequence rearrangements: Implications in infant leukemia. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 399, n. 1, p. 66–71, 13 ago. 2010.

BALDWIN, E. L.; OSHEROFF, N. Etoposide, topoisomerase II and cancer. **Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents**, v. 5, n. 4, p. 363–72, jul. 2005.

BANO, S. et al. Synthesis and biological evaluation of some new 2-pyrazolines bearing benzene sulfonamide moiety as potential anti-inflammatory and anti-cancer agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 12, p. 5763–8, dez. 2011.

BARANELLO, L.; KOUZINE, F.; LEVENS, D. DNA topoisomerases beyond the standard role. **Transcription**, v. 4, n. 5, p. 232–7, jan. 2013.

BASSAN, R.; HOELZER, D. Modern Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 5, p. 532–543, 10 fev. 2011.

BATES, A. D.; BERGER, J. M.; MAXWELL, A. The ancestral role of ATP hydrolysis in type II topoisomerases: prevention of DNA double-strand breaks. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 15, p. 6327–39, 1 ago. 2011.

BAU, J. T.; KURZ, E. U. Structural determinants of the catalytic inhibition of human

- topoisomerase II α by salicylate analogs and salicylate-based drugs. **Biochemical pharmacology**, v. 89, n. 4, p. 464–76, 15 jun. 2014.
- BECK, J. et al. Rhodamine 123-efflux from hematopoietic subpopulations and leukaemic blast populations marked by PerCP-conjugated monoclonal antibodies. **Cancer letters**, v. 99, n. 2, p. 197–207, 6 fev. 1996.
- BENDERRA, Z. et al. Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 10, n. 23, p. 7896–902, 1 dez. 2004.
- BENDERRA, Z. et al. MRP3, BCRP, and P-glycoprotein activities are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 21, p. 7764–72, 1 nov. 2005.
- 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. 451–8, ago. 1976.
- BERNARDO, P. S. **Estudo do mecanismo de ação do composto LQB-118 e do papel do miR-210 na radiorresistência e na classificação dos astrocitomas.**[s.l.] Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2016.
- BHATTACHARYA, D.; CHENG, J. 3Drefine: consistent protein structure refinement by optimizing hydrogen bonding network and atomic-level energy minimization. **Proteins**, v. 81, n. 1, p. 119–31, jan. 2013.
- BIGNOLD, L. P.; COGHLAN, B. L. D.; JERSMANN, H. P. A. Cancer morphology, carcinogenesis and genetic instability: a background. **EXS**, n. 96, p. 1–24, jan. 2006.
- BONGIOVANNI, D.; SACCOMANI, V.; PIOVAN, E. Aberrant Signaling Pathways in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1904, 5 set. 2017.
- BOZDAG, M. et al. Structural insights on carbonic anhydrase inhibitory action, isoform selectivity, and potency of sulfonamides and coumarins incorporating arylsulfonylureido groups. **Journal of medicinal chemistry**, v. 57, n. 21, p. 9152–67, 13 nov. 2014.
- BREIER, A. et al. New insight into p-glycoprotein as a drug target. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 13, n. 1, p. 159–70, jan. 2013.
- BRUNET, A. et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. **Cell**, v. 96, n. 6, p. 857–68, 19 mar. 1999.
- BUARQUE, C. D. et al. 11a-N-Tosyl-5-deoxy-pterocarpan (LQB-223), a promising prototype for targeting MDR leukemia cell lines. **European journal of medicinal chemistry**, v. 78, p. 190–7, 6 maio 2014.
- BUARQUE, C. D. et al. Palladium-Catalyzed Oxyarylation, Azaarylation and α -Arylation Reactions in the Synthesis of Bioactive Isoflavonoid Analogues. **Current Organic Synthesis**, v. 12, n. 6, 1 dez. 2015.

- BUGREEV, D. V.; NEVINSKY, G. A. Structure and mechanism of action of type IA DNA topoisomerases. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 74, n. 13, p. 1467–81, dez. 2009.
- BURNETT, A. K. Treatment of acute myeloid leukemia: are we making progress? **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 2012, p. 1–6, jan. 2012.
- BURNETT, A.; WETZLER, M.; LOWENBERG, B. Therapeutic Advances in Acute Myeloid Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 5, p. 487–494, 10 fev. 2011.
- BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of molecular endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 23–39, ago. 2002.
- BYTH, K. F. et al. AZD5438, a potent oral inhibitor of cyclin-dependent kinases 1, 2, and 9, leads to pharmacodynamic changes and potent antitumor effects in human tumor xenografts. **Molecular cancer therapeutics**, v. 8, n. 7, p. 1856–66, jul. 2009.
- CARDOSO, M. F. C. et al. Synthesis and evaluation of the cytotoxic activity of 1,2-furanonaphthoquinones tethered to 1,2,3-1H-triazoles in myeloid and lymphoid leukemia cell lines. **European journal of medicinal chemistry**, v. 84, p. 708–17, 12 set. 2014.
- CASTELLI, S. et al. Interaction between natural compounds and human topoisomerase I. **Biological chemistry**, v. 393, n. 11, p. 1327–40, nov. 2012.
- CHAMPOUX, J. J. DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 369–413, jun. 2001.
- CHANG, C.-C. et al. New insights into DNA-binding by type IIA topoisomerases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 23, n. 1, p. 125–133, fev. 2013.
- CHEN, C. et al. Combining structure-based pharmacophore modeling, virtual screening, and in silico ADMET analysis to discover novel tetrahydro-quinoline based pyruvate kinase isozyme M2 activators with antitumor activity. **Drug design, development and therapy**, v. 8, p. 1195–210, jan. 2014.
- CHEN, C.-F. et al. Novel regulation of nuclear factor-YB by miR-485-3p affects the expression of DNA topoisomerase II α and drug responsiveness. **Molecular pharmacology**, v. 79, n. 4, p. 735–41, abr. 2011.
- CHEN, S. H.; CHAN, N.-L.; HSIEH, T. New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases. **Annual review of biochemistry**, v. 82, p. 139–70, jan. 2013.
- CHÈNE, P. et al. Catalytic inhibition of topoisomerase II by a novel rationally designed ATP-competitive purine analogue. **BMC chemical biology**, v. 9, n. 1, p. 1, jan. 2009.
- CHIKAMORI, K. et al. DNA topoisomerase II enzymes as molecular targets for cancer chemotherapy. **Current cancer drug targets**, v. 10, n. 7, p. 758–71, nov. 2010.
- CHOI, E. J.; KIM, G.-H. Antiproliferative activity of daidzein and genistein may be related to ER α /c-erbB-2 expression in human breast cancer cells. **Molecular medicine reports**, v. 7, n. 3, p. 781–4, mar. 2013.

CHOMZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156–159, abr. 1987.

COLE, S. P. C. Targeting multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1): past, present, and future. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 54, n. 1, p. 95–117, 6 jan. 2014.

CORCES-ZIMMERMAN, M. R.; MAJETI, R. Pre-leukemic evolution of hematopoietic stem cells: the importance of early mutations in leukemogenesis. **Leukemia**, v. 28, n. 12, p. 2276–82, dez. 2014.

CORNWELL, M. M.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M. M. Certain calcium channel blockers bind specifically to multidrug-resistant human KB carcinoma membrane vesicles and inhibit drug binding to P-glycoprotein. **The Journal of biological chemistry**, v. 262, n. 5, p. 2166–70, 15 fev. 1987.

CORTOPASSI, W. A. et al. Theoretical and experimental studies of new modified isoflavonoids as potential inhibitors of topoisomerase I from *Plasmodium falciparum*. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e91191, jan. 2014.

COWELL, I. G.; AUSTIN, C. A. Mechanism of generation of therapy related leukemia in response to anti-topoisomerase II agents. **International journal of environmental research and public health**, v. 9, n. 6, p. 2075–91, jun. 2012.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 72–9, 22 ago. 2005.

DATTA, S. R.; BRUNET, A.; GREENBERG, M. E. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes & development**, v. 13, n. 22, p. 2905–27, 15 nov. 1999.

DE FARIA, F. C. C. et al. NFκB pathway and microRNA-9 and -21 are involved in sensitivity to the pterocarpanquinone LQB-118 in different CML cell lines. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 15, n. 3, p. 345–52, 2015.

