

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Karina Elisa Machado

**ESTUDO DO EFEITO DOS DERIVADOS DE IMIDAS  
CÍCLICAS SOBRE OS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA  
TUMORAL E APOPTOSE EM CÉLULAS DE LINHAGENS  
TUMORAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Doutor em Farmácia na Área de Concentração de Análises Clínicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Cláudia Santos da Silva

Florianópolis, 2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Machado, Karina Elisa

Estudo do Efeito dos Derivados de Imidas Cíclicas sobre os Mecanismos de Resistência Tumoral e Apoptose em Células de Linhagens Tumerais / Karina Elisa Machado ; orientadora, Maria Cláudia Santos da Silva - Florianópolis, SC, 2013.

177 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Citotoxicidade. 3. Apoptose. 4. Resistência a Múltiplos Fármacos (MDR). 5. Derivados de Imidas Cíclicas. I. Santos da Silva, Maria Cláudia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

**“ESTUDO DO EFEITO DOS DERIVADOS DE IMIDAS  
CÍCLICAS SOBRE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA  
TUMORAL E APOPTOSE EM CÉLULAS DE LINHAGENS  
TUORAIS”**

**POR**

**Karina Elisa Machado**

Tese foi julgada e aprovada em sua  
forma final pela Orientadora e  
membros da Banca Examinadora,  
composta pelos Professores doutores:

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dra. Ariane Zamoner Pacheco de Souza (UFSC- Membro Titular)

---

Prof. Dra. Andreza Fabro de Bem (UFSC- Membro Titular)

---

Prof. Dra. Iara Fabrízia Kretzer (UFSC- Membro Titular)

---

Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho (UNIVALI- Membro Titular)

---

Dra. Daniela Ferraz Pereira Leite (Fundação CERTI- Membro Titular)

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Claudia Santos Silva (Orientadora)

Prof. Dra Tânia Beatriz Creczynski Pasa  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia UFSC

Florianópolis, **19 de julho de 2013.**



Aos meus pais, Sônia e Machado, por sempre serem as  
colunas fundamentais da minha estrutura e fonte  
inesgotável de estímulo e carinho durante  
todas as etapas, desta busca pelo  
conhecimento.



## AGRADECIMENTOS

Termino este trabalho com a certeza de que a ciência torna-se a cada dia mais importante para a nossa sobrevivência. Fico feliz em poder participar desse processo, pois fazer ciência é uma batalha que vale a pena lutar.

Gostaria de agradecer aos meus pais, Sônia e Machado, por todo apoio, confiança, amor, carinho e atenção dedicados a mim durante toda a minha vida. Não há palavras suficientes para que eu possa demonstrar todo o meu amor, gratidão e admiração que sinto por vocês.

Ao meu irmão e familiares, que perto ou longe, sempre torceram por mim, saibam que sou muito grata por tê-los em minha vida.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Cláudia Santos da Silva, pelos importantes ensinamentos, por ser uma pessoa tão dedicada, por todo o carinho e profissionalismo.

À Kely Navakoskide Oliveira, ao Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes e ao Prof. Dr. Ricardo José Nunes, do Laboratório Estrutura e Atividade do Departamento de Química da UFSC, por fornecerem os compostos utilizados no presente trabalho.

Aos demais professores, que cruzaram meu caminho durante esta etapa da minha vida me transmitindo seus conhecimentos, e ajudando direta ou indiretamente, na conclusão deste trabalho, em especial a Lígia, pela ajuda com as correções ortográficas.

À todos os colegas do Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias e do Laboratório de Biologia Molecular e Microbactérias, pela convivência, pelos momentos de angústia e descontração, pela troca de experiências diárias, enfim por toda convivência durante estes anos, especialmente a Ana, Lorena, Daiane, Pamela, Manu, Mariana, Renata, Arthur, Alisson, Marley, Aline e Haíra, com certeza todos vocês contribuíram direta ou indiretamente para concretização deste trabalho.

Às minhas amigas e irmãs, Camila e Marilene pelo apoio, pelo companheirismo e pela sólida amizade que construímos, a qual, tenho certeza, será eterna.

Aos meus amigos da FAB, em especial, ao Maj Keller, à Ten Campos e ao Ten Valença, a ajuda de vocês com as constantes trocas de horários e “quebradinhas” de galho, foram fundamentais nesta etapa da minha vida.

Ao Grande Arquiteto do Universo por iluminar minha mente, me dar forças para sempre seguir em frente, proporcionar-me diferentes

caminhos, dando-me sempre oportunidades de escolha e guiando-me através delas.

Enfim, a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a execução deste trabalho, seja pela ajuda constante, por uma palavra de amizade ou por um abraço no momento certo. Este trabalho só foi possível porque eu tive o apoio de cada um de vocês.

Por isso, desejo a todos que a sabedoria os inspire, que a força os mantenham firmes, unidos, e que a beleza adorne os seus pensamentos, suas palavras, seus gestos e atitudes.

Muito obrigada a todos vocês!



“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis,  
as pedras do caminho se tornam montanhas,  
os fracassos se transformam em golpes fatais.  
Mas, se você tiver grandes sonhos...  
seus erros produzirão crescimento,  
seus desafios produzirão oportunidades,  
seus medos produzirão coragem.”

Augusto Cury



## RESUMO

O câncer foi considerado uma das principais causas de morte no mundo, no ano de 2013, sendo responsável por 7,6 milhões de mortes (cerca de 13% de todas as causas de mortes). Para 2030 estima-se 27 milhões de novos casos. Embora a quimioterapia ainda seja a principal terapia utilizada para o tratamento da doença, a morbidade associada aos quimioterápicos ainda é um obstáculo a ser superado. Dessa forma, a busca por compostos antineoplásicos, que tenham maior eficiência em induzir apoptose nas células tumorais e com insignificantes efeitos colaterais, tornou-se alvo de investigação acadêmica e da indústria farmacêutica. Os compostos derivados de imidas cíclicas vêm sendo descritos como promissores agentes antitumorais. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito dos derivados de imidas cíclicas sobre os mecanismos de resistência tumoral e apoptose sobre células de linhagem de melanoma murino (B16F10), de leucemia mieloide aguda humana (K562) e de leucemia linfóide aguda humana (Jurkat). Inicialmente, foi investigado o efeito citotóxico de nove derivados de imidas cíclicas sobre células de linhagem de melanoma murino (B16F10), e determinado suas  $CI_{50}$ . O composto **2** foi o que apresentou melhor atividade citotóxica, com um valor de  $CI_{50}$  de 77,75  $\mu$ M ( $\pm 1,3$ ), por isso, foi selecionado para os demais experimentos. Os resultados mostram que esse composto apresenta atividade citotóxica concentração e tempo dependente, bloqueio das fases S e G<sub>2</sub>/M do ciclo celular, além do aumento de células na fase sub-G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>, que sugere morte celular por apoptose. Como esses resultados foram considerados satisfatórios, o composto **2** e sete novos derivados de imidas cíclicas foram selecionados para uma nova triagem em células K562. Nessa nova etapa, o composto **15** demonstrou o melhor efeito citotóxico, por isso foi selecionado para modificações estruturais, que geraram cinco novos derivados (**16**, **17**, **18**, **19** e **20**). O efeito citotóxico dos compostos (**15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**) foi avaliado em células de leucemia aguda humana (K562 e Jurkat), e demonstram atividade citotóxica concentração e tempo dependente. Foi avaliado o efeito dos compostos (**15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**) no ciclo celular, e estes demonstraram um bloqueio do ciclo celular na fase S para células Jurkat e na fase sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, para células K562 e Jurkat. A via de morte também foi avaliada por três diferentes metodologias, e os compostos demonstraram causar morte celular, via apoptose. Com esse conjunto de resultados os compostos **15**, **17** e **19** foram selecionados para avaliar o seu efeito sobre o potencial

mitocondrial, na expressão das proteínas AIF, Bcl-2, Bax, Fas, caspase-3 ativa, survivina, p53 e Ki67. Os resultados demonstraram que os compostos (**15**, **17** e **19**) causaram redução do potencial mitocondrial, aumento da expressão do AIF, diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax, sugerindo que o mecanismo de indução de apoptose desses compostos envolve a via intrínseca da apoptose. Ainda, nas células Jurkat, os compostos **15** e **17** também ativaram a apoptose pela via extrínseca, evidenciado pelo aumento da expressão do receptor Fas. Além disso, os compostos (**15**, **17** e **19**) causaram aumento da atividade da proteína caspase-3 ativa, diminuição da expressão da proteína antiapoptótica survivina, aumento da expressão da proteína p53 e diminuição na expressão do marcador de proliferação celular Ki67. Também foi avaliado o efeito dos compostos (**15**, **17** e **19**) sobre a expressão do gene *abcc1*, do fenótipo ABCC1 e do fenótipo LRP nas células K562 e Jurkat, e os resultados mostram que os compostos causaram diminuição da expressão constitutiva do gene *abcc1* e da proteína LRP nas células K562 e Jurkat. Em conjunto, os resultados aqui expostos, sugerem que os compostos **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** causaram bloqueio do ciclo das células K562 e Jurkat, e, conseqüentemente, diminuição da proliferação celular, o que resulta na indução da apoptose via mecanismo intrínseco e/ou extrínseco, além de inibir os mecanismos de resistência à quimioterapia nessas células através da redução da transcrição do gene *abcc1* e pela diminuição da expressão de LRP, Bcl-2 e survivina.

**Palavras-chave:** Derivados de imidas cíclicas, apoptose e resistência a múltiplos fármacos (MDR).

## ABSTRACT

In 2008, cancer was considered a major cause of death in the world, accounting for 7.6 million deaths (around 13% of all causes of death). For 2030, 27 million new cases of cancer are estimated. Although chemotherapy is still the main therapy used for the treatment of this disease, the morbidity associated with chemotherapeutic drugs is still an obstacle to be overcome. Thus, the search for new anticancer compounds, with higher efficiency in inducing apoptosis in tumor cells with negligible side effects, has become an important target of the pharmaceutical industry. The compounds derived from cyclic imides have been described as promising with antitumor agents. The aim of this study was to investigate the effects of derivatives of cyclic imides on the mechanisms of tumor resistance and apoptosis in murine melanoma cells (B16F10), human acute myeloid leukemia cells (K562) and human acute lymphoblastic leukemia cells (Jurkat). First we have investigated the cytotoxic effect of nine derivatives of cyclic imides in murine melanoma cells (B16F10), and their  $IC_{50}$  have been calculated. Compound **2** has shown the best cytotoxic activity with an  $IC_{50}$  value of 77.75  $\mu$ M ( $\pm 1.3$ ), therefore, it was selected for further studies. The results have shown that this compound reduced the cell viability in a concentration and time-dependent manner, caused cell cycle arrest in S and G<sub>2</sub>/M phases and increased the number of cells in the sub-G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> phase, suggesting cell death by apoptosis. For these promising results, compound **2** and seven new derivatives of cyclic imides have been selected for a new screening in K562 cells. In this new stage, compound **15** has shown the best cytotoxic effect, so it was selected for structural modifications, which has generated five new compounds (**16**, **17**, **18**, **19** and **20**). The cytotoxic effects of these compounds (**15**, **16**, **17**, **18**, **19** and **20**) have been evaluated in K562 and Jurkat cells, and they have demonstrated a cytotoxic concentration-and-time-dependent activity. The effects of these compounds (**15**, **16**, **17**, **18**, **19** and **20**) on cell cycle have demonstrated a blockage in S phase for Jurkat cells and in sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase in K562 and Jurkat cells. Apoptosis has been evaluated and confirmed by three different methodologies. Based on these results, compounds **15**, **17** and **19** have been selected to evaluate their effects on the mitochondrial potential and on the expression of AIF, Bcl-2, Bax, Fas, caspase-3 active, survivin, Ki67 and p53 proteins. These compounds (**15**, **17**, **19**) have reduced the mitochondrial potential and have caused increased expression of AIF, decreased expression of

antiapoptotic protein Bcl-2 and increased expression of pro-apoptotic protein Bax, which suggests that the apoptosis caused by the compounds involves the intrinsic pathway. In Jurkat cells, apoptosis caused by compounds **15** and **17** also involves the extrinsic pathway, as it has been evidenced by the increased expression of Fas receptor. Furthermore, the compounds (**15**, **17**, **19**) have increased the activity of caspase-3 active and the expression of p53 protein, and they have decreased the expression of antiapoptotic survivin and the cell proliferation marker Ki67 proteins. The effect of these compounds (**15**, **17**, **19**) have also been evaluated on *abcc1* gene expression, on ABCC1 phenotype and on LRP phenotype in Jurkat and K562 cells. The results have shown that the compounds reduced the constitutive expression of *abcc1* gene and the expression of LRP protein in Jurkat and K562 cells. Together, these results suggest that compounds **15**, **16**, **17**, **18**, **19** and **20** cause cell cycle blockage in Jurkat and K562 cells and, therefore, decrease cell proliferation, which result in the induction of apoptosis by intrinsic and/or extrinsic pathways and in the inhibition of the resistance mechanisms to chemotherapy in these cells by reducing the transcription of *abcc1* gene and by decreasing the expression of LRP, survivin and Bcl-2 proteins.

**Keywords:** Cyclic imides derivatives, apoptosis and multidrug resistance (MDR).

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> Estrutura geral das imidas cíclicas. ....	43
<b>Esquema 2:</b> Alterações morfológicas na necrose e na apoptose. ....	46
<b>Esquema 3:</b> Ativação da via extrínseca da apoptose, inteiração ligante-receptor.....	49
<b>Esquema 4:</b> Ativação da via intrínseca da apoptose, alteração na permeabilidade mitocondrial e liberação de proteínas apoptóticas pela mitocôndria. ....	50
<b>Esquema 5:</b> As vias de ativação da apoptose. ....	51
<b>Esquema 6:</b> Formação do apoptosoma.....	53
<b>Esquema 7:</b> Fases do ciclo celular. ....	57
<b>Esquema 8:</b> Resistência a múltiplos fármacos em células tumorais. ...	60
<b>Esquema 9:</b> Estrutura molecular dos derivados de imidas cíclicas testados na primeira etapa do estudo.....	66
<b>Esquema 10:</b> Estrutura molecular dos derivados de imidas cíclicas testados na segunda etapa do estudo. ....	67
<b>Esquema 11:</b> Esquema ilustrativo do mecanismo geral de ação das imidas cíclicas, em células K562 e Jurkat. ....	144





## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Sequência dos primers para a detecção de <i>abcc1</i> . .....	79
<b>Quadro 2:</b> Condições de reação para a detecção de <i>abcc1</i> . .....	80



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Efeito citotóxico de derivados de imidas cíclicas **1-9** em células de melanoma murino (B16F10). ..... 81
- Figura 2:** Efeito citotóxico do composto **2** em células de melanoma murino (B16F10). ..... 83
- Figura 3:** Análise do efeito do composto **2**, no ciclo celular de células de melanoma murino (B16-F10). ..... 85
- Figura 4:** Análise da apoptose, causada pelo composto **2**, em células de melanoma (B16-F10), através da microscopia de fluorescência. .... 87
- Figura 5:** Análise da apoptose causada pela imida cíclica **2**, em células de melanoma murino (B16-F10), por citometria de fluxo..... 88
- Figura 6:** Efeito citotóxico dos compostos derivados de imidas cíclicas **2, 10, 11, 12, 13, 14** e **15** sobre células de leucemia mieloide aguda (K562). ..... 91
- Figura 7:** Efeitos citotóxico dos compostos derivados de imidas cíclicas **15, 16, 17, 18, 19** e **20** sobre células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfóide aguda (Jurkat). ..... 93
- Figura 8:** Efeito citotóxico dos compostos derivados de imidas cíclicas **15, 16, 17, 18, 19** e **20** sobre células de leucemia mieloide aguda (K562). ..... 94
- Figura 9:** Efeito citotóxico dos compostos derivados de imidas cíclicas **15, 16, 17, 18, 19** e **20**, sobre células de leucemia linfóide aguda (Jurkat). ..... 97
- Figura 10:** Efeito citotóxico dos compostos derivados imidas cíclicas **15, 16, 17, 18, 19** e **20**, sobre células mononucleares de indivíduos saudáveis. .... 100

<b>Figura 11:</b> Efeitos dos compostos derivados de imidas cíclicas <b>15, 16, 17, 18, 19 e 20</b> sobre o ciclo celular das células de leucemia mieloide aguda (K562). .....	102
<b>Figura 12:</b> Efeitos dos compostos derivados de imidas cíclicas <b>15, 16, 17, 18, 19 e 20</b> no ciclo celular das células de leucemia linfóide aguda (Jurkat). .....	104
<b>Figura 13:</b> Análise da apoptose induzida pelos compostos derivados de imidas cíclicas <b>15, 16, 17, 18, 19 e 20</b> em células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfóide aguda (Jurkat), através do ensaio de brometo de etídio e laranja de acridina. ....	106
<b>Figura 14:</b> Análise da apoptose induzida pelos compostos derivados de imidas cíclicas <b>15, 16, 17, 18, 19 e 20</b> sobre células de leucemia mieloide aguda (K562) e células de leucemia linfóide aguda (Jurkat), através do ensaio de fragmentação e DNA. ....	108
<b>Figura 15:</b> Efeito dos derivados de imidas cíclicas <b>15, 16, 17, 18, 19 e 20</b> sobre a exposição dos resíduos de fosfatidilserina em células de leucemia mieloide aguda (K562). .....	109
<b>Figura 16:</b> Efeito dos derivados de imidas cíclicas <b>15, 16, 17, 18, 19 e 20</b> sobre a exposição dos resíduos de fosfatidilserina em células de leucemia linfóide aguda (Jurkat). .....	110
<b>Figura 17:</b> Efeito dos derivados de imidas cíclicas <b>15, 17 e 19</b> sobre o potencial mitocondrial das células de leucemia mieloide aguda (K562) .....	113
<b>Figura 18:</b> Efeito dos compostos derivados de imidas cíclicas <b>15, 17 e 19</b> sobre o potencial mitocondrial das células de leucemia linfóide aguda (Jurkat). .....	114
<b>Figura 19:</b> Efeito dos compostos derivados de imidas cíclicas <b>15, 17 e 19</b> sobre a expressão da proteína AIF nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e de leucemia linfóide aguda (Jurkat). .....	116

- Figura 20:** Efeito dos compostos derivados imidas cíclicas **15**, **17** e **19** sobre a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfoide aguda (Jurkat). 119
- Figura 21:** Efeito dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **17** e **19** sobre a expressão da proteína proapoptótica Bax nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfoide aguda (Jurkat). 121
- Figura 22:** Efeito dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **17** e **19** na expressão do receptor Fas nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfoide aguda (Jurkat). ..... 123
- Figura 23:** Efeito dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **17** e **19** sobre a expressão da proteína caspase-3 ativa nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfoide aguda (Jurkat). ..... 125
- Figura 24:** Efeito dos derivados de imidas **15**, **17** e **19** sobre a expressão da proteína antiapoptótica survivina nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfoide aguda (Jurkat). ..... 127
- Figura 25:**Efeito dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **17** e **19** sobre a expressão da proteína p53 nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfoide aguda (Jurkat). ..... 130
- Figura 26:** Efeito dos derivados de imidas **15**, **17** e **19** sobre a expressão da proteína Ki67 nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfoide aguda (Jurkat). ..... 132
- Figura 27:** Efeito dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **17** e **19** na transcrição do gene *abcc1* nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfoide aguda (Jurkat). ..... 137
- Figura 28:** Efeito dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **17** e **19** na expressão da proteína ABCC1 nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfoide aguda (Jurkat). ..... 138
- Figura 29:** Efeito dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **17** e **19** na expressão da proteína LRP nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfoide aguda (Jurkat). ..... 140



## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1:</b> Valores da $CI_{50}$ para os derivados de imidas cíclicas (1 – 9), em células B16F10.....	82
--	----





## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABCB1</b>	<i>P-glycoprotein</i> , MDR1
<b>ABCC1</b>	<i>Multidrug Resistance Protein</i> , MRP1
<b>ABCG2</b>	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i> , BCRP
<b>AIF</b>	Fator Indutor de Apoptose ( <i>Apoptosis Inducing Factor</i> )
<b>Apaf-1</b>	Fator Ativador de Apoptose 1 ( <i>Apoptotic Protease Activating Factor 1</i> )
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato ( <i>Adenosine-5'-triphosphate</i> )
<b>ATP-binding cassette</b>	ABC-transportadoras
<b>Bcl-2</b>	<i>B-cell Lymphoma Protein-2</i>
<b>BH</b>	<i>Bcl-2 Homology</i>
<b>CAD</b>	<i>Caspase-Activated Deoxinuclease</i>
<b>Caspases</b>	<i>Cysteine-Dependent Aspartate-Specific Proteases</i>
<b>CDKs</b>	Cinases Dependentes de Ciclinas ( <i>Cyclin-Dependent Kinases</i> )
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração Inibitória 50%
<b>CIVD</b>	Coagulação Intravascular Disseminada
<b>CKI</b>	Inibidores de CDK ( <i>CDK Inhibitors</i> )
<b>DAB</b>	3,3'-diaminobenzidina-DAB
<b>DD</b>	<i>Death Domain</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DR3</b>	Receptor de Morte 3 ( <i>Death Receptor 3</i> )
<b>DR6</b>	Receptor de Morte 6 ( <i>Death Receptor 6</i> )
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
<b>EPM</b>	Erro Padrão da Média
<b>FADD</b>	Proteína Adaptadora ( <i>Fas-Associated Death Domain</i> )
<b>FasL</b>	Ligante Fas ( <i>Fas Ligand</i> )
<b>FasR</b>	Receptor Fas (Fas Receptor)
<b>FITC</b>	Isotiocianato de Fluoresceína
<b>G<sub>0</sub></b>	<i>Gap 0</i>
<b>G<sub>1</sub></b>	<i>Gap 1</i>
<b>G<sub>2</sub></b>	<i>Gap 2</i>
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<b>GSH</b>	Glutationa Reduzida

<b>GSSG</b>	Glutationa Oxidada
<b>Hepes</b>	Ácido N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]
<b>IAP</b>	Proteínas Inibidoras da Apoptose ( <i>Inhibitors of Apoptosis Proteins</i> )
<b>IFM</b>	Índice de Fluorescência Média
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>LA</b>	Leucemia Aguda
<b>LLA-B</b>	Leucemia Linfoblástica de Células B
<b>LLA-T</b>	Leucemia Linfoblástica de Células T
<b>LLA</b>	Leucemia Linfoide Aguda
<b>LMA</b>	Leucemia Mieloide Aguda
<b>LRP</b>	Proteína Associada à Resistência Pulmonar
<b>M</b>	Mitose
<b>MDR</b>	Proteínas de resistência a múltiplos fármacos ( <i>Multiple Drug Resistance</i> )
<b>MO</b>	Medula Óssea
<b>mRNA</b>	RNA Mensageiro
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
<b>MVP</b>	<i>Human Major Vault Proteins</i>
<b>Omi/HtrA2</b>	<i>Non-methionine Initiating Protein; HtrA2: High Temperature Requirement Protein A2</i>
<b>Omi</b>	<i>High Temperature Requirement Protein A2</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato
<b>PI</b>	Iodeto de Propídio (Propidium iodide)
<b>PMM</b>	<i>Permeabilidade da Membrana Mitocondrial</i>
<b>PTPC</b>	<i>Permeability Transition Pore Complex</i>
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>RNase</b>	Ribonuclease
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>Smac/DIABLO</b>	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP</i>
<b>S</b>	Síntese
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
<b>TRAIL-R1</b>	<i>TNF-related apoptosis-inducing Ligand Receptor 1</i>
<b>TRAIL-R2</b>	<i>TNF-related apoptosis-inducing Ligand Receptor 2</i>
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>γ-GT</b>	Gama-glutamiltanspeptidase

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....</b>	<b>31</b>
1.1 OBJETIVO GERAL.....	32
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>35</b>
2.1 CÂNCER.....	35
2.2 MELANOMAS.....	35
2.3 LEUCEMIAS.....	38
2.4 IMIDAS CÍCLICAS.....	42
2.5 VIAS DE MORTE CELULAR.....	45
2.5.1 Apoptose.....	48
2.6 CICLO CELULAR.....	55
2.7 RESISTÊNCIA MÚLTIPLOS FÁRMACOS.....	59
<b>CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>64</b>
3.1 REAGENTES.....	65
3.2 CULTURA CELULAR.....	67
3.3 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	68
3.3.1 Preparo das células de cultura celular: B16F10, K562 e Jurkat.....	68
3.3.2 Preparo das células mononucleadas de indivíduos saudáveis.....	68
3.4 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM OS DERIVADOS DE IMIDAS CÍCLICAS.....	69
3.5 VIABILIDADE CELULAR (MÉTODO DE MTT).....	69
3.5.1 O efeito citotóxico dos derivados de imidas cíclicas sobre as células de melanoma murino (B16F10).....	70
3.5.2 O efeito citotóxico dos derivados de imidas cíclicas sobre as células de leucemias agudas humanas (K562 e Jurkat).....	70
3.5.3 O efeito citotóxico dos derivados de imidas cíclicas em células mononucleadas de indivíduos saudáveis.....	71
3.6 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR.....	71
3.7 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE.....	72
3.7.1 Avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência com brometo de etídio e laranja de acridina.....	72

3.7.2 Avaliação da apoptose pelo método anexina V-FITC .....	73
3.7.3 Análise da Fragmentação do DNA .....	74
3.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL.....	75
3.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS AIF, Bcl-2, Bax, FasR, Caspase-3 ATIVA, p53, ABCC1 E LRP POR CITOMETRIA DE FLUXO. ....	75
3.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS SURVIVINA E KI67 POR IMUNOCITOQUÍMICA.....	76
3.11 ENSAIO SEMI-QUANTITATIVO DA TRANSCRIPTASE REVERSA-REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR).....	77
3.11.1 Extração de RNA .....	78
3.11.2 Síntese de DNA complementar.....	78
3.11.3 Detecção da transcrição gênica de abcc1 por transcrição reversa.....	79
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	80

**CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO – MECANISMOS DE APOPTOSE EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO (B16F10).....81**

4.1 EFEITO CITOTÓXICO DOS DERIVADOS DE IMIDAS CÍCLICAS SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10.....	81
4.2 EFEITO CITOTÓXICO DO COMPOSTO 2 SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10.....	83
4.3 EFEITO DA IMIDA CÍCLICA 2 SOBRE AS FASES DO CICLO CELULAR NAS CÉLULAS DE MELANOMA B16F10.....	84
4.4 EFEITO DA IMIDA CÍCLICA 2 NA INDUÇÃO DA APOPTOSE NAS CÉLULAS DE MELANOMA B16F10.....	86

**CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO – MECANISMOS DE APOPTOSE EM CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (K562) E EM CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (JURKAT).....90**

5.1 EFEITO CITOTÓXICO DOS DERIVADOS DE IMIDAS CÍCLICAS SOBRE CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E EM CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....	91
--	----

5.2 EFEITO CITOTÓXICO DOS COMPOSTOS 15, 16, 17, 18, 19 e 20 SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS.....	99
5.3 EFEITO DOS COMPOSTOS 15, 16, 17, 18, 19 e 20 SOBRE AS FASES DO CICLO CELULAR NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E EM CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....	101
5.4 EFEITO DOS COMPOSTOS 15, 16, 17, 18, 19 e 20 NA INDUÇÃO DA APOPTOSE NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E EM CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....	105
5.5 EFEITO DOS COMPOSTOS 15, 17 e 19 SOBRE O POTENCIAL MITOCONDRIAL DAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E DAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....	111
5.6 EFEITO DOS COMPOSTOS 15, 17 e 19 SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA AIF NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....	115
5.7 EFEITO DOS COMPOSTOS 15, 17 e 19 SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA BCL-2 E PRÓ-APOPTÓTICA BAX NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....	117
5.8 EFEITO DOS COMPOSTOS 15, 17 e 19 SOBRE A EXPRESSÃO DO RECEPTOR FAS NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....	122
5.9 EFEITO DOS COMPOSTOS 15, 17 e 19 SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CASPASE NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....	124
5.10 EFEITO DOS COMPOSTOS 15, 17 e 19 SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SURVIVINA NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....	126
5.11 EFEITO DOS COMPOSTOS 15, 17 e 19 SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P53 NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....	129

5.12 EFEITO DOS COMPOSTOS **15**, **17** e **19** SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA KI67 NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....131

**CAPÍTULO 6: RESULTADOS E DISCUSSÃO – MECANISMOS DE RESISTÊNCIA TUMORAL EM CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (K562) E EM CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (JURKAT).....135**

6.1 EFEITO DOS COMPOSTOS **15**, **17** e **19** SOBRE A TRANSCRIÇÃO DO GENE E A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLOS FÁRMACOS *abcc1*/ABCC1 EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA HUMANA K562 E DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA HUMANA JURKAT.....135

6.2 EFEITO DOS COMPOSTOS **15**, **17** e **19** SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLOS FÁRMACOS LRP EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA HUMANA (K562) E DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA HUMANA (JURKAT).....139

**CAPÍTULO 7: CONCLUSÕES.....143**  
**PERSPECTIVAS.....145**  
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....147**

## CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

A presença de câncer na humanidade já é conhecida há milênios. Os primeiros relatos sobre tumores de mama datam 3000 a.C. No entanto, somente em 460-375 a.C. o termo carcinoma foi utilizado, por Hipócrates, para descrever formação de tumores ulcerativos. Já os registros que designam a causa das mortes como câncer, só passaram a existir na Europa a partir do século XVIII (INCA, 2012), desde então, observou-se o aumento constante nas taxas de mortalidade por câncer, que parecem acentuar-se após o século XIX, com a chegada da industrialização (WHO, 1998).

Nas últimas décadas, o câncer ganhou maior dimensão, tornando-se um evidente problema de saúde pública em âmbito mundial. Em 2008 foi considerado uma das principais causas de morte no mundo, sendo responsável por 7,6 milhões de mortes (cerca de 13% de todas as mortes) (FERLAY et al., 2010; WHO, 2012). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima, para o ano de 2030, 27 milhões de novos casos, 17 milhões de mortes e, que, 75 milhões de pessoas estejam vivendo com a doença. No Brasil, o cenário não é diferente, desde 1960 as doenças parasitárias deixaram de ser a maior causa de morte, sendo substituídas pelas doenças do aparelho circulatório e neoplasias. Acredita-se que esta mudança tenha como principal fator o envelhecimento da população, resultante do intenso processo de urbanização e das ações de promoção e recuperação da saúde (INCA, 2011).

Seguindo esta tendência mundial, no Brasil foram registrados 518.510 novos casos de câncer, em 2012, dentre os quais o melanoma e as leucemias encontram-se entre os mais frequentes. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o ano de 2012 serão 6.230 novos casos de melanomas e 8.510 novos casos de leucemia, sendo estas estimativas de 2012 válidas também para o ano de 2013 (INCA, 2011). A elevada incidência das neoplasias malignas reforça a magnitude do problema e justifica novos investimentos em pesquisa na área de biologia tumoral, no que se refere ao diagnóstico e tratamento.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito de derivados de imidas cíclicas sobre os mecanismos de resistência tumoral e apoptose em células de linhagem de melanoma murino (B16F10), de leucemia mieloide aguda humana (K562) e de leucemia linfoide aguda humana (Jurkat).