DE FARIA, F. C. C. **Investigação do mecanismo de ação do novo composto pterocarpanquinona LQB-118 em células de leucemia mieloide crônica**. [s.l.] Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2016.

DE MAGALHÃES, C. S. et al. A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands. **Information Sciences**, v. 289, p. 206–224, dez. 2014.

DE SÁ BACELAR, T. et al. The pterocarpanquinone LQB 118 induces apoptosis in tumor cells through the intrinsic pathway and the endoplasmic reticulum stress pathway. **Anti-cancer drugs**, v. 24, n. 1, p. 73–83, jan. 2013.

DE SOUZA REIS, F. R. et al. The therapeutical potential of a novel pterocarpanquinone LQB-118 to target inhibitor of apoptosis proteins in acute myeloid leukemia cells. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 13, n. 2, p. 341–51, fev. 2013.

DEFEO-JONES, D. et al. Tumor cell sensitization to apoptotic stimuli by selective inhibition of specific Akt/PKB family members. **Molecular cancer therapeutics**, v. 4, n. 2, p. 271–9, fev. 2005.

- DEMING, P. B. et al. The human decatenation checkpoint. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 21, p. 12044–9, 9 out. 2001.
- DEWEESE, J. E.; OSHEROFF, N. The use of divalent metal ions by type II topoisomerases. **Metalomics : integrated biometal science**, v. 2, n. 7, p. 450–9, jul. 2010.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: Third Edition**. [s.l: s.n.].
- DEZHENKOVA, L. G. et al. Anthracycline antibiotics and their derivatives--inhibitors of topoisomerase I. **Bioorganicheskaia khimiia**, v. 34, n. 3, p. 430–2, 2008.
- DING, H.; LIN, H.; FENG, J. The rate of opening and closing of the DNA gate for topoisomerase II. **Theory in biosciences = Theorie in den Biowissenschaften**, v. 132, n. 1, p. 61–4, mar. 2013.
- DÖHNER, H. et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, v. 115, n. 3, p. 453–74, 21 jan. 2010.
- DRAKAKI, A.; ILIOPOULOS, D. MicroRNA Gene Networks in Oncogenesis. **Current Genomics**, v. 10, n. 1, p. 35–41, 1 mar. 2009.
- EISENBERG, D.; LÜTHY, R.; BOWIE, J. U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods in enzymology**, v. 277, p. 396–404, jan. 1997.
- EL-AWADY, R. et al. The Role of Eukaryotic and Prokaryotic ABC Transporter Family in Failure of Chemotherapy. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, p. 535, 10 jan. 2016.
- EZOE, S. Secondary leukemia associated with the anti-cancer agent, etoposide, a topoisomerase II inhibitor. **International journal of environmental research and public health**, v. 9, n. 7, p. 2444–53, jul. 2012.
- FERNANDES, J. et al. Pomolic acid may overcome multidrug resistance mediated by overexpression of anti-apoptotic Bcl-2 proteins. **Cancer letters**, v. 245, n. 1–2, p. 315–20, 8 jan. 2007.
- FERRARA, F. Treatment of Unfit Patients With Acute Myeloid Leukemia: A Still Open Clinical Challenge. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 11, n. 1, p. 10–16, fev. 2011.
- FERREIRA, L. et al. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384–13421, 22 jul. 2015.
- FIELDING, A. K. et al. Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 944–50, 1 fev. 2007.
- FLETCHER, J. I. et al. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 2, p. 147–156, 15 fev. 2010.

FORMOSA, A. et al. MicroRNAs, miR-154, miR-299-5p, miR-376a, miR-376c, miR-377, miR-381, miR-487b, miR-485-3p, miR-495 and miR-654-3p, mapped to the 14q32.31 locus, regulate proliferation, apoptosis, migration and invasion in metastatic prostate cancer cells. **Oncogene**, v. 33, n. 44, p. 5173–82, 30 out. 2014.

FORTERRE, P. et al. Origin and evolution of DNA topoisomerases. **Biochimie**, v. 89, n. 4, p. 427–46, abr. 2007.

FORTIER, A.-M.; ASSELIN, E.; CADRIN, M. Functional specificity of Akt isoforms in cancer progression. **BioMolecular Concepts**, v. 2, n. 1–2, p. 1–11, 1 jan. 2011.

FRANSECKY, L.; MOCHMANN, L. H.; BALDUS, C. D. Outlook on PI3K/AKT/mTOR inhibition in acute leukemia. **Molecular and cellular therapies**, v. 3, n. 1, p. 2, 20 dez. 2015.

FUJIMOTO, S. Promising antitumor activity of a novel quinoline derivative, TAS-103, against fresh clinical specimens of eight types of tumors measured by flow cytometric DNA analysis. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 30, n. 10, p. 1923–9, out. 2007.

FUKUDA, Y. et al. 3EZ,20Ac-ingenol, a catalytic inhibitor of topoisomerases, downregulates p-Akt and induces DSBs and apoptosis of DT40 cells. **Archives of pharmacal research**, v. 36, n. 8, p. 1029–38, 18 ago. 2013.

FUKUDA, Y.; SCHUETZ, J. D. ABC transporters and their role in nucleoside and nucleotide drug resistance. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 8, p. 1073–1083, 15 abr. 2012.

FUNATO, T. et al. Assessment of drug resistance in acute myeloid leukemia. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 4, n. 5, p. 705–13, set. 2004.

FURET, P. et al. Discovery of a new class of catalytic topoisomerase II inhibitors targeting the ATP-binding site by structure based design. Part I. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 15, p. 4014–7, 1 ago. 2009.

GERLINGER, M. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. **The New England journal of medicine**, v. 366, n. 10, p. 883–92, 8 mar. 2012.

GHILAROV, D. A.; SHKUNDINA, I. S. DNA topoisomerases and their functions in a cell. **Molecular Biology**, v. 46, n. 1, p. 47–57, 16 fev. 2012.

GILLILAND, D. G. The Molecular Basis of Leukemia. **Hematology**, v. 2004, n. 1, p. 80–97, 1 jan. 2004.

GILROY, K. L.; AUSTIN, C. A. The impact of the C-terminal domain on the interaction of human DNA topoisomerase II α and β with DNA. **PloS one**, v. 6, n. 2, p. e14693, jan. 2011.

GIOVANNETTI, E. et al. Molecular mechanisms underlying the role of microRNAs (miRNAs) in anticancer drug resistance and implications for clinical practice. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 81, n. 2, p. 103–122, fev. 2012.

GIROUARD, J. et al. Involvement of Akt isoforms in chemoresistance of endometrial

- carcinoma cells. **Gynecologic Oncology**, v. 128, n. 2, p. 335–343, fev. 2013.
- GOUNARIS-SHANNON, S.; CHEVASSUT, T. The Role of miRNA in Haematological Malignancy. **Bone marrow research**, v. 2013, p. 269107, 2013.
- GRANDAGE, V. L. et al. PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kB, MAPkinase and p53 pathways. **Leukemia**, v. 19, n. 4, p. 586–94, 10 fev. 2005.
- GREGORY, R. I.; SHIEKHATTAR, R. MicroRNA biogenesis and cancer. **Cancer research**, v. 65, n. 9, p. 3509–12, 1 maio 2005.
- GROTTKE, A. et al. Downregulation of AKT3 Increases Migration and Metastasis in Triple Negative Breast Cancer Cells by Upregulating S100A4. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0146370, 7 jan. 2016.
- GUIANVARC'H, D. et al. Synthesis and biological activity of sulfonamide derivatives of epipodophyllotoxin. **Journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 9, p. 2365–74, 22 abr. 2004.
- HANDE, K. R. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v. 1400, n. 1–3, p. 173–184, 1 out. 1998.
- HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, jan. 2012.
- HARRIS, N. L. et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. **Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 10, n. 12, p. 1419–32, dez. 1999.
- HARRISON, C. J.; FORONI, L. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. **Reviews in clinical and experimental hematology**, v. 6, n. 2, p. 91-113–2, jun. 2002.
- HATA, K. et al. Differentiation-inducing activity of lupane triterpenes on a mouse melanoma cell line. **Cytotechnology**, v. 52, n. 3, p. 151–8, nov. 2006.
- HAYHOE, F. G. Classification of acute leukaemias. **Blood reviews**, v. 2, n. 3, p. 186–93, set. 1988.
- HEBERLÉ, G.; DE AZEVEDO, W. F. Bio-inspired algorithms applied to molecular docking simulations. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 9, p. 1339–52, jan. 2011.
- HOFBAUER, S. W. et al. The AKT1 isoform plays a dominant role in the survival and chemoresistance of chronic lymphocytic leukaemia cells. **British journal of haematology**, v. 172, n. 5, p. 815–9, mar. 2016.
- HOLLAND, P. M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**

America, v. 88, n. 16, p. 7276–80, 15 ago. 1991.