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar o efeito citotóxico de nove derivados selecionados de imidas cíclicas sobre células de linhagem de melanoma murino (B16F10), e determinar suas  $CI_{50}$ .
2. Selecionar o derivado de imida cíclica com maior atividade citotóxica e determinar suas respostas em relação à concentração e ao tempo de incubação em células de linhagem de melanoma murino (B16F10).
3. Verificar se a imida cíclica selecionada causa morte celular por apoptose, nas células de melanoma murino (B16F10).
4. Analisar o efeito da imida cíclica selecionadasobre o ciclo celular das células de melanoma murino (B16F10).
5. Investigar o efeito citotóxico da imida cíclica selecionada e mais sete novos derivados de imidas cíclicas sobre células de linhagem de leucemia mieloide aguda humana (K562).
6. Selecionar os compostos com maior atividade citotóxica para determinar a resposta dos compostos em relação à concentração e ao tempo de incubação, e determinar suas  $CI_{50}$  em células de linhagem de leucemia mieloide aguda humana (K562) e de leucemia linfoide aguda humana (Jurkat).
7. Verificar se as imidas cíclicas selecionadas causam morte celular por apoptose, nas células de linhagem de leucemia mieloide aguda humana (K562) e de leucemia linfoide aguda humana (Jurkat).
8. Analisar o efeito das imidas cíclicas selecionadas no ciclo celular das células de linhagem de leucemia mieloide aguda humana (K562) e de leucemia linfoide aguda humana (Jurkat).



9. Investigar o efeito das imidas cíclicas selecionadas sobre o potencial mitocondrial das células de linhagem de leucemia mieloide aguda humana (K562) e de leucemia linfóide aguda humana (Jurkat).
10. Investigar se o efeito citotóxico das imidas cíclicas selecionadas sobre células de leucemia mieloide aguda humana (K562) e de leucemia linfóide aguda humana (Jurkat), envolve as proteínas reguladoras da apoptose: proteína AIF; proteína antiapoptótica Bcl-2, proteína pró-apoptótica Bax, proteína Fas, proteína Caspase-3 ativa, proteína antiapoptótica survivina, e proteína p53.
11. Investigar o efeito das imidas cíclicas selecionadas sobre o marcador de proliferação celular Ki67 sobre células de linhagem de leucemia mieloide aguda humana (K562) e de leucemia linfóide aguda humana (Jurkat).
12. Investigar o efeito das imidas cíclicas selecionadas sobre a expressão do gene e proteínas de resistência a múltiplos fármacos (*abcc1*/ABCC1 e LRP) em células de linhagem de leucemia mieloide aguda humana (K562) e de leucemia linfóide aguda humana (Jurkat).



## **CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 CÂNCER**

O termo “câncer” vem do grego Karkinos, “caranguejo”, o qual se refere ao potencial invasivo da doença para outros tecidos. Atualmente, câncer é uma designação utilizada para descrever um conjunto de mais de 100 doenças, que apresentam em comum, alterações genéticas, que culminam em uma desordem no processo de morte celular, o que resulta na proliferação celular anormal, com capacidade de invadir tecidos e órgãos e perda de suas funções originais (HANAHAN; WEINBERG, 2000; ROBBINS, 2000; FENECH, 2002).

Em alguns tipos de câncer, a origem celular, o local do organismo, o padrão de crescimento e a variabilidade individual podem influenciar nas características tumorais, como acontece com os melanomas; entretanto, em alguns tipos, como nas leucemias, o crescimento tumoral é difuso (KELVES, 1997; FRANKS; TEICH, 1998; HANAHAN; WEINBERG, 2000; SWERDLOW, 2008; ARORA; ATTWOOD, 2009).

### **2.2 MELANOMAS**

A origem do melanoma não se sabe ao certo, embora já constasse nas escrituras de Hipócrates (460 a 375 a.C.) uma descrição pertinente a ele. O que se tem conhecimento é que o termo “melanoma” só veio a ser reconhecido em 1838, quando Robert Carsweel o utilizou para descrever lesões malignas pigmentadas da pele (WELCH; GOLDBERG, 1997).

Hoje, o termo é utilizado para descrever um tumor maligno de origem neuroectodérmica, que resulta da transformação dos melanócitos epidérmicos, que migram da crista neural para toda epiderme durante a embriogênese. Os melanócitos não formam a pele, mas estão distribuídos dentro das junções das camadas epidérmicas e dérmicas (ALONSO et al., 2004; POSTOVIT et al., 2006; COSTACHE et al., 2007; AZULEY 2008; IBRAHUM; HALUSKA, 2009).

Normalmente os melanócitos estão quiescentes, mas podem apresentar discreta atividade mitótica, sob estímulos agressivos ou ambientais, como ocorre na cicatrização ou radiação ultravioleta, podendo também produzir pigmentos citoprotetores, como por exemplo, a melanina, pigmento responsável pela coloração da pele (SATAYAMOORTHY; HERLYN, 2002; POSTOVIT et al., 2006;

COSTACHE et al., 2007), que apresenta como função a absorção dos raios ultravioletas solares, protegendo as células dos possíveis danos causados pelo sol (IBRAHUM; HALUSKA, 2009).

O melanoma cutâneo se origina da transformação maligna dos melanócitos, devido a múltiplas e progressivas alterações no DNA celular. É considerada uma das neoplasias mais agressivas, devido aos mecanismos de invasão e disseminação, que são características intrínsecas dos melanócitos. O melanoma cutâneo apresenta grande potencial de metástase, mesmo em fases iniciais de sua manifestação, razão pela qual constitui uma das neoplasias mais graves dentre as lesões de pele, com alto índice de mortalidade associado, quando diagnosticado tardiamente (BENETT, 2003; WEINLICH, 2003; HOMSI, 2005).

Evidências indicam que os exossomos são os mediadores destas metástases, pois essas microvesículas (exossomos) carregam proteínas e materiais genéticos, como o RNA mensageiro e o microRNA das células tumorais, para a corrente sanguínea ou do sistema linfático, e, dessa forma podem circular pelo corpo e se instalar em outros locais do organismo (RATAJCZAK et al.; 2006; SKOG et al., 2008; HOOD, SAN, WICKLINE, 2011; PEINADO et al., 2012). Entretanto os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesse processo ainda não foram completamente esclarecidos (HIRATSUKA et al., 2006; OSKARSSON et al.; 2011; PEINADO et al., 2012).

A incidência de melanoma primário, que historicamente era baixa, vem aumentando gradualmente nas últimas quatro décadas, principalmente em populações de pele clara, que aparentemente parecem apresentar mais suscetibilidade para esse tipo de tumor, hipótese que se baseia no fato de sua ocorrência ser significativamente maior em populações de pele clara, quando comparada à populações negras e amarelas (WATERHOUSE, 1987; TOMATIS, 1991, KOH; GELLER, 1998; ARORA; ATTWOOD, 2009; STRATIGOS; KATSAMBAS, 2009; WARGO; TANABE, 2009). Esses dados podem explicar a alta incidência dessa doença no Sul do Brasil, pois além do buraco na camada de ozônio, nessa região observa-se uma população predominantemente de origem caucasiana.

Além da pele clara, existem outros fatores de risco, entre eles pode-se destacar: a história prévia de câncer de pele, história familiar de melanoma, nevo congênito, maturidade (após 15 anos de idade a propensão para este tipo de câncer aumenta), xeroderma pigmentoso (doença congênita que se caracteriza pela intolerância total da pele ao sol, com queimaduras externas, lesões crônicas e tumores múltiplos),

nevo displásico (lesões escuras da pele com alterações celulares pré-cancerosas) e a exposição excessiva ao sol (GELLER, 2002; HOMSI, 2005; ARORA; ATTWOOD, 2009; IBRAHIM; HALUSKA, 2009; STRATIGOS; KATSAMBAS, 2009).

Em geral a progressão da neoplasia apresenta duas fases distintas: fase inicial e fase tardia. Na fase inicial, a lesão apresenta crescimento radial, é plana e pequena, e possui comportamento menos agressivo. Na fase tardia, o crescimento da lesão passa a ser vertical, as células malignas se localizam, mais profundamente, na derme reticular podendo, inclusive, invadir o subcutâneo, e apresentam pior prognóstico. Sua agressividade é proporcional à capacidade de infiltrar a derme, na transição de crescimento radial para crescimento vertical (WAINSTEIN; BELFORT, 2004; ARORA; ATTWOOD, 2009).

As lesões melanocíticas apresentam algumas características que permitem o seu reconhecimento, estas são: alterações de cor, tamanho, forma e superfície, crescimento rápido, descamação, ulceração, sangramento, prurido, dor e desenvolvimento de áreas papulosas ou nodulares sobre máculas pigmentadas (FRIEDMAN et al., 1991; STRATIGOS; KATSAMBAS, 2009).

Quando diagnosticado em fase precoce, o melanoma é potencialmente curável, embora apresente letalidade ainda bastante alta nos casos de diagnóstico tardio (AZEVEDO; MENDONÇA, 1992, KOH; GELLER, 1998; STRATIGOS; KATSAMBAS, 2009). Nos estágios iniciais da doença a intervenção cirúrgica é a principal modalidade de tratamento, no entanto, a quimioterapia e radioterapia também podem ser utilizadas, dependendo do estágio da doença (SATAYAMOORTHY; HERLYN, 2002; WARGO; TANABE, 2009).

Vários tipos de fármacos estão sendo usados para combater o melanoma, como a dacarbazina, a temozolomida, as nitrosureias, os análogos da platina e os agentes com ação nos microtúbulos (os alcaloides da vinca e taxanos), porém apresentam eficácia limitada (GARBE et al., 2011). Uma das principais causas desta limitação reside na resistência da doença ao fármaco, além disso, embora a quimioterapia seja um método eficaz para eliminação das células neoplásicas, ela também atinge as células sadias (IBRAHIM; HALUSKA, 2009; RASS et al., 2009; GARBE et al., 2011). Outra limitação deste procedimento é que os fármacos que têm se demonstrado efetivos contra melanoma apresentam vários efeitos colaterais agudos e crônicos, tais como náuseas, vômitos, nefrotoxicidade, insuficiência renal, mucosite, anemia e outros cânceres secundários (SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2008).

### 2.3 LEUCEMIAS

O primeiro relato de um caso de leucemia na literatura médica data 1827, quando o médico francês Alfred-Armand-Louis-Marie Velpeau descreveu um caso de uma senhora de 63 anos, que desenvolveu uma doença caracterizada por febre, fraqueza, cálculos renais, hepatomegalia e esplenomegalia, além de apresentar uma consistência sanguínea diferente das normalmente encontradas em outros indivíduos. Algum tempo depois (1845), o patologista Bennet usou o termo "leucocythemia" para descrever a causa da morte de uma série de pacientes, que apresentavam em comum o aumento do baço e mudanças na cor e consistência do sangue. Assim, em 1856, o patologista Rudolf Virchow criou o termo leucemia (HOFFMAN et al., 2005).

Hoje o termo define um grupo de neoplasias malignas que afetam as células tronco-hematopoiéticas, também denominadas de *Stem cells*. As leucemias caracterizam-se pela proliferação anormal de um clone de células hematopoiéticas anormais, com alterações na diferenciação, maturação e regulação da hematopoiese. A proliferação descontrolada das células leucêmicas inibe a produção das células sanguíneas normais, como os leucócitos, os eritrócitos e as plaquetas, o que leva os indivíduos afetados a sofrerem com anemias, desordens hemorrágicas, e estarem mais sujeitos a infecções (ZAGO, 2005; SWERDLOW et al., 2008; PUI, 2009).

A transformação leucêmica pode ocorrer em diferentes fases da diferenciação de precursores linfóides ou mielóides, o que a caracteriza, sob os aspectos biológico e morfológico, como uma doença heterogênea. Por constituírem um grupo heterogêneo de doenças, as leucemias diferem quanto à etiologia, à patogênese, ao prognóstico e à resposta ao tratamento (PUI; EVANS, 1998; LOPES; MENDES, 2000; SANTOS-SILVA, 2002; BAIN, 2003; ZAGO, 2005).

Em linhas gerais, as leucemias podem ser divididas em linfóides e mielóides, e em agudas e crônicas, de acordo com a linhagem e estágio de maturação dos precursores afetados (BENNETT et al., 1976; BENNETT et al., 1985; BENNETT et al., 1988; BENNETT et al., 1991; JAFFE et al., 2001; SWERDLOW et al., 2008). As leucemias crônicas caracterizam-se pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas, que mantém a capacidade parcial de diferenciação celular, o que não ocorre nas leucemias agudas, onde existe um predomínio de células imaturas (linfoblastos ou mieloblastos), as quais são incapazes de se diferenciar em células maduras, devido a um

bloqueio maturativo. Essa diferença faz com que as leucemias agudas apresentem um pior prognóstico, pois se não tratadas adequadamente podem levar o paciente a óbito em dias ou semanas, enquanto que nas leucemias crônicas o curso clínico é mais brando. Quando o bloqueio maturativo ocorre na linhagem mieloide dá origem às leucemias mieloides (LMs) e, quando afeta a linhagem linfóide, origina as leucemias linfóides (LLs) (BENNETT et al., 1976; BENNETT et al., 1985; BENNETT et al., 1988; BENNETT et al., 1991; FRANKS; TEICH, 1998; PUI; EVANS, 1998; WANG; CHEN, 2000; BÉNÉ, 2001; JAFFE et al., 2001; SANTOS-SILVA, 2002; BAIN, 2003; ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2005; SWERDLOW et al., 2008; ROBAK, WIERZBOWSKA, 2009).

A leucemia linfóide aguda (LLA) é a neoplasia mais frequente na infância, corresponde a 30-35% dos casos, sua maior incidência ocorre entre 2 e 5 anos de idade, sendo quatro vezes mais frequente que a leucemia mieloide aguda (LMA) (BARBOSA, 2002; BAIN, 2003; SMITH, 2006). Diferentemente do que ocorre em crianças, que apresentam uma probabilidade de sobrevida livre de doença, em 5 anos após o tratamento, de 75-80% dos casos, pacientes adultos com LLA não respondem bem à quimioterapia, apresentam uma probabilidade de sobrevida livre de doença em apenas 40% dos casos (PUI et al., 2004). Por outro lado, 20-25% dos casos de LLA infantil recidivam durante o tratamento. Considerando que as LLAs correspondem a 30% dos cânceres pediátricos, a recidiva em LLA é apontada como um dos maiores problemas da oncologia pediátrica (PUI, 1997; ZAGO et al, 2005).

A etiologia das LLAs ainda permanece desconhecida, porém alguns fatores de risco têm sido associados a esta doença, entre estes, podemos destacar a radiação ionizante, produtos químicos diversos e as imunodeficiências, além de polimorfismos genéticos e de algumas anomalias cromossômicas constitucionais, como síndrome de Down, síndrome de Bloom, anemia de Fanconi e ataxia-telangiectasia (PUI et al., 2008). Os sintomas clínicos são resultantes da invasão medular pelas células leucêmicas e apresentam-se como fadiga e sangramento em decorrência da anemia e da plaquetopenia, respectivamente, em 50% dos pacientes, observa-se febre ao diagnóstico, a qual está relacionada com a liberação de citocinas pelas células leucêmicas ou infecção, além disso, a linfadenopatia generalizada, a esplenomegalia e a hepatomegalia também são sinais comuns, pois as células leucêmicas infiltram muitos tecidos no organismo, e em 4-7% dos pacientes pode-se observar manifestações de comprometimento do sistema nervoso central

(SNC) como cefaleia, rigidez da nuca, vômitos e letargia, uma rápida instalação de inconsciência normalmente indica hemorragia subaracnoidea (PEJOVIC; SCHWARTZ, 2002; KEBRIAIEI et al, 2003; ZAGO et al, 2005).