HOLOHAN, C. et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 10, p. 714–726, 24 set. 2013.

HOWLADER, N. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014. **National Cancer Institute. Bethesda, MD**, 2017.

HUANG, Y. et al. New polymorphs of 9-nitro-camptothecin prepared using a supercritical anti-solvent process. **International journal of pharmaceutics**, 2 nov. 2015.

HUNGERFORD, D. A. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. **Stain technology**, v. 40, n. 6, p. 333–8, nov. 1965.

IDRISS, H. T. et al. Regulation of volume-activated chloride channels by P-glycoprotein: phosphorylation has the final say! **The Journal of physiology**, v. 524 Pt 3, p. 629–36, 1 maio 2000.

IMPERATORE, C. et al. Alkaloids from marine invertebrates as important leads for anticancer drugs discovery and development. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 12, p. 20391–423, jan. 2014.

INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, v. 381, n. 9881, p. 1943–1955, 2013.

INMAN, M. et al. Antitumour indolequinones: synthesis and activity against human pancreatic cancer cells. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 12, n. 27, p. 4848–61, 21 jul. 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Condutas do INCA/MS – Procedures INCA, Leucemias Agudas na Infância e Adolescência. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 245–257, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Condutas do INCA/MS – Guidelines INCA, Leucemia Mielóide Aguda em Adultos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 313–315, 2002a.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Condutas do INCA/MS – Guidelines INCA, Leucemia Linfóide Aguda em Adulto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 309–312, 2002b.

JANSSON, M. D.; LUND, A. H. MicroRNA and cancer. **Molecular Oncology**, v. 6, n. 6, p. 590–610, dez. 2012.

JIANG, Y. et al. Vitamin K4 induces tumor cytotoxicity in human prostate carcinoma PC-3 cells via the mitochondria-related apoptotic pathway. **Die Pharmazie**, v. 68, n. 6, p. 442–8, jun. 2013.

KAHMANN, L. et al. Mitomycin C in patients with gynecological malignancies. **Onkologie**, v. 33, n. 10, p. 547–57, jan. 2010.

KAMAL, A. et al. Podophyllotoxin derivatives: a patent review (2012 - 2014). **Expert**

opinion on therapeutic patents, v. 25, n. 9, p. 1025–34, jan. 2015.

KAPOOR R. et al. Altered topoisomerase I expression in two subclones of human CEM leukemia selected for resistance to camptothecin. **Oncol Res**, v. 7, n.2, p. 83-95, 1995.

KATHIRAVAN, M. K. et al. Topoisomerase as target for antibacterial and anticancer drug discovery. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 28, n. 3, p. 419–35, jun. 2013.

KETRON, A. C. et al. Amsacrine as a topoisomerase II poison: importance of drug-DNA interactions. **Biochemistry**, v. 51, n. 8, p. 1730–9, 28 fev. 2012.

KHABELE, D. et al. Preferential effect of akt2-dependent signaling on the cellular viability of ovarian cancer cells in response to EGF. **Journal of Cancer**, v. 5, n. 8, p. 670–8, 2014.

KHADKA, D. B.; CHO, W.-J. 3-Arylisoquinolines as novel topoisomerase I inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 19, n. 2, p. 724–34, 15 jan. 2011.

KHADKA, D. B.; CHO, W.-J. Topoisomerase inhibitors as anticancer agents: a patent update. **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 23, n. 8, p. 1033–56, ago. 2013.

KOH, Y.; NISHIO, K.; SAIJO, N. Mechanisms of Action of Cancer Chemotherapeutic Agents: Topoisomerase Inhibitors. In: **The Cancer Handbook**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2005.

KOLARIC, K. et al. A phase II trial of cardioprotection with Cardioxane (ICRF-187) in patients with advanced breast cancer receiving 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide. **Oncology**, v. 52, n. 3, p. 251–5, jan. 1995.

KOSTRZEWA-NOWAK, D. et al. Role of structural factors of antitumour anthraquinone derivatives and analogues in the ability to undergo bioreductive activation by NADPH cytochrome P450 reductase: implications for increasing the activity against sensitive and multidrug-resistant leuka. **Anti-cancer drugs**, v. 23, n. 4, p. 393–405, abr. 2012.

KRISHNAMURTHY, P.; SCHUETZ, J. D. The ABC transporter Abcg2/Bcrp: role in hypoxia mediated survival. **Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, v. 18, n. 4, p. 349–58, ago. 2005.

KRUCZYNSKI, A. et al. Decreased nucleotide excision repair activity and alterations of topoisomerase IIalpha are associated with the in vivo resistance of a P388 leukemia subline to F11782, a novel catalytic inhibitor of topoisomerases I and II. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 10, n. 9, p. 3156–68, 1 maio 2004.

KUETE, V. et al. Cytotoxic compounds from the fruits of *Uapaca togoensis* towards multifactorial drug-resistant cancer cells. **Planta medica**, v. 81, n. 1, p. 32–8, jan. 2015.

KUMAR, C. C. Genetic Abnormalities and Challenges in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 2, p. 95–107, 1 fev. 2011.

KUNJACHAN, S. et al. Multidrug resistance: Physiological principles and nanomedical solutions. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 13–14, p. 1852–1865, nov. 2013.

- KURTZBERG, L. S. et al. Genz-644282, a novel non-camptothecin topoisomerase I inhibitor for cancer treatment. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 17, n. 9, p. 2777–87, 1 maio 2011.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 15 ago. 1970.
- LAGE, H. et al. Modulation of DNA topoisomerase II activity and expression in melanoma cells with acquired drug resistance. **British journal of cancer**, v. 82, n. 2, p. 488–91, 18 jan. 2000.
- LANCET, J. E.; KARP, J. E. Novel postremission strategies in adults with acute myeloid leukemia. **Current Opinion in Hematology**, v. 16, n. 2, p. 105–111, mar. 2009.
- LARIZZA, L.; MAGNANI, I.; BEGHINI, A. The Kasumi-1 cell line: a t(8;21)-kit mutant model for acute myeloid leukemia. **Leukemia & lymphoma**, v. 46, n. 2, p. 247–55, mar. 2005.
- LARSEN, A. K.; ESCARGUEIL, A. E.; SKLADANOWSKI, A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. **Pharmacology & therapeutics**, v. 99, n. 2, p. 167–81, ago. 2003.
- LEBEDEVA, I. V; PANDE, P.; PATTON, W. F. Sensitive and specific fluorescent probes for functional analysis of the three major types of mammalian ABC transporters. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e22429, jan. 2011.
- LEE, S. H. et al. Glyceollins, a novel class of soy phytoalexins, inhibit angiogenesis by blocking the VEGF and bFGF signaling pathways. **Molecular nutrition & food research**, v. 57, n. 2, p. 225–34, fev. 2013.
- LEITH, C. P. et al. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. **Blood**, v. 94, n. 3, p. 1086–99, 1 ago. 1999.
- LI, F. et al. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 10, p. 5434–40, 15 maio 2008a.
- LI, X.-N. et al. Tonkinensines A and B, two novel alkaloids from *Sophora tonkinensis*. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 23, p. 3797–3801, jun. 2008b.
- LINDSEY, R. H. et al. Catalytic core of human topoisomerase II α : insights into enzyme-DNA interactions and drug mechanism. **Biochemistry**, v. 53, n. 41, p. 6595–602, 21 out. 2014.
- LINNERTH-PETRIK, N. M. et al. Opposing functions of Akt isoforms in lung tumor initiation and progression. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e94595, 10 abr. 2014.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