O diagnóstico das LLAs é realizado por meio de análise de amostras de sangue periférico e/ou da medula óssea obtidos antes do início do tratamento quimioterápico. Em 2008 a OMS estabeleceu, com base nas características morfológicas, citoquímicas, imunofenotípicas e clínicas, novos critérios para o diagnóstico das LAs, no qual são considerados a origem e a linhagem celular, o estágio de maturação e o tipo de anormalidade citogenética ou molecular envolvida na patogênese da doença. A partir desses critérios, a OMS propôs uma nova classificação para neoplasias do sistema hematopoiético e linfoide. Dessa forma, as LLAs foram subdivididas em duas categorias: leucemia/linfoma linfoblástica T (LLA-T) e leucemia/linfoma linfoblástica B (LLA-B). Essa última categoria ainda foi subdivida em duas subcategorias: leucemia/linfoma linfoblástica B associada à anormalidades genéticas recorrentes e leucemia/linfoma linfoblástica B, não categorizada nos itens anteriores (SWERDLOW et al., 2008).

Como visto anteriormente, na leucemia mieloide aguda (LMA) há proliferação do precursor mieloide. O termo mieloide inclui todas as células que pertencem as linhagens celulares granulocítica (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), monócitos, eritrócitos, megacariócito e mastócitos (ZAGO et al., 2005; WILLIAMS, 2006). As LMAs acometem adultos e crianças, entretanto, na infância sua incidência é baixa (15 a 20% das LAs da infância), já na idade adulta a prevalência aumenta conforme a idade, sendo responsável por 25 a 30% das leucemias ocorridas entre 10 e 15 anos de idade, e atingindo 80 a 90% das leucemias agudas em adultos acima de 45 anos, além de ser mais comumente encontradas em homens do que em mulheres (SANDLER et al., 1997; DILLER et al., 2002; BAIN, 2003). Apesar de ser considerada a mesma doença, adultos e crianças com LMA apresentam diferentes características clínicas, prognósticas e resposta ao tratamento. Diferente das LLAs, as LMAs em crianças têm pior prognóstico, e aproximadamente um terço das portadoras recidivam (RUBNITZ, 2008; SHAH; AGARWAL, 2008). Em adultos, o cenário não é muito diferente, pois apesar de 50% a 85% dos pacientes adultos, com LMA, atinjam a remissão após o tratamento (dependendo do subtipo de LMA), a maioria recidiva e vai a óbito após dois anos em remissão (SHIPLEY; BUTERA, 2009; ROBAK; WIERZBOWSKA, 2009).



A etiologia da LMA, ainda permanece desconhecida. Porém alguns fatores de risco têm sido associados a esta doença, entre estes, pode-se destacar a exposição a agentes ambientais como quimioterápicos e radiação ionizante, além de raras ocasiões em que a LMA é atribuída à herança genética (LINET, 1985; SANDLER et al., 1997). Os sintomas clínicos são ocasionados pela falência da hematopoese normal e incluem anemias, risco de infecção e sangramentos, além de queixas como mal-estar (que podem inclusive preceder alguns meses do diagnóstico), dores ósseas, artralgia com ou sem edema, palidez, fraqueza, febre (ocasionada pela própria doença ou infecções secundárias), perda de peso, hiperplasia gengival, coagulação intravascular disseminada (CIVD), infiltração cutânea cloroma, mieloma ou sarcomas granulocíticos, entre outros. Alguns achados clínicos são compatíveis com determinados tipo de LMAs (COHEN et al., 1988; AVVISATI et al., 2001).

O diagnóstico das LMAs também é realizado por meio de análise de amostras de sangue periférico e/ou da medula óssea obtidos antes do início do tratamento quimioterápico. As características de morfologia, citoquímica, imunofenotipagem e clínicas são usadas para estabelecer a linhagem celular e para avaliação de sua maturação (SWERDLOW et al., 2008, VARDIMAN et al., 2009). Segundo a Classificação da OMS, publicada em 2008, a LMA é subdividida em sete subcategorias, como segue: LMA associada a anormalidades genéticas recorrentes, LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia, neoplasias mieloides associadas ao tratamento, LMA não categorizada nos itens anteriores, sarcoma mielóide, proliferação mielóide relacionada com síndrome de Down e neoplasia de células blásticas dendríticas plasmocitoides (SWERDLOW et al., 2008).

Diversas formas de terapia vêm sendo utilizadas no tratamento de leucemias, como: radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e transplante de medula óssea. Embora o transplante de medula óssea seja eficaz na remissão completa das leucemias, apresenta restrições clínicas e sócioeconômicas para o paciente. Por isso, a quimioterapia ainda é a terapia antileucêmica de escolha, na qual, vários medicamentos anticancerígenos são utilizados de forma combinada, ou como agentes isolados (GOL B et al., 2001; BITTENCOURT et al., 2003; ROBAK e WIERZBOWSKA, 2009; THOMAS, 2009).

A quimioterapia atualmente utilizada para o tratamento das leucemias agudas é dividida em diferentes fases. Para as LLAs o tratamento em geral é constituído em fase de indução, terapia de consolidação e de manutenção, além da profilaxia e/ou tratamento do

sistema nervoso central (SNC) e transplante de células tronco. Já para as LMAs o tratamento é constituído de duas fases: a quimioterapia de indução e a terapia de pós-remissão (CORNELL; PALMER, 2012; NCCN, 2012a; NCCN, 2012b). A fase de indução tem como objetivo alcançar a remissão completa, ou seja, induzir a apoptose dos blastos leucêmicos. A terapia de pós-remissão ou consolidação é utilizada assim que a remissão completa é alcançada e objetiva evitar uma recidiva da doença, diminuindo a quantidade de células leucêmicas a quantidades não detectadas laboratorialmente. A fase de manutenção, realizada nos casos de LLA, pode durar de um a dois anos e tem como objetivo prevenir que o paciente tenha recidiva após a realização das terapias de indução e consolidação. Já a profilaxia e/ou tratamento do sistema nervoso central, realizada também nos casos de LLA, tem como objetivo eliminar as células de locais onde os quimioterápicos de uso sistêmico, não chegam facilmente (NCCN, 2012a).

A morbidade associada aos quimioterápicos e a resistência ao tratamento de LAs ainda são obstáculos significativos (HERR; DEBATIN, 2001; ELSAYED; ISMAIL; MONEER, 2011). Por isso, a busca por compostos antineoplásicos que tenham maior eficiência em induzir morte das células tumorais e, que sejam de fácil administração, pois a maioria dos quimioterápicos, atualmente, necessita de administração endovenosa prolongada, e com poucos ou insignificantes efeitos colaterais, tornou-se um grande alvo de investigação da indústria farmacêutica.

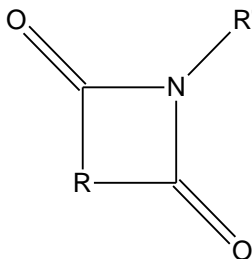
## 2.4 IMIDAS CÍCLICAS

Entre os compostos sintéticos com possível atividade antitumoral encontra-se uma classe denominada como imidas cíclicas, as quais são obtidas geralmente por síntese orgânica e resultante da reação entre ácidos dicarboxílicos e amônia, com conseqüente liberação de água. A síntese orgânica tem contribuído significativamente para o desenvolvimento de novos fármacos, sendo responsável por cerca de 75% dos fármacos existentes no mercado farmacêutico (CECHINEL FILHO et al., 2003).

Esta classe de compostos pode ser subdividida em sub-classes, dentre elas as maleimidias, succinimidias, glutarimidias, ftalimidias e naftalimidias, bem como seus respectivos derivados (HAERGRAVES et al., 1970). No Esquema 1, pode-se observar a estrutura geral das imidas cíclicas ( $-\text{CO}-\text{N}(\text{R})-\text{CO}-$ ), onde R' pode ser um átomo de hidrogênio,

grupo alquila ou grupo arila. A maioria destes compostos é constituído por um sistema cíclico com menos de 7 átomos de carbono (NUNES, 1986).

**Esquema 1:** Estrutura geral das imidas cíclicas.



As imidas cíclicas possuem propriedades farmacológicas que chamam a atenção de diversos investigadores, destacando-se as atividades antinociceptiva (ANDRICOPULO et al., 1996), anti-inflamatória (CALIXTO et al., 1984), antimicrobiana (CECHINEL FILHO 1994; ASBURY et al, 1994) e antitumoral (ASBURY et al., 1994; COSTANZA et al, 1995; FOURNEL et al., 2002; HU et al., 2007; OTT et al., 2008, 2009; WU et al., 2009; CHEN et al., 2010; MUKHERJEE et al., 2010; LI et al., 2011; OTT et al., 2011). Os efeitos farmacológicos atribuídos a estes compostos parecem estar relacionados com o tamanho e natureza dos grupos substituintes do anel imídico, que podem mudar suas propriedades estéricas, alterando, conseqüentemente, sua atividade (KIER; ROCHE, 1967; HALL; WONG; SCOVILL, 1995; CECHINEL FILHO et al, 2003).

Como um exemplo bem conhecido de imida cíclica, pode-se citar a talidomida, cujos efeitos são bem conhecidos, e apesar dos efeitos adversos descritos no passado, estudos evidenciaram a utilidade deste fármaco para o tratamento de diversas doenças (SINGHAL et al., 1999; FINE et al.; 2000; HWU et al.; 2003), inclusive de tumores sólidos, por interferir na formação dos vasos sanguíneos (FOLKMAN, 1990) e também para o tratamento de mieloma múltiplo (ROSA et al., 2010).

Além da talidomida, várias outras imidas cíclicas já foram estudadas e seus resultados encontram-se bem documentados, como o mitonafida, o amonafida e seus derivados, que demonstraram significativa atividade antitumoral sobre diversos tipos de tumores,

especialmente leucemias, melanomas e tumores de mama (OTT et al., 2001; MUKHERJEE et al., 2010). Esses compostos já foram alvo de diversos ensaios clínicos, sem nunca entrarem no mercado devido a sua toxicidade dose limitante (QUAQUEBEKE et al., 2007; OTT et al., 2008; INGRASSIA et al.; 2009; OTT et al., 2009; WU et al., 2009; CHEN et al., 2010; LI et al., 2011). Ratain e colaboradores (1991 e 1995) em seus estudos demonstraram que a atividade tóxica apresentada pelo amonafida se deve ao grupamento amino presente na sua estrutura, o qual é metabolizado em N-acetil-amonafida, pela enzima N-acetiltransferase 2, sendo este grupamento o responsável pelos efeitos tóxicos.

As nafthalimidias em geral e o amonafida em particular, exercem sua atividade antitumoral por alterar o processo de duplicação celular, pela intercalação no DNA, inibição da topoisomerase II, indução de permeabilidade da membrana e apoptose (MILLER et al., 1994; CHEN et al., 2010; LI et al., 2011). A topoisomerase II está envolvida nos processos de duplicação, transcrição, recombinação e condensação nuclear. Os compostos que exercem atividade antineoplásica por essa via geralmente induzem toxicidade dose limitante e a resistência a múltiplos fármacos (MDR) (ZHU et al.; 2007).

Outras imidas também exercem sua atividade antitumoral por intercalação com o DNA, como a acridina não-substituída, a proflavina (NORMAN et al., 1990) e a poliamina (BRANA et al., 1997; GAMAGE et al., 2001; BAILLY et al., 2003). Essas imidas modificam a estrutura do DNA e impedem a sua duplicação, por isso, são de grande importância como agentes quimioterápicos (NORMAN et al., 1996; BRANA et al., 1997; GAMAGE et al., 2001; BAILLY et al., 2003).

Além dessas imidas, a sulfonamida e seus derivados também vêm demonstrando bons resultados em ensaios *in vitro* e *in vivo*, demonstram atividade citotóxica contra diversas linhagens tumorais, e ausência de toxicidade em camundongos (FOURNEL et al., 2002; HU et al., 2007). As sulfonil-hidrazonas foram capazes de eliminar tumores em 20-80% de camundongos leucêmicos, após seis dias de tratamento (LOH et al., 1980) pela inibição seletiva da fosfoinositida-3-quinase, que é sobre-expresso em 30% dos tumores (KENDALL et al., 2007).

Outros trabalhos, *in vitro*, também demonstram resultados expressivos de alguns derivados de imidas cíclicas como potenciais agentes antitumorais, frente a diferentes tipos de linhagens celulares (HeLa, A549, P388, HL-60, MCF-7, HCT-8, e A375) com valores de IC<sub>50</sub> de 10<sup>-6</sup> a 10<sup>-5</sup> M (ANTONINI et al.; 2008; NORTON et al.; 2008; WU et al.; 2009).

Os resultados encontrados nesses trabalhos justificam a realização de novos estudos com o grupo das imidas cíclicas, com o intuito de investigar novos alvos farmacológicos para o tratamento do melanoma e das leucemias agudas, os quais apresentem menor toxicidade sistêmica e com isso diminuição da morbidade associada aos quimioterápicos, o que influi na qualidade de vida dos indivíduos portadores desses tipos de neoplasias.

## 2.5 VIAS DE MORTE CELULAR

Entender os mecanismos celulares relacionados à morte das células neoplásicas, induzida por agentes citotóxicos, é um passo fundamental na busca por novos quimioterápicos, pois a morte das células em um tecido não é um acontecimento necessariamente aleatório, mas sim um fenômeno que pode ser programado no tempo e controlado na sua gênese (FERREIRA; ROCHA, 2004).

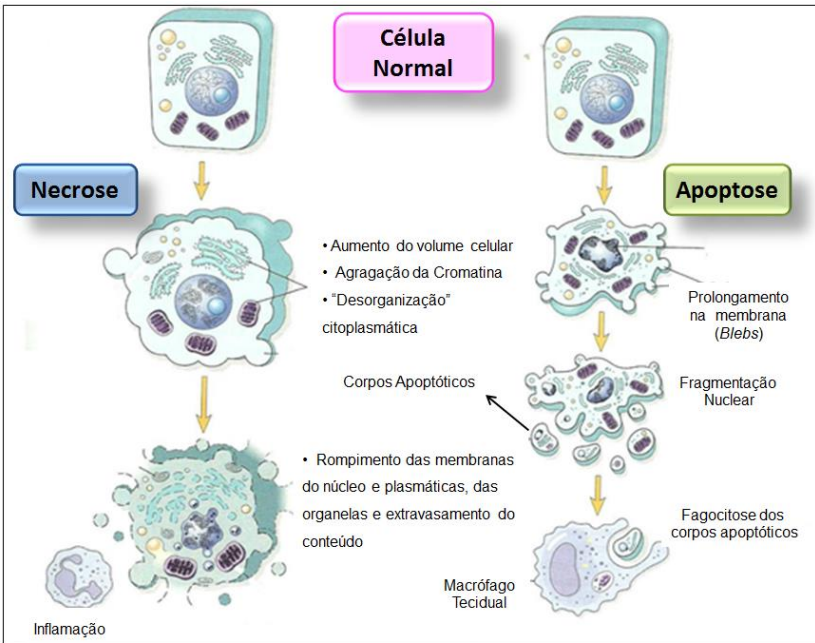
Em geral, os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas, em apoptose e necrose (RENVOIZÉ et al., 1998; DEBNATH; BAEHRECKE; KROEMER, 2005). Porém mais recentemente outras vias de mortes vêm sendo descritas, entre elas, pode ser destacada a autofagia, processo no qual porções do citoplasma são encapsuladas por uma membrana, originando estruturas denominadas autofagossomos, os quais irão se fundir com os lisossomos, e, posteriormente, ser degradados pelas hidrolases lisossomais (DEBNATH; BAEHRECKE; KROEMER, 2005; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Além dessa via, outra que vem sendo estudada, a NETosis (*Neutrophil Extracellular Traps*) que pode ser considerada uma via de morte, pois durante o processo ocorre a morte dos neutrófilos. Nessa via, os neutrófilos, ao receber um estímulo de um antígeno, sofrem alterações nucleares liberando seu DNA, que associado as histonas e aos grânulos forma um complexo que captura e lisa os antígenos (YIPP et al.; 2012).