- LO NIGRO, L. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of pediatric hematology/oncology**, v. 35, n. 4, p. 245–52, maio 2013.
- LORUSSO, D. et al. Review role of topotecan in gynaecological cancers: current indications and perspectives. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 74, n. 3, p. 163–74, jun. 2010.
- LOU, C. et al. MiR-485-3p and miR-485-5p suppress breast cancer cell metastasis by inhibiting PGC-1 α expression. **Cell death & disease**, v. 7, n. 3, p. e2159, 24 mar. 2016.
- LOVELL, S. C. et al. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. **Proteins**, v. 50, n. 3, p. 437–50, 15 fev. 2003.
- M. BOLAND, G.; M. X. DONNELLY, D. Isoflavonoids and related compounds. **Natural Product Reports**, v. 15, n. 3, p. 241, 1 jan. 1998.
- MAHON FX. et al. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. **Blood**, v. 96, n. 3, p. 1070-9, 1 aug 2000.
- MAIA, R. C. et al. LQB-118, a pterocarpanquinone structurally related to lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone]: a novel class of agent with high apoptotic effect in chronic myeloid leukemia cells. **Investigational new drugs**, v. 29, n. 6, p. 1143–55, dez. 2011.
- MAIA, R. C.; RUMJANEK, V. M. Mecanismos Moleculares de Resistência a Múltiplas Drogas. In: **Oncologia Molecular**. 2. ed. [s.l.] Atheneu, 2009. p. 469.
- MALONNE, H. et al. In vitro and in vivo pharmacological characterizations of the antitumor properties of two new olivacine derivatives, S16020-2 and S30972-1. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 6, n. 9, p. 3774–82, set. 2000.
- MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1261–1274, 29 jun. 2007.
- MAO, Q.; UNADKAT, J. D. Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update. **The AAPS Journal**, v. 17, n. 1, p. 65–82, 19 jan. 2015.
- MARCUCCI, G.; HAFERLACH, T.; DÖHNER, H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 29, n. 5, p. 475–86, 10 fev. 2011.
- MARIN, J. J. G. et al. Genetic variants in genes involved in mechanisms of chemoresistance to anticancer drugs. **Current cancer drug targets**, v. 12, n. 4, p. 402–38, maio 2012.
- MARTELLI, A. A. et al. The Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. **Oncotarget**, v. 1, n. 2, p. 89–103, 1 jun. 2010.

MARTELLI, A. M. et al. Intranuclear 3'-phosphoinositide metabolism and Akt signaling: new mechanisms for tumorigenesis and protection against apoptosis? **Cellular signalling**, v. 18, n. 8, p. 1101–7, ago. 2006.

MARTÍNEZ, R.; CHACÓN-GARCÍA, L. The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work. **Current medicinal chemistry**, v. 12, n. 2, p. 127–51, jan. 2005.

MARTINO, T. et al. The pterocarpanquinone LQB-118 inhibits tumor cell proliferation by downregulation of c-Myc and cyclins D1 and B1 mRNA and upregulation of p21 cell cycle inhibitor expression. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 12, p. 3115–22, 15 jun. 2014.

MATSUMOTO, Y. et al. Altered topoisomerase II α and multidrug resistance-associated protein levels during drug selection: adaptations to increasing drug pressure. **Japanese journal of cancer research : Gann**, v. 92, n. 9, p. 968–74, set. 2001.

MAURICH, T. et al. Erybraedin C and bitucarpin A, two structurally related pterocarpanes purified from *Bituminaria bituminosa*, induced apoptosis in human colon adenocarcinoma cell lines MMR- and p53-proficient and -deficient in a dose-, time-, and structure-dependent fashion. **Chemico-biological interactions**, v. 159, n. 2, p. 104–16, 1 fev. 2006.

MCCUBREY, J. A. et al. Therapeutic resistance resulting from mutations in Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR signaling pathways. **Journal of cellular physiology**, v. 226, n. 11, p. 2762–81, nov. 2011.

MENDES, J. A. et al. 11a-N-arylsulfonyl-5-carbapterocarpanes: Synthesis, antitumor evaluation on human cancer cell lines (leukemia and breast cancer) and molecular modeling studies. **European journal of medicinal chemistry**, 2017.

MENG, L.-H.; LIAO, Z.-Y.; POMMIER, Y. Non-camptothecin DNA topoisomerase I inhibitors in cancer therapy. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 3, n. 3, p. 305–20, jan. 2003.

MILITÃO, G. C. G. et al. Pterocarpanes induce tumor cell death through persistent mitotic arrest during prometaphase. **Biochimie**, v. 104, p. 147–55, set. 2014.

MIZUSHINA, Y. et al. Inhibitory effects of a major soy isoflavone, genistein, on human DNA topoisomerase II activity and cancer cell proliferation. **International journal of oncology**, v. 43, n. 4, p. 1117–24, out. 2013.

MOROHASHI, K. et al. Identification of a drug target motif: an anti-tumor drug NK109 interacts with a PNxxxxP. **Biochemical pharmacology**, v. 70, n. 1, p. 37–46, 1 jul. 2005.

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, 16 dez. 1983.

NAITO, S. et al. Non-P-glycoprotein-mediated atypical multidrug resistance in a human bladder cancer cell line. **Japanese journal of cancer research : Gann**, v. 86, n. 11, p. 1112–8, nov. 1995.

NATARAJAN, K. et al. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 8, p. 1084–1103, 15 abr. 2012.

NERSTING, J.; BORST, L.; SCHMIEGELOW, K. Challenges in implementing individualized medicine illustrated by antimetabolite therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Clinical Proteomics**, v. 8, n. 1, p. 8, 2011.

NESTAL DE MORAES, G. et al. The pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells of distinct molecular subtypes and targets FoxO3a and FoxM1 transcription factors. **International journal of oncology**, v. 45, n. 5, p. 1949–58, nov. 2014.

NETTO, C. D. et al. (+/-)-3,4-Dihydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan and derivatives: cytotoxic effect on human leukemia cell lines. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 2, p. 920–5, fev. 2009.

NETTO, C. D. et al. New pterocarpanquinones: synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF-alpha modulation in human PBMC cells. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 18, n. 4, p. 1610–6, 15 fev. 2010.

NEVES, A. P. et al. Exploring the DNA binding/cleavage, cellular accumulation and topoisomerase inhibition of 2-hydroxy-3-(aminomethyl)-1,4-naphthoquinone Mannich bases and their platinum(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 119, p. 54–64, fev. 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of natural products**, v. 66, n. 7, p. 1022–37, jul. 2003.

NGUYEN, K. et al. Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. **Leukemia**, v. 22, n. 12, p. 2142–50, dez. 2008.

NGUYEN, P. H. et al. Cytotoxic and PTP1B inhibitory activities from *Erythrina abyssinica*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 23, p. 6745–9, 1 dez. 2009.

NIELSEN, D.; MAARE, C.; SKOVSGAARD, T. Cellular resistance to anthracyclines. **General pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 251–5, mar. 1996.

NITISS, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 5, p. 338–350, 20 abr. 2009a.

NITISS, J. L. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 5, p. 327–37, maio 2009b.

O'DONNELL, M. R. et al. Acute myeloid leukemia. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN**, v. 10, n. 8, p. 984–1021, ago. 2012.

ODENIKE, O. et al. Gene mutations, epigenetic dysregulation, and personalized therapy in myeloid neoplasia: are we there yet? **Seminars in oncology**, v. 38, n. 2, p. 196–214, abr. 2011.

OKADA, Y. et al. Atypical multidrug resistance may be associated with catalytically active mutants of human DNA topoisomerase II alpha. **Gene**, v. 272, n. 1–2, p. 141–8, 11 jul. 2001.

ORIOLO, A. et al. Outcome after relapse of acute lymphoblastic leukemia in adult patients included in four consecutive risk-adapted trials by the PETHEMA Study Group. **Haematologica**, v. 95, n. 4, p. 589–96, 1 abr. 2010.

PALCHAUDHURI, R.; HERGENROTHER, P. J. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. **Current opinion in biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 497–503, dez. 2007.