A apoptose e a necrose são duas vias de morte celular que podem ocorrer de forma independente, sequencial, bem como simultaneamente, a forma com que a célula irá morrer dependerá basicamente da intensidade do dano, dos níveis intracelulares de ATP (Adenosina trifosfato) disponíveis, do tipo e do estágio de desenvolvimento do tecido e do meio fisiológico em que a célula se encontra (ELMORE, 2007). A morte celular pode ser induzida por diversos estímulos, como: alta temperatura, radiação UV, radiação

ionizante, estresse oxidativo, agentes citotóxicos antitumorais, entre outros (RASTOGI; SINHA, 2009).

A necrose, ou “estado de morte”, é o ponto final das alterações resultantes da injúria celular irreversível, em que a homeostase não pode ser reestabelecida. Como pode ser observado no Esquema 2, a necrose é um tipo de morte na qual ocorre um aumento do volume celular, a cromatina se agrega sem uma nítida mudança de distribuição, ocorre uma certa desorganização do citoplasma, as mitocôndrias ficam “inchadas” e com a matriz floculenta, os ribossomos se dissolvem e a membrana celular perde a continuidade com o vazamento do conteúdo citoplasmático, o que causa dano às células vizinhas, e, conseqüente reação inflamatória local. Esse tipo de morte é bastante observado nas respostas à lesão celular (FERREIRA; ROCHA, 2004; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; PERES; CURI, 2005; BOUJRAD et al., 2007).

**Esquema 2:** Alterações morfológicas na necrose e na apoptose.



Fonte: Adaptado de KUMAR et al., 2010.

Já na apoptose, conhecida como “morte celular programada”, as células inicialmente perdem o contato com as células vizinhas e se arredondam, o retículo citoplasmático se distende e as cisternas se fundem com a membrana citoplasmática, a morfologia das outras organelas citoplasmáticas mantém essencialmente intactas, o volume celular se reduz, essencialmente por perda de água e íons, e, conseqüente ocorre um aumento da densidade celular, o núcleo se adensa e a cromatina se marginaliza e se condensa, formando grandes grumos junto à membrana nuclear, que se mantém perfeitamente intacta. A seguir a membrana celular passa a formar prolongamentos (*blebs*) e o núcleo se desintegra em fragmentos autocontidos pela membrana nuclear, que continua mantendo sua integridade. Os *blebs* aumentam progressivamente em número e tamanho, alguns deles englobam parte do núcleo, e com o evoluir do processo, a célula se rompe em estruturas contidas pela membrana citoplasmática. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos, que, posteriormente, são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (MIGNOTTE; VAYSSIERE, 1998; SHEARWIN-WHYATT; KUMAR, 1999; FERREIRA; ROCHA, 2004; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; LIAO et. al., 2005). Essas alterações morfológicas, descritas no Esquema 2, são consideradas como marcadores para a avaliação da via de morte celular, e podem ser analisadas com a utilização de corantes como por exemplo brometo de etídio e laranja de acridina (RENVOIZÉ et al., 1998).

Outros marcadores também podem ser utilizados para avaliar a via de morte celular, entre eles a fosfatidilserina, um fosfolípido que normalmente está presente na camada interna da membrana plasmática, mas que diante do primeiro sinal de apoptose é externalizado, promovendo a perda da assimetria na composição dos fosfolípidos, e, dessa forma, identificando a superfície da célula apoptótica para serem fagocitada por células vizinhas, em geral os macrófagos (PERES; CURI, 2005; ELMORE, 2007). Assim, as células em apoptose expõem na sua superfície os resíduos de fosfatidilserina, os quais se ligam a anexina V (BOERSMA et al., 2005; CHINKWO, 2005) que quando conjugada ao FITC pode ser avaliada por citometria fluxo.

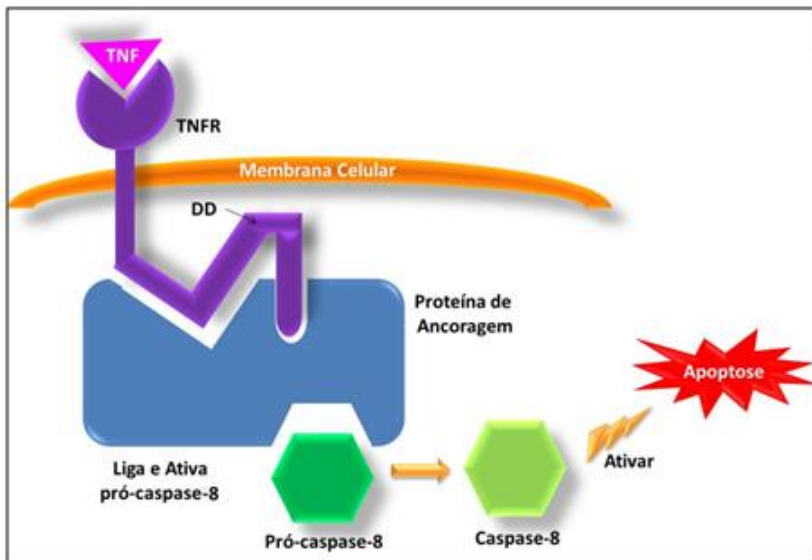
### 2.5.1 Apoptose

Há duas vias principais que podem desencadear o processo apoptótico: uma denominada via extrínseca ou via de receptor de morte, e a outra denominada intrínseca ou via mitocondrial, ambas estão associadas e influenciam uma à outra (MIGNOTTE; VAYSSIERE, 1998; SHEARWIN-WHYATT; KUMAR, 1999; HAJRA; LIU, 2004; HAIL et al., 2006; ELMORE, 2007; RASTOGI; SINHA, 2009; CRAWFORD; WELLS, 2011).

Como pode ser observado no Esquema 3, na via extrínseca a ativação ocorre associada à sinalização dos receptores de morte, que são membros da família de receptor de TNF (*Tumor Necrosis Factor*), os quais contêm domínios extracelulares ricos em cisteína e domínios citoplasmáticos, denominados domínios de morte ou DD (*Death Domain*). Esses últimos são assim denominados porque ativam uma série de moléculas sinalizadoras que fazem a transdução de sinais necessários para a indução da apoptose (SHEARWIN-WHYATT; KUMAR, 1999; ELMORE, 2007). Os receptores de morte incluem o receptor de TNF 1 (*Tumor Necrosis Factor*), de Fas, de TRAIL 1 e 2 (*TNF-Related Apoptosis-Including Ligant*) e os receptores de morte 3 e 6 ou DR 3 e 6 (*Death Receptors*) (SCHMITZ et al., 2001; BAETU; HISTCOTT, 2002; CHEN; GOEDEL, 2002; HAJRA; LIU, 2004; HAIL et al., 2006).



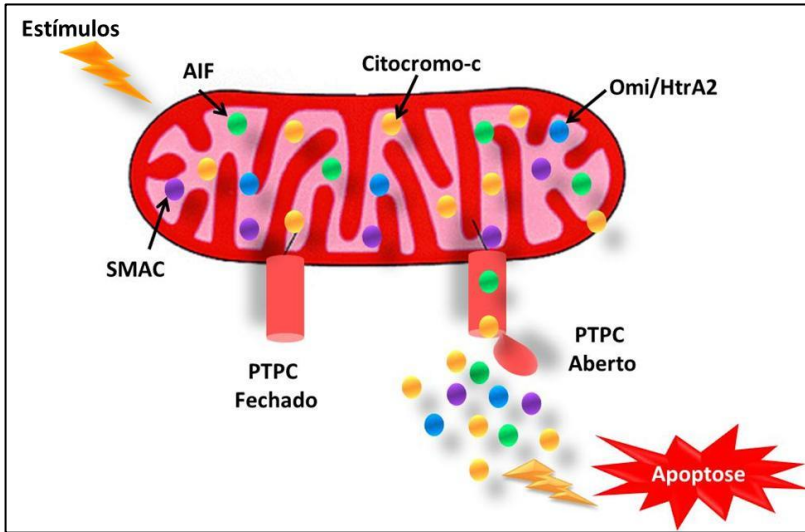
**Esquema 3:** Ativação da via extrínseca da apoptose, interação ligante-receptor.



Fonte: Adaptado de RUBIN, et al., 2010.

A via intrínseca da apoptose inicia-se na mitocôndria, e pode ser desencadeada por uma série de estímulos como: ausência de fatores de crescimento, hormônios e citocinas, radiação, toxinas, hipóxia, hipertermia, infecção viral, radicais livres, dano ao DNA, entre outros. Como pode ser observado no Esquema 4, esses estímulos causam alterações na permeabilidade mitocondrial e o que resulta na liberação do citocromo-c para o citoplasma, o que desencadeia o processo apoptótico (MIGNOTTE; VAYSSIERE, 1998; SPIERINGS et al., 2005; ELMORE, 2007; RASTOGI; SINHA, 2009).

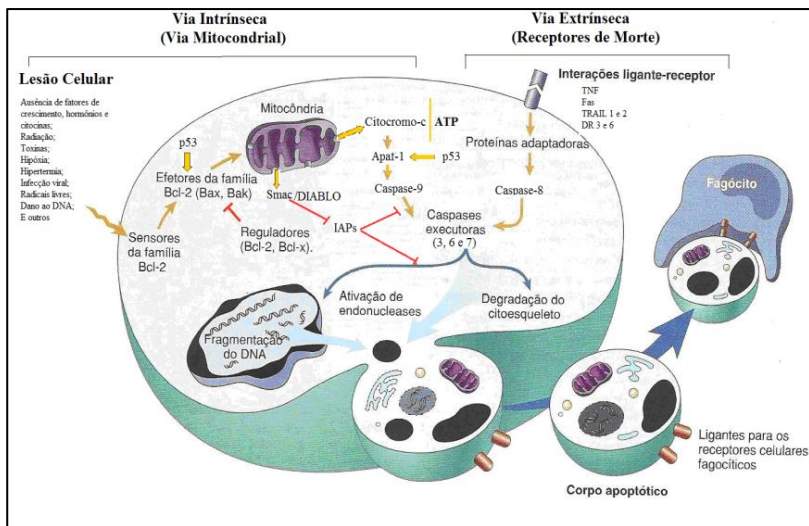
**Esquema 4:** Ativação da via intrínseca da apoptose, alteração na permeabilidade mitocondrial e liberação de proteínas apoptóticas pela mitocôndria.



Fonte: Adaptado de RUBIN, et al., 2010.

Independente do estímulo, a indução de apoptose sempre resulta na ativação das caspases, as quais induzem as modificações funcionais e morfológicas características do processo, como descritas anteriormente. Embora a ativação das caspases possa ser induzida por diferentes vias, de acordo com o fator desencadeante (Esquemas 3 e 4), algumas são mais frequentemente utilizadas, entre elas pode-se incluir a ativação direta de caspases, as alterações na mitocôndria, e a interferência com proteínas citosólicas reguladoras da apoptose (HAJRA; LIU, 2004; ELMORE, 2007; BRASILEIRO FILHO, 2009). Essas diferentes vias encontram-se demonstradas no Esquema 5.

**Esquema 5:** As vias de ativação da apoptose.



Fonte: Adaptado de KUMAR et al., 2010.

As caspases (*Cysteine-Dependent Aspartate-Specific Proteases*), são enzimas que possuem cisteína no sítio ativo e que clivam proteínas em sítios com resíduos de ácido aspártico (ADAMS, 2003). As caspases são produzidas como pró-caspases, e ativadas por deslocamento da molécula inibidora ou por clivagem proteolítica em sítios com ácido aspártico. Essas proteases são as responsáveis por toda a sinalização da apoptose (Esquema 5) (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997; SHEARWIN-WHYATT; KUMAR, 1999; BOATRIGT et al., 2003 ; BOATRIGT; SALVESEN, 2003). Até o momento, foram identificadas quinze caspases (caspase-1 a 14 e 16) em mamíferos, e nem todas estão envolvidas diretamente na apoptose, as caspases-1, -4, -5, -11, -12 e -13 são denominadas caspases inflamatórias. As caspases envolvidas no processo apoptótico podem ser divididas em caspases iniciadoras ou desencadeantes da apoptose (caspase-2, -8, -9, e -10) e caspases efetoras ou executoras da apoptose (caspase-3, -6 e -7) (RIEDL; SHI, 2004; CRAWFORD; WELLS, 2011; LU; CHEN, 2011).

Uma consequência importante da ativação das caspases é a ativação da nuclease CAD (*Caspase Activated Deoxyribonuclease*), a qual é responsável pela degradação internucleossomal do DNA, uma característica marcante nesse tipo de morte celular (ENARI et al., 1998; SARASTE; PULKKI, 2000). A degradação interssomal do DNA na apoptose pode ser observada após eletroforese do DNA em gel, onde verifica-se padrão característico “em escada” opondo-se ao arrastado visto na necrose. Isso se deve ao fato de que as quebras no DNA ocorrem entre os nucleossomas, formando fragmentos múltiplos de 200 pares de bases, e que a membrana plasmática não se rompe, prevenindo a liberação de componentes celulares para o meio extracelular (KERR et al., 1995; KROEMER et al., 2005). Essa quebra do DNA pode ser observada com a adição de alguns corantes, como o brometo de etídio que se intercala no DNA quebrado, produzindo uma coloração alaranjada, o que pode ser utilizada para avaliar a via de morte celular (GENG et al., 2003).

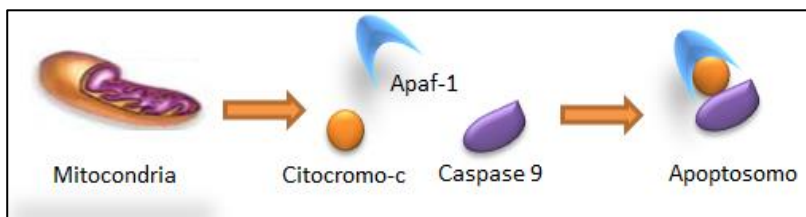
As mitocôndrias também desempenham um importante papel na apoptose, pois quando sofrem alterações na sua permeabilidade, liberam para o citoplasma proteínas como o citocromo-c, a SMAC (*Second Mitochondrial Activator of Caspases*, também conhecida como DIABLO), a Omi/HtrA2 (Omi: non-methionine initiating protein; HtrA2: High Temperature Requirement protein A2) e o AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) (Esquema 4). Essas proteínas desempenham um papel importante no processo apoptótico (SPIERINGS et al., 2005; ELMORE, 2007). A permeabilidade mitocondrial pode ser avaliada pelo potencial de membrana mitocondrial, simbolizado por  $\Delta\Psi_m$ , que é determinado pelo gradiente de prótons da cadeia respiratória (MIGNOTTE; VAYSSIERE, 1998; CAMPBELL, 2006; KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007; OW et al., 2008). A abertura do PTPC (*Permeability Transition Pore Complex*) causa a despolarização mitocondrial precoce, nos mais variados modelos de indução de apoptose; o que leva a perda do potencial mitocondrial e ao extravasamento do seu conteúdo (MIGNOTTE; VAYSSIERE, 1998; BELIZÁRIO et al., 2007; KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007; OW et al., 2008).