PALLIS, M. et al. Analysis of the interaction of induction regimens with p-glycoprotein expression in patients with acute myeloid leukaemia: results from the MRC AML15 trial. **Blood cancer journal**, v. 1, n. 6, p. e23, jun. 2011.

PALLIS, M.; RUSSELL, N. P-glycoprotein plays a drug-efflux-independent role in augmenting cell survival in acute myeloblastic leukemia and is associated with modulation of a sphingomyelin-ceramide apoptotic pathway. **Blood**, v. 95, n. 9, p. 2897–904, 1 maio 2000.

PARK, S.-E. et al. 3-(3-Butylamino-2-hydroxy-propoxy)-1-hydroxy-xanthen-9-one acts as a topoisomerase II α catalytic inhibitor with low DNA damage. **European journal of medicinal chemistry**, v. 69, p. 139–45, nov. 2013.

PASTOR, N. et al. The DNA topoisomerase II catalytic inhibitor merbarone is genotoxic and induces endoreduplication. **Mutation research**, v. 738–739, p. 45–51, jan. 2012.

PELEG, R. et al. Modification of topoisomerases in mammospheres derived from breast cancer cell line: clinical implications for combined treatments with tyrosine kinase inhibitors. **BMC cancer**, v. 14, n. 1, p. 910, jan. 2014.

PENDLETON, M. et al. Topoisomerase II and leukemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1310, p. 98–110, mar. 2014.

PENG, F. et al. miR-23a promotes cisplatin chemoresistance and protects against cisplatin-induced apoptosis in tongue squamous cell carcinoma cells through Twist. **Oncology reports**, v. 33, n. 2, p. 942–50, fev. 2015.

PÉREZ-SAYÁNS, M. et al. Current trends in miRNAs and their relationship with oral squamous cell carcinoma. **Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 41, n. 6, p. 433–43, jul. 2012.

PINTO-SILVA, F. E. **Seleção e caracterização de uma nova linhagem leucêmica humana MDR**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

POGORELČNIK, B.; PERDIH, A.; SOLMAJER, T. Recent developments of DNA poisons--human DNA topoisomerase II α inhibitors--as anticancer agents. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 13, p. 2474–88, jan. 2013a.

POGORELČNIK, B.; PERDIH, A.; SOLMAJER, T. Recent advances in the development of catalytic inhibitors of human DNA topoisomerase II α as novel anticancer agents. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 5, p. 694–709, jan. 2013b.

- POGRIBNY, I. P. et al. Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin. **International journal of cancer**, v. 127, n. 8, p. 1785–94, 15 out. 2010.
- POMMIER, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 10, p. 789–802, out. 2006.
- POMMIER, Y. et al. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. **Chemistry & biology**, v. 17, n. 5, p. 421–33, 28 maio 2010.
- POMMIER, Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges. **ACS chemical biology**, v. 8, n. 1, p. 82–95, 18 jan. 2013.
- POMMIER, Y.; CUSHMAN, M. The indenoisoquinoline noncamptothecin topoisomerase I inhibitors: update and perspectives. **Molecular cancer therapeutics**, v. 8, n. 5, p. 1008–14, maio 2009.
- POPLIN, E. A. et al. Randomized clinical trial of mitomycin-C with or without pretreatment with WR-2721 in patients with advanced colorectal cancer. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 33, n. 5, p. 415–9, jan. 1994.
- PULTE, D.; GONDOS, A.; BRENNER, H. Improvement in survival in younger patients with acute lymphoblastic leukemia from the 1980s to the early 21st century. **Blood**, v. 113, n. 7, p. 1408–11, 12 fev. 2009.
- QADIR, M. et al. Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 6, p. 2320–6, 15 mar. 2005.
- RABINDRAN, S. K. et al. Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. **Cancer research**, v. 60, n. 1, p. 47–50, 1 jan. 2000.
- RANDOLPH, T. R. Advances in acute lymphoblastic leukemia. **Clinical laboratory science : journal of the American Society for Medical Technology**, v. 17, n. 4, p. 235–45, jan. 2004.
- REBUCCI, M.; MICHIELS, C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. **Biochemical pharmacology**, v. 85, n. 9, p. 1219–26, 1 maio 2013.
- REGAL, K. M.; MERCER, S. L.; DEWEESE, J. E. HU-331 is a catalytic inhibitor of topoisomerase II α . **Chemical research in toxicology**, v. 27, n. 12, p. 2044–51, 15 dez. 2014.
- RICHARD A. LARSON, M. **Acute leukemia**. Disponível em: <http://www.medicinanet.com.br/m/conteudos/acp-medicine/5686/leucemia_aguda_-_richard_a_larson.htm>. Acesso em: 26 out. 2015.
- ROBAK, T.; WIERZBOWSKA, A. Current and emerging therapies for acute myeloid leukemia. **Clinical therapeutics**, v. 31 Pt 2, p. 2349–70, jan. 2009.
- ROCA, J. The torsional state of DNA within the chromosome. **Chromosoma**, v. 120, n. 4, p. 323–34, ago. 2011.

ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. **Cancer Letters**, v. 332, n. 2, p. 237–248, 28 maio 2013.

ROSS, D. D. et al. Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. **Blood**, v. 96, n. 1, p. 365–8, 1 jul. 2000.

ROSS, D. D.; NAKANISHI, T. Impact of Breast Cancer Resistance Protein on Cancer Treatment Outcomes. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l: s.n.]. v. 596p. 251–290.

RUEFLI, A. A.; JOHNSTONE, R. W. A role for P-glycoprotein in regulating cell growth and survival. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, n. 1, p. 31–47, jul. 2003.

SAIF, M. W. et al. A phase I dose-escalation study of edotecarin (J-107088) combined with infusional 5-fluorouracil and leucovorin in patients with advanced/metastatic solid tumors. **Anti-cancer drugs**, v. 21, n. 7, p. 716–23, ago. 2010.

SAKAI, C.; MUROTANI, N. [Adult T-cell leukemia/lymphoma in a patient on hemodialysis-resistance to CHOP, but unexpected effect and remission achieved by sobuzoxane alone]. **Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy**, v. 37, n. 2, p. 347–50, fev. 2010.

SALERNO, S. et al. Recent advances in the development of dual topoisomerase I and II inhibitors as anticancer drugs. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 35, p. 4270–90, 2010.

SALUSTIANO, E. J. S. et al. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, alpha-lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. **Investigational new drugs**, v. 28, n. 2, p. 139–44, abr. 2010.

SARGENT, J. M. et al. Breast cancer resistance protein expression and resistance to daunorubicin in blast cells from patients with acute myeloid leukaemia. **British journal of haematology**, v. 115, n. 2, p. 257–62, nov. 2001.

SCHAICH, M. et al. A sensitive model for prediction of relapse in adult acute myeloid leukaemia with t(8;21) using white blood cell count, CD56 and MDR1 gene expression at diagnosis. **British journal of haematology**, v. 125, n. 4, p. 477–9, maio 2004.

SCHMIEDER, P. K. et al. Discriminating redox cycling and arylation pathways of reactive chemical toxicity in trout hepatocytes. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 72, n. 1, p. 66–76, mar. 2003.

SCHOEFFLER, A. J.; BERGER, J. M. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 41, n. 1, p. 41–101, 29 ago. 2008.

SCOTTI, L. et al. Natural Product Inhibitors of Topoisomerases: Review and Docking Study. **Current protein & peptide science**, 11 jan. 2017.

SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 7731, p. 971–2, 30 out. 1971.

SHAFFER, B. C. et al. Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML. **Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 15, n. 1–2, p. 62–9, fev. 2012.

SHAH, S. S. A.; RIVERA, G.; ASHFAQ, M. Recent advances in medicinal chemistry of sulfonamides. Rational design as anti-tumoral, anti-bacterial and anti-inflammatory agents. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 1, p. 70–86, jan. 2013.

SHIMIZU, K. et al. Potential usage of liposomal 4beta-aminoalkyl-4'-O-demethyl-4-desoxypodophyllotoxin (TOP-53) for cancer chemotherapy. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 25, n. 6, p. 783–6, jun. 2002.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7–30, 2017.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 62, n. 1, p. 10–29, jan. 2012.