Como visto, com alteração da permeabilidade mitocondrial, algumas proteínas envolvidas no processo apoptótico são liberadas pela mitocôndria para o citosol (Esquemas 4 e 5). Cada uma dessas proteínas desempenha uma função durante a apoptose. Entre elas pode-se destacar:

- Citocromo-c: o citocromo-c, se associa com a Apaf-1 (*Apoptosis Protease Activating Factor*) e recruta a caspase-9, formando

um complexo conhecido como apoptosoma (Esquema 6). Um sítio da Apaf-1 liga-se ao ATP, o que resulta na alteração conformacional necessária para ativar a caspase-9, por este motivo a participação do citocromo-c na apoptose, é dependente de ATP (Esquema 5) (MIGNOTTE; VAYSSIERE, 1998; MUNOZ-PINEDO et al., 2006, SPEIRS et al., 2011).

**Esquema 6:** Formação do apoptosoma.



Fonte: Adaptado de RUBIN, et al., 2010.

- Proteínas SMAC ou DIABLO e OMI/Htra2: essas proteínas promovem a apoptose por se ligarem aos inibidores naturais da apoptose, as IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*), inibindo dessa forma, a ação das IAPs e, conseqüentemente, inativando as proteases envolvidas na iniciação (caspase-9) e na execução (caspases-3 e-7) da cascata das caspases (Esquema 4) (MITA; MITA; TOLCHER, 2006; GRIVICICH, 2007, ELMORE, 2007; RASTOGI; SINHA, 2009).

- AIF: esse fator atua independente da ativação de caspases, depois de ser liberado para o citoplasma, se transloca para o núcleo e induz a condensação da cromatina na periferia nuclear e a quebra de DNA em pedaços de aproximadamente 50 a 300 kb. Também é capaz de induzir o aumento na permeabilidade mitocondrial, ocasionando o extravasamento do citocromo-c (MIGNOTTE; VAYSSIERE, 1998; ELMORE, 2007; RASTOGI; SINHA, 2009).

A alteração na permeabilidade de membrana mitocondrial, a perda do potencial mitocondrial e a liberação de proteínas da mitocôndria constituem o evento central da apoptose. Entretanto, outras proteínas presentes no citosol regulam esse processo de apoptose por inibirem as caspases ou por regularem a permeabilidade das mitocôndrias. Entre essas proteínas pode-se destacar as IAPs e as

proteínas da família Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein-2*) (MIGNOTTE; VAYSSIERE, 1998; TJALMA et al., 1998; ELMORE, 2007).

As IAPs, como descrito anteriormente, compreendem uma família de proteínas inibidoras da apoptose e são as únicas proteínas endógenas que têm a habilidade de bloquear o passo seguinte à liberação do citocromo-c pela mitocôndria, pois inibem a atividade das caspases efetoras e ativadoras. Algumas proteínas da família das IAPs já foram descritas, como a survivina, a NIAP, a MLIAP, a c-IAP-1, a c-IAP-2 e a XIAP. A survivina é expressa em grandes quantidades em células tumorais, onde exercem um papel importante na sobrevivência dessas células, por isso, em diversos trabalhos, são relacionadas com prognóstico desfavorável e com a diminuição de sobrevivência de pacientes portadores de câncer (NAKAYAMA; KAMIHIRA, 2002; ZAFFARONI; PENNATI; DAIDONE, 2005), além do desenvolvimento de resistência a quimioterápicos (ALTIERI, 2001; WRZESIEN-KUS et al., 2004; ZAFFARONI; PENNATI; DAIDONE, 2005).

Outra família de proteínas reguladoras da apoptose é a família das proteínas Bcl-2, que incluem 25 proteínas, algumas inibidoras da apoptose (antiapoptóticas) outras ativadoras da apoptose (pró-apoptóticas) (ELMORE, 2007). A família das proteínas Bcl-2 pode ser subdividida em três subfamílias, duas dessas sub-famílias possuem multidomínios BH (*Bcl-2 Homology regions*); enquanto as antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1, Bcl-B e A1/Bfl-1) possuem quatro domínios BH (BH1, BH2, BH3 e BH4), as pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bid, Noxa, Mtd/Bok e Bcl-rambo) possuem três domínios BH (BH1, BH2 e BH3). A terceira subfamília possui apenas o domínio BH3, por isso são denominadas de *BH3-only* (Bad, Bik, Bid, Hrk, Bim, NOXA e PUMA) (CHIPUK et al., 2006; KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007; YOULE; STRASSER, 2008; FRENZEL et al., 2009).

As proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, em resposta a um estímulo apoptótico, sofrem mudanças conformacionais, e se inserem no interior da membrana mitocondrial, formando canais através dos quais o citocromo-c e outras proteínas mitocondriais extravasam para o citosol, levando a ativação das caspases (Esquema 5). As proteínas antiapoptóticas podem sequestrar as pró-apoptóticas ou associar-se entre si, impedindo a formação de poros (PETROS et al., 2004; BRAS et al., 2005; KUTUK; BASAGA, 2006; KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007; YOULE; STRASSER, 2008; AUTRET; MARTIN, 2009; FRENZEL et al., 2009). As proteínas *BH3-only* possuem ligantes que ativam os membros das proteínas pró-apoptóticas ou inativam as

antiapoptóticas (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007; YOULE; STRASSER, 2008; FRENZEL et al., 2009). A família Bcl-2 também está associada a vários outros mecanismos de apoptose, pois possui ação antioxidante e sequestradora da APAF-1, o que impede a formação do apoptosoma (CORY; ADAMS, 2002).

As proteínas Bcl-2 antiapoptóticas sofrem grande regulação transcricional pela proteína supressora tumoral p53 (Esquema 5). As vias dependentes da p53 ajudam a manter a estabilidade genômica, eliminando as células lesadas, pois a proteína está envolvida na expressão de genes relacionados à interrupção do ciclo celular e a apoptose (CHAU; KORSMEYER, 1998; FERRI; KROEMER, 2001, OREN 2003). A proteína p53 ativada tem a capacidade de estimular genes pró-apoptóticos, como, por exemplo, o da Bax, que ocasionarão alterações no potencial da membrana mitocondrial liberando para o citoplasma o citocromo-c, o qual é capaz de ativar a caspase 9 e induzir ao processo apoptótico (Esquema 5). A p53 também pode estar envolvida em respostas que não envolvam o dano ao DNA, como choque térmico, hipóxia, dano físico, privação metabólica entre outros, além de interromper o ciclo celular para reparar o dano celular sofrido (DESTANCHINA et al., 1998; GUPTA, 2001; FERRI; KROEMER, 2001, SAX et al.,2002).

## 2.6 CICLO CELULAR

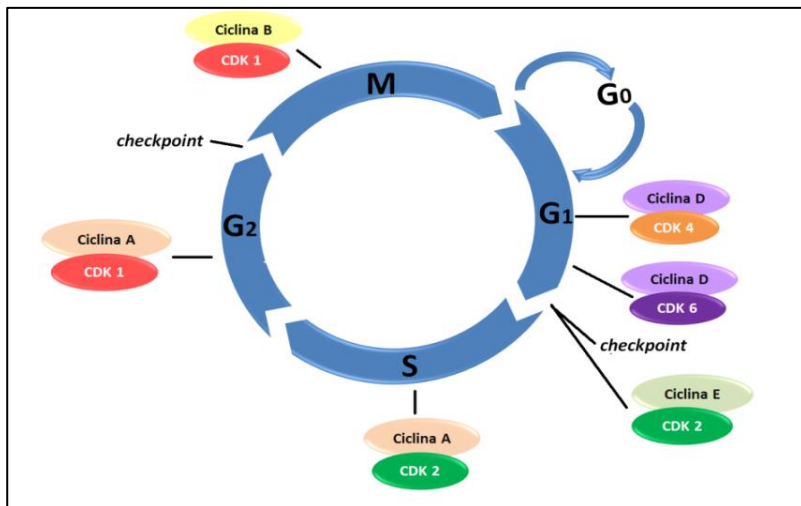
As células passam por etapas durante seu ciclo, entre elas, a proliferação e a divisão. Essas etapas são cíclicas e se constituem na duplicação do DNA e na correta segregação dos cromossomos homólogos para as células filhas, originadas durante a divisão celular (TARN; LAI, 2011). Assim, o ciclo celular representa uma série de eventos integrados que permitem à célula diferenciar e proliferar (SCHAFER, 1998; SCHWARTZ; SHAH, 2005). Para que este processo ocorra corretamente e o genoma seja mantido várias etapas são necessárias, as quais são controladas por diversas proteínas ao longo do ciclo celular. Alterações nesse conjunto de proteínas podem mudar o fenótipo de uma célula normal para uma tumoral (FERREIRA; ROCHA, 2004).

Nas células eucarióticas, o ciclo celular é complexo, sua duração varia entre os diferentes tipos de células, e este, pode ser dividido em mitose e interfase. A mitose é o processo de divisão nuclear, compreendido das fases prófase, metáfase, anáfase e telófase

(SCHAFFER, 1998; VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003; FERREIRA; ROCHA, 2004; PERES; CURI, 2005), e antecede a divisão da célula em duas (citocinese) e é caracterizada pela progressiva condensação dos cromossomos (PERES; CURI, 2005). A interfase é um período de intenso metabolismo celular, compreendido entre duas mitoses, e pode ser dividido em três fases:  $G_1$  (Gap 1), S (Síntese) e  $G_2$  (Gap 2) (HARTWELL; WEINERT, 1989; SCHAFFER, 1998; VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003; FERREIRA; ROCHA, 2004), (Esquema 7). Durante a fase  $G_1$  ocorre a descondensação dos cromossomos, o núcleo aparece morfológicamente uniforme, a célula está metabolicamente ativa e em um contínuo crescimento, porém não ocorre a duplicação do DNA. Esse é um período caracterizado pela síntese de proteínas e enzimas, imprescindíveis para a fase de duplicação do DNA (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003; FERREIRA; ROCHA, 2004; PERES; CURI, 2005). Geralmente a fase  $G_1$  é a mais longa do ciclo celular, seguida pela fase S, durante a qual ocorre a duplicação do DNA celular, que tem duração até que se complete a duplicação do DNA. Depois desse evento, dá-se início à fase  $G_2$ , que se caracteriza pela diferenciação celular, e pela síntese de proteínas necessárias para que a mitose volte a ocorrer (JOHNSON; WALKER, 1999; VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003; FERREIRA; ROCHA, 2004). Algumas células, totalmente diferenciadas, podem se apresentar em estado de quiescência, ou seja, fora do ciclo celular, na fase  $G_0$  (HARTWELL; WEINERT, 1989; JOHNSON; WALKER, 1999; VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003; TARN; LAI, 2011).



**Esquema 7:** Fases do ciclo celular.



Fonte: Adaptado de VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003.

No Esquema 7, pode-se observar alguns pontos de checagem (*checkpoints*), os quais servem para assegurar o controle do ciclo celular e permitir que o desencadeamento do próximo passo ocorra somente após o término do estágio precedente. Os principais pontos de checagem estão posicionados antes da duplicação do DNA (entre as fases  $G_1$  e S) e depois da replicação (na fase  $G_2$ ). O bloqueio do ciclo celular nesses “pontos de checagem” ocorre em resposta à detecção de um dano ao DNA, para possibilitar o reparo do mesmo. No entanto, nas células neoplásicas, as alterações genéticas nas proteínas que controlam os pontos de checagem tornam a transição para a fase seguinte autônoma, ou seja, menos dependentes de sinais externos e insensíveis a controle interno (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003; FERREIRA; ROCHA, 2004; PERES; CURTI, 2005; SCHWARTZ; SHAH, 2005).

A transição de uma fase do ciclo celular para outra ocorre de maneira ordenada e depende de uma classe especial de enzimas do tipo quinase de serina/treonina, cuja subunidade catalítica é conhecida como quinases dependentes de ciclina (CDK – cyclin-dependent kinase). O

complexo ciclina-CDK regula a atividade de múltiplas proteínas envolvidas na replicação do DNA e na mitose por meio da fosforilação dos sítios específicos, que podem ativar ou inibir as mesmas, e, dessa forma, controlar os eventos do ciclo celular. A concentração das ciclinas pode se alterar com a progressão do ciclo celular, no entanto, as CDKs se mantêm estáveis (JOHNSON; WALKER, 1999; VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003; SCHWARTZ; SHAH, 2005; MALUMBRES; BARBACID, 2009; TARN; LAI, 2011).

Como pode ser observado no Esquema 7, para o início de cada fase do ciclo celular existe a necessidade de ativação de um tipo de complexo ciclina-CDK. Para a entrada na fase  $G_1$ , a ativação das ciclinas do tipo D (ciclina D1, ciclina D2 e ciclina D3) é imprescindível, pois essas ciclinas atuam por meio da formação de complexos com as CDK4 e CDK6. Outra ciclina relacionada à fase  $G_1$  é a ciclina E, que associada a CDK2 regula a progressão da fase  $G_1$  para a fase S. A CDK2 também é ativada pela ciclina A, e o complexo formado por elas é necessário durante a fase S. Ao fim da fase  $G_2$ , o complexo ciclina A-CDK1 promove o início da fase seguinte, a mitose, que por sua vez é regulada pelo complexo ciclina B-CDK1 (JOHNSON; WALKER, 1999; VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003; SCHWARTZ; SHAH, 2005; MALUMBRES; BARBACID, 2009).

Além dos mecanismos de fosforilação e desfosforilação, a atividade das CDKs também é controlada pela sua ligação a proteínas inibitórias do ciclo celular, denominadas proteínas inibitórias de CDKs ou CKIs (CDK inhibitors), as quais atuam sobre uma variedade de complexos ciclina-CDK, ou apenas sobre as CDKs. Foram descritas duas famílias de CKIs, a INK4 e a Cip/Kip. A família INK4 inclui as proteínas p15, p16, p18 e p19, as quais inativam as CDKs da fase  $G_1$  (CDK4 e CDK6) por meio da formação de complexos com essas CDK, impedindo sua ligação com as ciclinas D. A segunda família de inibidores, a família Cip/Kip, inclui as proteínas p21, p27 e p57 (JOHNSON; WALKER, 1999; VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003; SCHWARTZ; SHAH, 2005; ABBAS; DUTTA, 2009), que inativam os complexos ciclina-CDK da fase  $G_1$ , e, em menor, proporção o complexo ciclina B-CDK1, na fase  $G_2$  (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003; ABBAS; DUTTA, 2009). Alterações das CKIs são bem conhecidas em diversos tipos de neoplasias, como, por exemplo, a p16, a qual é silenciada em diversos tipos de tumores, a expressão anormal das proteínas p21 e p27 também são observadas em vários tecidos neoplásicos. Por esse motivo, vários fármacos com função inibitória de CDKs têm sido desenvolvidos,

algun deles com potente atividade antineoplásica (FERREIRA; ROCHA, 2004).

A proliferação celular também está associada à expressão da proteína Ki67. Essa proteína está localizada no núcleo das células em interfase, sobre a superfície dos cromossomos durante a mitose. Está presente em todas as fases ativas do ciclo celular, fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e mitose, no entanto, está ausente na fase G<sub>0</sub>. Embora sua estrutura, localização e regulação ainda não estejam bem descritas, a proteína é utilizada como marcador de proliferação celular, pois está presente em todas as células que se encontram em processo de proliferação (SCHOLZEN; GERDES, 2000).

Como já dito anteriormente, anormalidades envolvendo o ciclo celular estão presentes na maioria das neoplasias (SENDEROWICZ, 2003; MALUMBRES; BARBACID, 2009). Sendo assim, a compressão dos mecanismos moleculares que envolvam o controle dos processos normais de proliferação, diferenciação e morte celular programada, e as causas de alterações nestes processos, direcionam as pesquisas e investimentos na busca por alvos moleculares expressos nos tumores. O desenvolvimento de novos fármacos com capacidade de atingir estes alvos representa uma maneira menos tóxica e potencialmente mais efetiva de tratar pacientes portadores de neoplasias (FERREIRA; ROCHA, 2004).

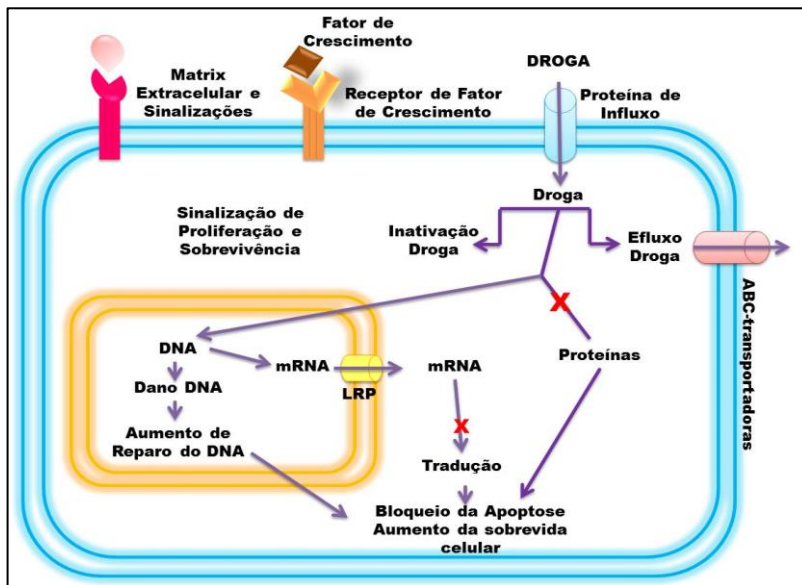
## 2.7 RESISTÊNCIA MÚLTIPLOS FÁRMACOS

A resistência ao tratamento e a morte precoce do paciente, são os principais responsáveis pelo insucesso do tratamento das LAs. Muitos pacientes são resistentes à quimioterapia e, por isso, não atingem a remissão completa ou apresentam recidiva após uma resposta inicial favorável (ESTEY, 2001; SHAFFER et al., 2012).

Vários trabalhos demonstram os mecanismos celulares relacionados com a resistência das células leucêmicas à apoptose induzida por quimioterápicos e/ou outros compostos (ZAMAN et al., 1995; KUO, 2009). Sendo que diferentes mecanismos podem estar envolvidos nesse fenômeno conhecido como resistência a múltiplos fármacos (*Multiple Drug Resistance*, MDR), como pode ser observado no Esquema 8. A MDR pode ser conferida por um ou mais mecanismos de resistência, sendo que dois dos mais importantes são a ativação de mecanismos antiapoptóticos, como a ativação da survivina e Bcl-2, e a

superexpressão de genes *mdr*, como o *abcb1*, o *abccl1* e o *lrp*, os quais codificam proteínas que funcionam como bombas de efluxo de fármacos. Esses mecanismos de resistência podem estar presentes desde o início da doença ou ser induzidos pelo tratamento (NORGAARD; OLESEN; HOKLAND, 2004; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK et al., 2007; CHAUHAN et al., 2012).

**Esquema 8:** Resistência a múltiplos fármacos em células tumorais.



Fonte: Adaptado de RODRIGUES et al., 2012.

De todos os mecanismos de resistência, o envolvimento do transporte de drogas, é provavelmente o mecanismo mais estudado (GOTTESMAN et al., 2002; RAAIJMAKERS, 2007; LAGE, 2008). A MDR está frequentemente associado à expressão de duas famílias de proteínas: a superfamília das proteínas ABC-transportadoras (*ATP-Binding Cassette*) e a família das proteínas MVP (*Human Major Vault Proteins*) (BORST et al., 2000; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK et al., 2007; RODRIGUES et al., 2012). Essas proteínas conferem resistência por estruírem as moléculas citotóxicas, mantendo as concentrações

intracelulares de quimioterápicos abaixo das concentrações desejadas (Esquema 8) (LUQMANI, 2005; LAGE, 2008).

As proteínas ABC-transportadoras são bombas de efluxo de drogas dependentes de ATP, que estão envolvidas nos processos de absorção, distribuição e excreção de vários fármacos. Em humanos já foram descritas 49 proteínas ABC-transportadoras, sendo que os genes dessas proteínas podem ser divididos em 7 subfamílias baseado na sua similaridade estrutural (ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF e ABCG) (DEAN, HAMON, CHIMINI, 2001; LUQMANI, 2005; STEINBACH, LEGRAND, 2007; RAAIJMAKERS, 2007). Estudos *in vitro* demonstram o envolvimento de 18 destas proteínas, no efluxo de quimioterápicos, sendo que apenas 3 destas, tem contribuído significativamente com os mecanismos de MDR no câncer: ABCB1 (*P-Glycoprotein*, MDR1); ABCC1 (*Multidrug Resistance Protein*, MRP1) e mais recentemente ABCG2 (*Breast Cancer Resistance Protein*, BCRP) (BORST, ELFERINK, 2002; LAGE, 2008).

Embora seja conhecida a participação das proteínas ABC-transportadoras na MDR, elas também desempenham papéis fisiológicos importantes, como por exemplo a desintoxicação e proteção do hospedeiro contra xenobióticos (KRISHNA, MAYER, 2000; LESLIE, DEELEY, COLE, 2005; RODRIGUES et al., 2012). Essa proteção pode ser observada pela distribuição das proteínas ABC-transportadoras nos tecidos, onde são altamente expressas e funcionam como barreiras farmacológicas, como, por exemplo, limitando a entrada de xenobióticos na membrana das células intestinais; facilitando a excreção de xenobióticos pela urina na membrana luminal nos túbulos proximais do rim; permitindo a eliminação da bile pela membrana canalicular biliar dos hepatócitos; e protegendo o cérebro através da barreira hematoencefálica. Além disso, tecidos com elevados níveis de proteínas ABC-transportadoras podem ser intrinsecamente resistentes à droga (como carcinoma de cólon, rim, pâncreas e fígado), enquanto tecidos com uma baixa expressão dessas proteínas, podem apresentar um aumento das mesmas somente após o início da quimioterapia, adquirindo, dessa forma a resistência (BOUMENDJEL, BOUTONNAT, ROBERT, 2009; RODRIGUES et al., 2012).

Neste contexto a correlação da expressão das proteínas ABC-transportadoras com o fenômeno MDR vem sendo alvo de estudo de diversos pesquisadores. Esses estudos demonstram que a atividade e a expressão da ABCB1 e ABCC1 representam um fator de risco independente na falha do tratamento quimioterápico (LOURENCO et al., 2008; SHIPLEY, BUTERA, 2009) e um aumento da atividade ou da

expressão tem sido associado a menores taxas de remissão completa e menor sobrevida livre da doença (WOOD et al., 1994; GUERCI et al., 1995; LEITH et al., 1997; KOURTI et al.; 2007).

Além das proteínas ABC-transportadoras, outra família de proteínas tem demonstrado importância no transporte de drogas, a família MVP, que são os componentes predominantes de organelas ribonucleicas denominadas *vaults* (ROME, KEDERSHA, CHUGANO, 1991; SCHEFFER et al., 1995). Dentre os membros dessa família, a proteína LRP (Proteína Associada à Resistência Pulmonar) é a única que já foi relacionada com a MDR (SCHEPER et al., 1993; SCHEFFER et al., 1995; VALERA et al., 2004). A LRP é expressa em uma variedade de tecidos e embora seu papel ainda não esteja completamente elucidado acredita-se que ela esteja envolvida no transporte intracelular de substância para o funcionamento normal da célula, como os hormônios, ribossomos, RNA mensageiro (mRNA), entre outros (LU, SHERVINGTON, 2008; SWERTES et al. 2008; KUO 2009). Embora o mecanismo de ação da LRP na MDR ainda não esteja completamente compreendido, sabe-se apenas que a sua expressão está associada com a resistência intrínseca a vários quimioterápicos, como a doxorubicina, a vincristina, a mitoxantrona, o etoposide e os compostos de platina (SCHEPER et al., 1993; SCHEFFER et al., 1995).

A reversão do fenômeno MDR pode ser realizada com o uso de inibidores da atividade funcional da ABCB1/P-gp e de outras bombas relacionadas. Um fator limitante do uso de reversores do fenômeno de MDR é a alta toxicidade apresentada por esses compostos, devido à necessidade de usar altas doses para potencializar o efeito dos quimioterápicos. Embora outros agentes reversores menos tóxicos e mais potentes tenham sido desenvolvidos, os estudos envolvendo a modulação clínica da MDR ainda não apresentam resultados satisfatórios (AOQUALI et al., 2005). Dessa forma, a investigação de novos compostos reversores da MDR pode abrir novos horizontes no tratamento das leucemias.

Além das alterações no transporte de drogas, outros mecanismos podem estar envolvidos na MDR, como a alteração na regulação da apoptose. Quando os mecanismos que regulam a apoptose são alterados em favor da sobrevivência das células, eles contribuem para o seu desenvolvimento e persistência do câncer (LODISH et al., 2000; LUQMANI, 2005; RODRIGUES et al., 2012).

Como visto anteriormente, a família de proteínas Bcl-2 está envolvida na regulação do processo apoptótico, e é composta por proteínas com funções oposta, ou seja, enquanto algumas são pró-

apoptóticas outras são antiapoptóticas. O desequilíbrio entre as proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas, por exemplo Bcl-2 e Bax, leva à resistência ou a sensibilização à estímulos de morte, como os quimioterápicos. Em geral, em células tumorais, esse desequilíbrio é em favor da superexpressão de Bcl-2, com conseqüente inibição da apoptose e resistência ao tratamento. Nesse contexto, estudos demonstram que a superexpressão de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-xl, também tem sido associada à MDR e ao pior prognóstico em pacientes portadores de tumores hematológicos e sólidos (SUAREZ et al., 2001; RED, 2008; YIP, REED, 2008; RODRIGUES et al., 2012).

Outra família de proteínas apoptóticas envolvidas na MDR são as IAPs, como já descrito anteriormente, as IAPs são proteínas inibitórias da apoptose, elas atuam inibindo a ação da caspase iniciadora -9 e das caspases efetoras -3 e -7 (KAUFMANN, VAUX, 2003; KUMAR et al., 2004; ZAFFARONI et al., 2005; ANGUIANO-HERNANDEZ, CHARTIER, HUERTA, 2007; HUNTER et al., 2007; FULDA, 2008; LACASSE et al., 2008; FULDA, 2009). O principal membro dessa família é a survivina, que é superexpressa na maioria das neoplasias humanas e também está envolvida na resistência ao tratamento, estando assim, associada a um pior prognóstico (ZAFFARONI et al., 2005; HUNTER et al., 2007; FULDA, 2009). De acordo com a literatura, a diminuição da expressão dessa proteína está relacionada à indução da célula tumoral à apoptose e à uma melhor resposta ao tratamento (HARIKUMAR et al., 2009).

Considerando a importância da regulação das proteínas envolvidas na MDR para o tratamento quimioterápico (RODRIGUES et al., 2012) vários moduladores/inibidores estão sendo testados em ensaios clínicos, sendo desta forma, considerado como uma importante área de desenvolvimento de medicamentos (REED, 2006; LABI et al., 2008; PAOLUZZI et al., 2008a; PAOLUZZI et al., 2008b; WARR, SHORE, 2008; KANG, REYNOLDS, 2009).





## CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

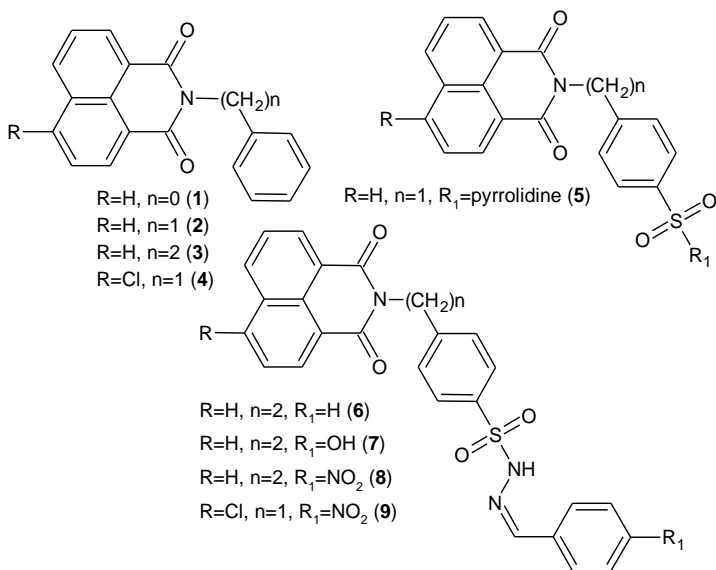
### 3.1 REAGENTES

As células de melanoma murino (B16F10), de leucemia mieloide aguda humana (K562) e de leucemia linfóide aguda humana (Jurkat), foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC), EUA. Os meios de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, a penicilina, a estreptomicina, o ácido N-[2-Hidroxi-etil] piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (Hepes), o soro fetal bovino, EDTA, tris e tripsina, foram adquiridos da Gibco, *Invitrogen Corporation*, Brasil. A guanidina foi adquirida da Roche, Brasil. O brometo tiazolil azul de tetrazólio (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) MTT, o Ficoll-Hypaque (densidade 1.077 g/m<sup>3</sup>), o laranja de acridina, o brometo de etídio, o silano (3-Aminopropyl)triethoxy-silane) e a albumina bovina foram adquiridos da Sigma-Aldrich, EUA. O dimetilsulfóxido (DMSO), o ácido clorídrico PA, a acetona PA e o álcool etílico 96% foram adquiridos da Merck, Alemanha. O álcool metílico PA e o peróxido de hidrogênio PA foram adquiridos da Dinâmica Química Contemporânea LTDA, Brasil. O xilol PA foi adquirido da Proquímios, Brasil, o tampão fosfato (PBS), da Laborclin, Brasil, e o Trinton® X-100, da Amresco, EUA. A Hematoxilina de Harris e o meio de montagem sintético foram adquiridos da *Easy-Path*, Brasil. O “*BD Cytofix/Cytoperm kit*”, utilizado para fixação e permeabilização celular nos experimentos com citometria de fluxo e o anticorpo monoclonal anti-caspase-3 ativa, conjugado a FITC foram adquiridos da *BD Biosciences*, EUA. O “*PI/RNASE Solution kit*” com a solução de Iodeto de Propídeo (PI), o ribonuclease (RNase), o “*Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit*” e o anticorpo monoclonal anti-p53 conjugado ao PE foram adquiridos da *Immunostep*, Salamanca, Espanha. O anticorpo monoclonal anti-Bax conjugado ao PerCP, o anticorpo camundongo-anti AIF, o anticorpo policlonal anti-survivina e o anticorpo monoclonal anti-FasR conjugado ao PE, foram adquiridos Santa Cruz *Biotechnology*, EUA. O anticorpo monoclonal anti-Bcl-2 conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), anticorpo Alexa 488, o Qubit™ Quantitation Platform, o β-mercaptopetanol e os *primers abcc1* e *gapdh* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foram adquiridos da *Invitrogen*, EUA. O anticorpo monoclonal anti-Ki67 e o kit de solução cromógena DAB (3,3'-diaminobenzidina-DAB) utilizado na imunocitoquímica foram adquiridos da *Biocare Medical*, EUA. O

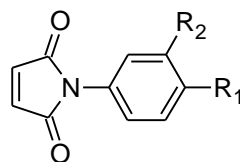
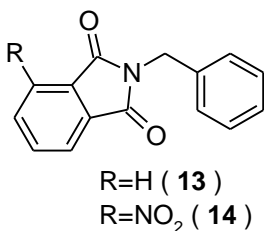
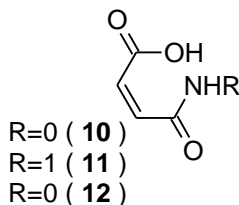
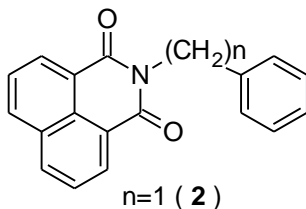
anticorpo monoclonal anti-FasR conjugado a PE foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology®, EUA. O anticorpo monoclonal anti-ABCC1, foi adquirido da Becton Dickinson Pharmingen, USA. O anticorpo monoclonal anti-LRP, foi adquirido da Millipore, França. O “*kit LSAB + System-HRP*” de anticorpo secundário utilizado na imunocitoquímica foi adquirido da Dako, USA e o “*kit MitoView 633*” para avaliação do potencial mitocondrial foi adquirido da Biotium, EUA. O QIAamp RNA Blood Mini Kit (kit de extração de RNA) foi adquirido da QIAGEN, USA.