SILVA, K. L. et al. CPT-11-induced cell death in leukemic cells is not affected by the MDR phenotype. **Leukemia research**, v. 27, n. 3, p. 243–51, mar. 2003.

SIMONS, A.; SHAFFER, L. G.; HASTINGS, R. J. Cytogenetic Nomenclature: Changes in the ISCN 2013 Compared to the 2009 Edition. **Cytogenetic and genome research**, v. 141, n. 1, p. 1–6, jan. 2013.

SIRIKANTARAMAS, S. et al. Structural insight of DNA topoisomerases I from camptothecin-producing plants revealed by molecular dynamics simulations. **Phytochemistry**, v. 113, p. 50–6, maio 2015.

SMITH, M. L.; HILLS, R. K.; GRIMWADE, D. Independent prognostic variables in acute myeloid leukaemia. **Blood reviews**, v. 25, n. 1, p. 39–51, jan. 2011.

SØE, K.; HARTUNG, S.; GROSSE, F. Human topoisomerase I forms double cleavage complexes on natural DNA. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 349, n. 1, p. 178–85, 13 out. 2006.

SOLIS, F. J.; WETS, R. J.-B. Minimization by Random Search Techniques. **Mathematics of Operations Research**, v. 6, n. 1, p. 19–30, 1 fev. 1981.

SOUZA, P. S. et al. P-glycoprotein and survivin simultaneously regulate vincristine-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. **International journal of oncology**, v. 39, n. 4, p. 925–33, 28 out. 2011.

SRIKANTAN, S. et al. Translational control of TOP2A influences doxorubicin efficacy. **Molecular and cellular biology**, v. 31, n. 18, p. 3790–801, set. 2011.

STAKER, B. L. et al. Nonlinear partial differential equations and applications: The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15387–15392, 26 nov. 2002.

STEINBACH, D. et al. BCRP gene expression is associated with a poor response to remission induction therapy in childhood acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 16, n. 8, p. 1443–7, ago. 2002.

STEWART, L.; IRETON, G. C.; CHAMPOUX, J. J. The domain organization of human topoisomerase I. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 13, p. 7602–8, 29 mar. 1996.

STIBOROVÁ, M.; FREI, E. Ellipticines as DNA-targeted chemotherapeutics. **Current medicinal chemistry**, v. 21, n. 5, p. 575–91, jan. 2014.

STYCZYŃSKI, J.; HAUS, O. [Cytogenetics and in vitro drug resistance of acute leukemia in children and adults]. **Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)**, v. 60, p. 527–37, jan. 2006.

SUDAN, S.; RUPASINGHE, H. P. V. Flavonoid-enriched apple fraction AF4 induces cell cycle arrest, DNA topoisomerase II inhibition, and apoptosis in human liver cancer HepG2 cells. **Nutrition and cancer**, v. 66, n. 7, p. 1237–46, jan. 2014.

SUPURAN, C. T. et al. COX-2 selective inhibitors, carbonic anhydrase inhibition and anticancer properties of sulfonamides belonging to this class of pharmacological agents. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 4, n. 6, p. 625–32, ago. 2004.

SUVANNASANKHA, A. et al. Breast cancer resistance protein (BCRP/MXR/ABCG2) in acute myeloid leukemia: discordance between expression and function. **Leukemia**, v. 18, n. 7, p. 1252–7, 21 jul. 2004.

SWERDLOW, S. H. et al. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. [s.l.: s.n.]. v. 4th

SWIFT, L. P. et al. The cardio-protecting agent and topoisomerase II catalytic inhibitor sobuzoxane enhances doxorubicin-DNA adduct mediated cytotoxicity. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 61, n. 5, p. 739–49, abr. 2008.

SZAKÁCS, G. et al. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 219–234, mar. 2006.

TAKIGAWA, N. et al. Establishment and characterization of an etoposide-resistant human small cell lung cancer cell line. **Acta medica Okayama**, v. 46, n. 3, p. 203–12, jun. 1992.

TAN, K. B. et al. Nonproductive rearrangement of DNA topoisomerase I and II genes: correlation with resistance to topoisomerase inhibitors. **Journal Of The National Cancer Institute**, v. 81, n. 22, p. 1732–1735, 1989.

TAREEN, B. et al. A 12 week, open label, phase I/IIa study using apatone for the treatment of prostate cancer patients who have failed standard therapy. **International journal of medical sciences**, v. 5, n. 2, p. 62–7, jan. 2008.

TESTA, J. R. et al. Chromosomal alterations in acute leukemia patients studied with improved culture methods. **Cancer research**, v. 45, n. 1, p. 430–4, jan. 1985.

TETEF, M. et al. Mitomycin C and menadione for the treatment of lung cancer: a phase II trial. **Investigational new drugs**, v. 13, n. 2, p. 157–62, jan. 1995.

TEW, K. D. Drug resistance in cancer. Editorial. **Biochemical pharmacology**, v. 83, n. 8, p. 985–6, 15 abr. 2012.

TOYODA, K. et al. [Successful treatment with oral low-dose sobuzoxane and etoposide combined with rituximab in an elderly patient with HHV-8-negative primary effusion lymphoma-like lymphoma]. **[Rinshō ketsueki] The Japanese journal of clinical hematology**, v. 55, n. 7, p. 815–9, jul. 2014.

UGRAS, S. et al. Small RNA sequencing and functional characterization reveals MicroRNA-143 tumor suppressor activity in liposarcoma. **Cancer research**, v. 71, n. 17, p. 5659–69, 1 set. 2011.

UPHOFF, C. C.; DREXLER, H. G. Detection of Mycoplasma contamination in cell cultures. **Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]**, v. 106, p. 28.4.1-28.4.14, jan. 2014.

VARDIMAN, J. W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937–51, 30 jul. 2009.

VARINSKA, L. et al. Soy and breast cancer: focus on angiogenesis. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 5, p. 11728–49, jan. 2015.

VASCONCELOS, F. C. et al. Pomolic acid-induced apoptosis in cells from patients with chronic myeloid leukemia exhibiting different drug resistance profile. **Investigational new drugs**, v. 25, n. 6, p. 525–33, dez. 2007.

VASCONCELOS, F. C. et al. Phosphorylated Crkl reduction levels are associated with the lowest P-glycoprotein activity levels in cells from chronic myeloid leukemia patients. **Leukemia research**, v. 37, n. 12, p. 1711–8, dez. 2013.

VASSETZKY, Y. S.; ALGHISI, G.-C.; GASSER, S. M. DNA topoisomerase II mutations and resistance to anti-tumor drugs. **BioEssays**, v. 17, n. 9, p. 767–774, set. 1995.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of immunological methods**, v. 184, n. 1, p. 39–51, 17 jul. 1995.

VOLPE, A. et al. Mitomycin C for the treatment of bladder cancer. **Minerva urologica e nefrologica = The Italian journal of urology and nephrology**, v. 62, n. 2, p. 133–44, jun. 2010.

VOS, S. M. et al. All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 12, p. 827–841, 23 nov. 2011.

VYAS, V. K. et al. Homology modeling a fast tool for drug discovery: current perspectives. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 74, n. 1, p. 1–17, jan. 2012.

WALL, M. E. Camptothecin and taxol: discovery to clinic. **Medicinal research reviews**, v. 18, n. 5, p. 299–314, set. 1998.

WANG, B. et al. Synthesis and biological evaluation of novel naphthoquinone fused cyclic aminoalkylphosphonates and aminoalkylphosphonic monoester. **Amino acids**, v. 35, n. 2, p. 463–8, ago. 2008.

- WANG, J. et al. Expression of P-gp, MRP, LRP, GST- π and TopoII α and intrinsic resistance in human lung cancer cell lines. **Oncology reports**, v. 26, n. 5, p. 1081–9, 28 nov. 2011.
- WANG, Y.-L. et al. Mechanism of multidrug resistance of human small cell lung cancer cell line H446/VP. **Chinese medical journal**, v. 123, n. 22, p. 3299–303, nov. 2010.
- WEBB, M. R.; EBELER, S. E. A gel electrophoresis assay for the simultaneous determination of topoisomerase I inhibition and DNA intercalation. **Analytical biochemistry**, v. 321, n. 1, p. 22–30, 1 out. 2003.
- WEI, H. et al. Nucleotide-dependent domain movement in the ATPase domain of a human type IIA DNA topoisomerase. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 44, p. 37041–7, 4 nov. 2005.
- WEIDHAAS, J. B. et al. MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. **Cancer research**, v. 67, n. 23, p. 11111–6, 1 dez. 2007.
- WENDORFF, T. J. et al. The structure of DNA-bound human topoisomerase II alpha: conformational mechanisms for coordinating inter-subunit interactions with DNA cleavage. **Journal of molecular biology**, v. 424, n. 3–4, p. 109–24, 7 dez. 2012.
- WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic acids research**, v. 35, n. Web Server issue, p. W407-10, jul. 2007.
- WLODKOWIC, D.; SKOMMER, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. **Experimental oncology**, v. 34, n. 3, p. 255–62, out. 2012.
- WU, B. et al. MicroRNAs: new actors in the oral cancer scene. **Oral oncology**, v. 47, n. 5, p. 314–9, maio 2011.
- WU, N. et al. A novel DNA topoisomerase I inhibitor with different mechanism from camptothecin induces G2/M phase cell cycle arrest to K562 cells. **Biochemistry**, v. 49, n. 47, p. 10131–6, 30 nov. 2010.
- XU, N. et al. Akt: a double-edged sword in cell proliferation and genome stability. **Journal of oncology**, v. 2012, p. 951724, 2012.
- XU, Y.; LIN, Y.; ZHANG, F. The relationship between abnormal MDR gene expression and chemotherapy response in lymphoid malignancies. **Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]**, v. 28, n. 5, p. 353–6, maio 2006.
- YANG, F. et al. SH-7, a new synthesized shikonin derivative, exerting its potent antitumor activities as a topoisomerase inhibitor. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 5, p. 1184–1193, 1 set. 2006.
- YANG, H. et al. MicroRNAs regulate methionine adenosyltransferase 1A expression in hepatocellular carcinoma. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 1, p. 285–98, 2 jan. 2013.
- YOKOMIZO, A. et al. Atypical MDR. **Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy**, v. 21, n. 8, p. 1123–9, jul. 1994.

- YOO, K. H. et al. Pomolic acid induces apoptosis in SK-OV-3 human ovarian adenocarcinoma cells through the mitochondrial-mediated intrinsic and death receptor-induced extrinsic pathways. **Oncology letters**, v. 5, n. 1, p. 386–390, jan. 2013.
- YOSHIDA, M. et al. Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants VII. Active triterpenes and rosmarinic acid from Centella asiatica. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 28, n. 1, p. 173–5, jan. 2005.
- YOUN, S. H. et al. Anticancer properties of pomolic acid-induced AMP-activated protein kinase activation in MCF7 human breast cancer cells. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 35, n. 1, p. 105–10, jan. 2012.
- YU, Z. et al. MicroRNAs contribute to the chemoresistance of cisplatin in tongue squamous cell carcinoma lines. **Oral oncology**, v. 46, n. 4, p. 317–22, abr. 2010.
- YUAN, T. L.; CANTLEY, L. C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. **Oncogene**, v. 27, n. 41, p. 5497–510, 18 set. 2008.
- ZHAO, Z. et al. JNK- and Akt-mediated Puma expression in the apoptosis of cisplatin-resistant ovarian cancer cells. **The Biochemical journal**, v. 444, n. 2, p. 291–301, 1 jun. 2012.
- ZHENG, M. S. et al. Inhibition of DNA topoisomerases I and II and cytotoxicity of compounds from Ulmus davidiana var. japonica. **Archives of pharmacal research**, v. 33, n. 9, p. 1307–15, set. 2010.
- ZHOU, S.-F. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. **Xenobiotica**, v. 38, n. 7–8, p. 802–832, 22 ago. 2008.
- ZHU, X. et al. Studies on microRNAs that are correlated with the cancer stem cells in chronic myeloid leukemia. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 390, n. 1–2, p. 75–84, 3 maio 2014.

10.1 Artigos submetidos à publicação

Comprovante de submissão do artigo enviado pela revista seguido do abstract

Página 1 de 1

[ACAMC] Submission Acknowledgement | BSP-ACAMC-2017-1287
Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry
12/09/2017 15:24

Para:
Prof. Raquel Ciuvalschi Maia
Mostrar detalhes

Reference#: BSP-ACAMC-2017-1287
Submission Title: ANTITUMOR EFFECT OF POMOLIC ACID IN ACUTE MYELOID
LEUKEMIA CELLS INVOLVES CELL DEATH, DECREASED CELL GROWTH AND
TOPOISOMERASES INHIBITION

Dear Prof. Raquel Ciuvalschi Maia,

Thank you for your submission to Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. It will be sent to the Editor in Chief for his approval, and once this is obtained for peer-reviewing, on the understanding that the manuscript contains original work that has neither been published earlier nor has simultaneously been submitted elsewhere. In case this is not so, please let us know immediately.

Please note that Bentham Science uses **CrossCheck's iThenticate software** to check for similarities between the submitted and already published material to minimise any chances of plagiarism.

Further, as per Bentham Science's **Ethical Guidelines for Publication**, all manuscript are processed with the understanding that all authors and co-authors have reviewed and accordingly approved the manuscript before final submission to avoid any conflicts of interest later. Our ethical policies can be viewed at: <http://benthamscience.com/journals/anti-cancer-agents-in-medicinal-chemistry/editorial-policies/#top>.

In case of any doubt or conflict please contact us immediately.

Your manuscript has been assigned to the following Editor/Manager, to whom all correspondence is to be addressed:

Name: Michelle Prudhomme
Affiliation: Emeritus Professor Institut de Chimie de Clermont-Ferrand ICCF-CNRS UMR 6296
Université Clermont Auvergne
Email: michelle.prudhomme@uca.fr
Looking forward to the successful publication of your article.

In case of delay, please feel free to write info@benthamscience.org

Sincerely,
Editorial Office
Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry
Bentham Science Publishers

ANTITUMOR EFFECT OF POMOLIC ACID IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA CELLS INVOLVES CELL DEATH, DECREASED CELL GROWTH AND TOPOISOMERASES INHIBITION

Michelle X. G. Pereira^{1,2}, Amanda S. O Hammes³, Flávia C. Vasconcelos¹, Aline R. Pozzo^{1,2}, Thaís Hancio Pereira¹, Ernesto R. Caffarena³, Cerli R. Gattass⁴, Raquel C. Maia^{1*}

¹Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, (RJ), Brazil.

²Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Oncologia, INCA, RJ, Brazil.

³Grupo de Biofísica Computacional e Modelagem Molecular, Programa de Computação Científica, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁴Laboratório de Imunologia Celular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brazil

*Corresponding author:

E-mail address: rcmaia@inca.gov.br

Telephone number: + 55 21 3207 1198

Adress: Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer, Praça Cruz Vermelha 23, 6º andar, Centro, Rio de Janeiro, Brazil. CEP. 20230-130

ABSTRACT

Background: Acute myeloide leukemia (AML) represent the largest number of annual deaths from hematologic malignancy. In the United-States, it is estimated that 21.380 individuals will be diagnosed with AML and 49.5% of patients will die in 2017. Therefore, the searching for novel compounds capable of increasing the overall survival rate to the treatment of AML cells is urgent.

Objectives: To investigate the cytotoxicity effect of the natural compound PA and to explore the mechanism of action of PA in AML cell lines with different phenotypes. **Methods:** It was used three different AML cell lines, HL60, U937 and Kasumi-1 cells with different mechanisms of resistance to analyze the effect of PA on the cell cycle progression, on DNA intercalation and on human DNA topoisomerases (hTopo I and II α) *in vitro* studies. Theoretical experiments of the inhibition of hTopo I and II α were done to explore the binding modes of PA. **Results:** PA reduced cell viability, induced cell death and increased sub-G0/G1 accumulation in all cell lines, altered the cell cycle distribution and inhibited the catalytic activity of both human DNA topoisomerases. **Conclusion:** Finally, this study showed that PA has powerful antitumor activity against AML cells suggesting that this natural compound might be apotent antineoplastic agent to improve the treatment scheme of this neoplasm.

Keywords: Acute myeloid leukemia, natural compound, pomolic acid, human DNA topoisomerases, Topo I, Topo II α , anticancer agent, drug discovery.

De: eesserver@eesmail.elsevier.com [mailto:eesserver@eesmail.elsevier.com]

Enviada em: segunda-feira, 2 de outubro de 2017 11:45

Para: camilla-buarque@puc-rio.br; salustiano@biomed.ufrj.br

Assunto: A manuscript number has been assigned: EJMECH-D-17-02211

Ms. Ref. No.: EJMECH-D-17-02211

Title: 11a-N-arylsulfonyl-5-carbapterocarpan: Synthesis, antitumor evaluation on human cancer cell lines (leukemia and breast cancer), molecular modeling studies and DNA topoisomerase assays European Journal of Medicinal Chemistry

Dear Professor Buarque,

Your submission, referenced above, has been assigned the manuscript number EJMECH-D-17-02211 and has been assigned to an Editor who will handle peer review.

Please note that in most cases at least two reviews may be required before a decision on a manuscript is made. You will be notified by e-mail each time a reviewer agrees to review your manuscript.

To track the progress of your manuscript, please log in to <https://eeslive.elsevier.com/ejmech/> and click on the "Submissions Being Processed" folder.

Your username is: camilla-buarque@puc-rio.br

Thank you for submitting your manuscript to European Journal of Medicinal Chemistry.

Kind regards,

European Journal of Medicinal Chemistry

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

11a-N-arylsulfonyl-5-carbapterocarpan: Synthesis, antitumor evaluation on human cancer cell lines (leukemia and breast cancer) and molecular modeling studies

Joseane A. Mendes^{a,1}, Eduardo J. Salustiano^{b,c,1}, Michelle X. G. Pereira^{d,e}, Carulini de S. Pires^f, Thaís Oliveira^{b,g}, Julio C.F. Barcellos^h, Maurício C. Cerón^a, Raquel C. Maia^{d,*}, Paulo R.R. Costa^h, Magdalena N. Rennó^{f,*} and Camilla D. Buarque^{a,*}

*Corresponding authors. E-mail address: camilla-buarque@puc-rio.br; mnrenno@macae.ufrj.br

¹ These authors contributed equally to this work

^a*Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rua Marquês de São Vicente, 225, Gávea - Rio de Janeiro, RJ 22435-900, Brazil.* ^b*Laboratório de Imunologia Tumoral, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Centro de Ciências da Saúde, Bloco H sala 003, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil.* ^c*Laboratório de Glicobiologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Bloco C sala C1-042, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil.* ^d*Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.* ^e*Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Oncologia, INCA, RJ, Brazil.* ^f*Laboratório de Modelagem Molecular e Pesquisa em Ciências Farmacêuticas, Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Sócio-Ambiental de Macaé, Universidade Federal do Rio de Janeiro Campus Macaé Professor Aloísio Teixeira, Macaé, RJ 27965-045, Brazil.* ^g*Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Câncer, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Centro de Ciências da Saúde, Bloco C sala E1-022, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil.* ^h*Laboratório de Química Bioorgânica, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais. Centro de Ciências da Saúde, Bloco H, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil*

Abstract

11a-*N*-Arylsulfonyl-5-carbapterocarpan (**5a-c** and **6a-c**), 9-Arylsulfonyl-4,4a,9,9a-tetrahydro-3H-carbazole (**7**), 11a-*N*-Arylsulfonyl-5-carbapterocarpen (**8**) analogues of LQB-223 (**4**), were synthesized through palladium catalyzed azaarylation of substituted dihydronaphthalenes (**14a-c**) and cyclohexadiene (**15**), respectively, with *N*-tosyl-*o*-iodoaniline (**11**). In order to investigate the role of the arylsulfonamide moiety for the pharmacological activity, the azacarbapterocarpen (**9**) was also synthesized by Fischer indol reaction. The structural requirements at the A-ring for the antineoplastic activity toward human leukemias and breast cancer cells were evaluated as well. Substitutions on the A-ring of LQB-223 and analogues seems to direct the effect for different breast cancer subtypes. On the other hand, it is not essential for antileukemic activity since compound **7**, which does not contain the A-ring, showed efficacy with high selectivity indexes for drug-resistant leukemias. Molecular docking studies showed that compounds **4**, **5b**, and **7** interact with Topoisomerases I and II with similar binding energies to known inhibitors, highlighting the importance of the arylsulfonamide for this activity. Finally, the DNA relaxation and cleavage assays suggest that the prototypical arylsulfonamide-carbapterocarpan LQB-223 (**4**) could act as a catalytic inhibitor of TopoII α .

Keywords: Cancer; multidrug resistant phenotype (MDR); arylsulfonamide-carbapterocarpan; molecular docking; DNA Topoisomerases.

Highlights

- Palladium-catalyzed azaarylation reaction is the key step for the synthesis of *N*-arylsulfonylcarbapterocarpan.
- Compounds **4**, **5b** and **7** are the most promising prototypes for targeting leukemias.
- Compound **5b** is the most promising prototype for targeting breast cancer cells.
- The arylsulfonamide group (tosyl) is important for the biological activity and for the interaction with DNA Topoisomerases.
- The DNA topoisomerases were validated as a molecular target for compound **4**

10.2 Artigos em preparo para submissão

Pterocarpanquinone LQB-118 and pterocarpanLQB-223: catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II α with antitumor activities against acute leukemia cell lines despite the chemoresistance phenotype.

Michelle X. G. Pereira^{1,2}, Amanda S. O Hammes³, Flávia C. Vasconcelos¹, Ernesto R. Caffarena³, Camilla D. Buarque⁴, Paulo R.R. Costa⁵, Raquel C. Maia^{1*}

¹Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ²Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Oncologia, INCA, RJ, Brazil. ³Grupo de Biofísica Computacional e Modelagem Molecular, Programa de Computação Científica, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. ⁴Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rua Marquês de São Vicente, 225, Gávea-Rio de Janeiro, RJ-Brasil-22435-900. ⁵Laboratório de Química Bioorgânica, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais. Centro de Ciências da Saúde, Bloco H, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil.

*Corresponding author:

E-mail address: rcmaia@inca.gov.br

Telephone number: + 55 21 3207 1198

Adress: Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer, Praça Cruz Vermelha 23, 6º andar, Centro, Rio de Janeiro, Brazil. CEP. 20230-130

Abstract

Searching for novel compounds capable of increasing the overall survival rate to the treatment of acute leukemias we analyzed the effect of a series of pterocarpan and pterocarpanquinones (LQBs) compounds in acute leukemias cells. To investigate their cytotoxicity it was used four different cell lines, U937 (derived from acute myeloid leukemia), CCRF-CEM (derived from acute lymphoid leukemia) and two chemoresistant cell lines that we developed to acquire resistance to etoposide (VP-16) derived from the first two cell lines. The characterization of the resistant cell lines showed that they expressed more levels of Pgp protein, altered levels of DNA topoisomerases (hTopo I and II α) and upregulated the miR-143 and downregulated miR-485 compared to parental cell lines. Among 6 LQBs evaluated the

LQB-118 and LQB-223 were the effective compounds. They reduced cell viability, induced cell death and increased sub-G0/G1 accumulation in all cell lines. To explore the mechanism of action of LQBs it was analyzed its effect on the interference of cell cycle profile, on DNA intercalation and on hTopo I and II α *in vitro* and theoretical inhibition. These experiments showed that they both alter the cell cycle distribution and inhibit hTopo II α , acting as catalytic inhibitors (with high affinity to bind to ATPase region of hTopo II α), without intercalating into DNA. Further, LQB-118 treatment induced a decrease in total and phosphorylated Akt and it was not a consequence of apoptosis. Finally, our results suggest that LQB-118 and LQB-223 are potential antitumor compounds for the treatment of acute leukemias including the MDR phenotype.

Keywords: Acute myeloid leukemia, acute lymphoid leukemia, multiple drug resistance phenotype, anticancer agents, DNA topoisomerases, Topo I, Topo II α , LQB-118, LQB-223, microRNAs.