Os derivados de imidas cíclicas (Esquemas 9 e 10) foram sintetizadas pela pós-doutoranda Kely Navakoskide Oliveira, durante o seu doutorado, quando foi orientada pelo Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes e pelo Prof. Dr. Ricardo José Nunes do Laboratório Estrutura e Atividade do Departamento de Química da UFSC.

**Esquema 9:** Estrutura molecular dos derivados de imidas cíclicas testados na primeira etapa do estudo.



**Esquema 10:** Estrutura molecular dos derivados de imidas cíclicas testados na segunda etapa do estudo.



### 3.2 CULTURA CELULAR

Foram utilizadas as células de linhagem de melanoma murino (B16F10), de leucemia mieloide aguda humana (K562) e de leucemia linfóide aguda humana (Jurkat). As células foram mantidas em garrafas plásticas, para cultura celular contendo meio de cultura DMEM para as B16F10 e RPMI 1640 para as K562 e Jurkat, ambos suplementados com 10% de soro fetal, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10 mM de tampão HEPES, pH 7,4, em estufa úmida a 37°C, com 5% CO<sub>2</sub>. As células foram semeadas a uma densidade de 1,0 x 10<sup>6</sup> células/garrafa e repicadas a cada 48 a 72 h, em fluxo laminar. Para a retirada das células aderidas (B16F10) foi utilizada uma solução de tripsina a 0,25%.

### 3.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

#### 3.3.1 Preparo das células de cultura celular: B16F10, K562 e Jurkat.

Para a realização dos experimentos as suspensões celulares foram centrifugadas a 200 x g, por 10 minutos, em temperatura ambiente, a retirada das células aderidas (B16F10) foi realizada com auxílio de uma solução de tripsina a 0,25%. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspenso em 1,0 mL de meio de cultura (DMEM ou RPMI 1640). O número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan (0,5%) e as amostras com viabilidade celular inferior a 90% foram excluídas. A quantidade de células viáveis adicionadas às placas de cultura variou conforme protocolo experimental, mantendo a relação de  $5 \times 10^4$  células/mL para as células B16F10, de  $2,5 \times 10^5$  células/mL para as células K562 e de  $5,0 \times 10^5$  células/mL para as células Jurkat, para o tempo de tratamento de 24 h. Para o tratamento por 48 e 72 h, foram utilizadas  $2,5 \times 10^4$  células/mL e  $1,25 \times 10^4$  células/mL, respectivamente para as células B16F10,  $1,25 \times 10^5$  células/mL e  $0,62 \times 10^5$  células/mL, respectivamente para as células K562, e  $2,5 \times 10^5$  células/mL e  $1,25 \times 10^5$  células/mL, respectivamente para as células Jurkat. Todos os procedimentos foram realizados em fluxo laminar e todo material utilizado foi previamente esterilizado.

#### 3.3.2 Preparo das células mononucleadas de indivíduos saudáveis

Amostras de sangue periférico de seis indivíduos saudáveis foram colhidas com anticoagulante EDTA por punção venosa e processadas em até 30 minutos após a coleta. Previamente à coleta das amostras, foi obtida a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme o Comitê de Ética de Pesquisa em Seres humanos da UFSC (CEPSH n°913/2013).

As amostras foram diluídas em PBS numa proporção de 1 mL de amostra para 0,5 mL de PBS. Após a diluição, cada amostra foi colocada sobre 4 mL de Ficoll-Hypaque e centrifugada a 300 x g por 30 minutos. A interfase contendo as células mononucleadas foi transferida para um tubo cônico de 15 mL, ressuspenso em 10 mL de tampão PBS e centrifugada a 200 x g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram novamente lavadas com

PBS e centrifugadas. Ao fim da última lavagem, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 e o número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan (0,5%). A cada poço da placa de cultura celular foram adicionadas  $8,0 \times 10^3$  células/ 200  $\mu$ L de meio. Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar e todo material utilizado foi previamente esterilizado.

### 3.4 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM OS DERIVADOS DE IMIDAS CÍCLICAS

Os derivados de imidas cíclicas foram dissolvidos em DMSO na concentração de 10 mM, alicotadas e armazenadas a 4°C. Para a utilização nos experimentos, foram utilizadas soluções preparadas a partir dessa solução estoque e diluídas em meio de cultura, a cada experimento uma nova alíquota foi utilizada, sendo esta, desprezada posteriormente. Nos ensaios, a concentração das imidas variou de 0,1 a 100  $\mu$ M, não ultrapassando a concentração de 2% (v/v) para o DMSO. A concentração total de 100  $\mu$ M foi escolhida como concentração máxima, porque altas doses não são desejáveis, devido a sua provável toxicidade (COSTANZA et al., 1995; HU et al., 2007).

O tratamento das células B16F10, K562, Jurkat e mononucleares de indivíduos saudáveis, foi realizado pela adição dos derivados de imidas cíclicas às mesmas, em um volume máximo de 10% do volume da suspensão celular, adicionadas aos poços da placa de cultura. As células B16F10 foram plaqueadas 24 horas antes da adição dos derivados de imidas cíclicas, para que a adesão das mesmas ocorra na placa de cultura. Todas as células foram mantidas em estufa nas condições descritas anteriormente, por períodos que variaram conforme cada protocolo experimental. Em todos os experimentos foram utilizados dois controles, um de células sem tratamento, e outro acrescido de 2% do solvente (DMSO) ao meio de cultura.

### 3.5 VIABILIDADE CELULAR (MÉTODO DE MTT)

O efeito citotóxico dos derivados de imidas cíclicas sobre as células de melanoma murino B16F10, de linhagem leucemia aguda humana K562 e Jurkat e sobre as células mononucleares de sangue periférico de indivíduos saudáveis, foi avaliado pelo método do MTT. Esse método consiste em um ensaio colorimétrico, que se baseia na redução do MTT ao seu derivado formazan de cor azulada pelo metabolismo mitocondrial (VAN DE LOOSDRECHT et al., 1991).

Após o tempo de incubação de cada experimento, as placas foram centrifugadas, o sobrenadante removido e adicionado o meio de cultura contendo 10% (v/v) de uma solução de MTT (5 mg/ml em PBS). Após 3 h de incubação a 37°C, as placas foram novamente centrifugadas e o sobrenadante removido. Os precipitados formados em cada poço foram dissolvidos em 100 µL de solução de álcool isopropílico/HCL 0,04 N e as placas foram submetidas a uma nova centrifugação, para a remoção dos restos celulares. O sobrenadante límpido foi transferido para outra placa, onde foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro Microwell Systems (Organon Teknika, Belgium) no comprimento de onda 540 nm. A densidade óptica do grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como equivalente a 100% de células viáveis. Desse modo, quanto maior o número de células viáveis presentes, maior a oxidação do MTT.

### 3.5.1 O efeito citotóxico dos derivados de imidas cíclicas sobre as células de melanoma murino (B16F10)

O efeito citotóxico dos derivados de imidas cíclicas sobre as células de melanoma murino (B16F10) foi avaliado através de curvas concentração-resposta, onde as células foram incubadas com os derivados de imidas cíclicas em concentrações crescentes (0,1, 1, 10 e 100µM), em estufa úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 h, após esse período as CI<sub>50</sub> foram calculadas, utilizando-se o *software GraphPad Prism 5*. O composto que apresentou a maior redução da viabilidade celular foi selecionado e avaliado em diferentes tempos, 48 e 72 h, as CI<sub>50</sub> também foram calculadas a partir destas curvas.

### 3.5.2 O efeito citotóxico dos derivados de imidas cíclicas sobre as células de leucemias agudas humanas (K562 e Jurkat)

Inicialmente, realizou-se uma triagem para avaliar o efeito citotóxico dos derivados de imidas cíclicas sobre as células de leucemia mieloide aguda humana (K562). As células foram incubadas com os derivados de imidas cíclicas (100 µM) em estufa úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 h e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Ao composto que demonstrou maior redução da viabilidade celular no ensaio de triagem, foi proposto modificações estruturais

gerando cinco novas imidas cíclicas, estas seis imidas cíclicas e o controle positivo Taxol foram incubadas em concentrações crescentes (0,1, 1, 10 e 100 $\mu$ M), em estufa úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24, 48 e 72 h de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. As CI<sub>50</sub> foram obtidas a partir de curvas concentração-resposta em 24, 48 e 72 h, utilizando-se o *software GraphPad Prism 5*.

### 3.5.3 O efeito citotóxico dos derivados de imidas cíclicas em células mononucleadas de indivíduos saudáveis

Logo após serem plaqueadas as células mononucleadas de indivíduos saudáveis foram incubadas com os derivados de imidas cíclicas (100  $\mu$ M) em estufa úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 h e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT.

## 3.6 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

Para avaliar os efeitos dos derivados de imidas cíclicas nas fases do ciclo celular foi utilizado o *PI/RNASE Solution kit*, cujo princípio consiste na coloração dos ácidos nucleicos pelo iodeto de propídio (PI), após a digestão do RNA. O PI, dependendo da fase do ciclo celular, emite diferentes intensidades de fluorescência que, por sua vez, são captadas pelos detectores fotomultiplicadores do citômetro de fluxo, por variações no seu conteúdo de DNA, e, dessa forma, quantifica a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular (GONG et al., 1994).

Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. As células B16F10, K562 e Jurkat (1,0 x 10<sup>6</sup> células/poço) foram tratadas com as imidas nas suas CI<sub>50</sub> de 24 h, e incubadas durante 24 h em estufa úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS, submetidas à centrifugação a 200 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as células foram fixadas com 200 mL de etanol 70% e incubadas durante 30 minutos a -4°C. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes em PBS contendo 2% de albumina bovina e centrifugadas a 200 x g durante 10 minutos. Adicionou-se ao sedimento celular 500 mL de solução de PI contendo RNase e as células foram incubadas durante 15 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD

*FACSCanto*<sup>TM</sup> (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software WinMID* versão 2.8. O controle negativo foi preparado com células sem tratamento para caracterização dos parâmetros a serem analisados no citômetro de fluxo.

### 3.7 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE

Para avaliar a indução de morte celular por apoptose causada pelos derivados de imidas cíclicas, foram utilizados os seguintes métodos: microscopia de fluorescência com brometo de etídio e laranja de acridina, anexina V-FITC e fragmentação de DNA.

#### 3.7.1 Avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência com brometo de etídio e laranja de acridina

Para a avaliação das células apoptóticas por microscopia de fluorescência, foram utilizados os corantes fluorescentes laranja de acridina e brometo de etídio. O laranja de acridina é permeável à membrana intacta e confere fluorescência verde às células quando observadas ao microscópio de fluorescência; enquanto que o brometo de etídio é permeável à membrana somente quando a integridade da mesma está alterada, conferindo fluorescência vermelha ao núcleo das células (RENVOIZÉ et al., 1998).

As células B16F10, K562 e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram tratadas por 24 h com os derivados de imidas cíclicas, nas suas  $CI_{50}$  de 24 h. Para as células B16F10 (aderidas), foram utilizadas lamínulas removíveis na placa, as quais foram retiradas após o tratamento, lavadas com PBS e colocadas sobre uma lâmina de vidro, o sobrenadante foi coletado, e as células presentes neste, lavadas com PBS, o sedimento celular foi ressuscitado com 40  $\mu$ L de uma solução constituída de brometo de etídio (5  $\mu$ g/mL) e laranja de acridina (10  $\mu$ g/mL) na proporção 1:1. Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, 25  $\mu$ L da suspensão celular foi adicionada sobre a lâmina (contendo a lamínula com as células aderidas) e recoberta por uma nova lamínula. Para as células K562 e Jurkat, o sobrenadante foi coletado e as células, presentes neste, processadas da mesma forma, sendo transferida para uma lâmina de vidro e recoberta com lamínula. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência Olympus BX-FLA), usando objetiva de 40x. Campos representativos foram fotografados



com câmera fotográfica (Olympus BX40, Japan). As imagens foram avaliadas pelo programa de análise digital (NIH *ImageJ 1.40 software*, *National Institute of Health website*).

### 3.7.2 Avaliação da apoptose pelo método anexina V-FITC

Durante o estágio inicial da apoptose ocorre a perda da assimetria da membrana citoplasmática, com a consequente externalização dos resíduos de fosfatidilserina. A anexina V possui a propriedade de ligar-se especificamente aos resíduos de fosfatidilserina e quando conjugada ao FITC, permite identificar e quantificar as células que expõem esses resíduos por citometria de fluxo (ENGELAND et al., 1998).

Para a quantificação dos resíduos de fosfatidilserina, após o tratamento das células B16F10, K562 e Jurkat, com os derivados de imidas cíclicas nas suas  $CI_{50}$  de 24 h, utilizou-se o *Annexin V- FITC Apoptosis Detection kit*. Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. As células B16F10, K562 e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram tratadas com os derivados de imidas cíclicas e incubadas, durante 12 h para as células B16F10 e 16 h para as células K562 e Jurkat, em estufa úmida a 37°C com 5% de  $CO_2$ . Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com tampão PBS e submetidas à centrifugação a 200 x g, por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e ao sedimento celular, foram adicionados 100 mL de tampão de anexina na diluição 1:10. Em seguida, foram acrescentados 5 mL de anexina V-FITC em cada tubo contendo a suspensão celular. Depois, a suspensão de células com anexina V-FITC foi mantida ao abrigo da luz durante 15 minutos em temperatura ambiente. Transcorrido o tempo, foram adicionados 400 mL do tampão de anexina (1:10) para posterior análise. O controle negativo dos experimentos foi preparado com as células sem tratamento, a fim de definir uma quantificação basal de marcação com anexina V-FITC. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD *FACSCanto*<sup>TM</sup> (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelos *software WinMID* versão 2.8 e *Infinicyt* versão 1.6.

### 3.7.3 Análise da Fragmentação do DNA

Durante o processo apoptótico ocorre a degradação intersomal do DNA, que pode ser observada após eletroforese do DNA em gel, onde pode-se verificar padrão característico “em escada” opondo-se ao arrastado visto na necrose. Isso se deve ao fato de que as quebras no DNA ocorrem entre os nucleossomas, formando fragmentos múltiplos de 200 pares de bases, e que a membrana plasmática não se rompe, prevenindo a liberação de componentes celulares para o meio extracelular (KERR et al., 1995, KROEMER et al., 2005).

A fragmentação de DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. As células K562 e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram tratadas com os derivados de imidas cíclicas nas suas  $CI_{50}$  de 24 h. Após 24 horas estas foram transferidas para um tubo contendo 1 mL de solução de guanidina 5M, para a extração do DNA (LIEPPKE et al., 1987). Os tubos contendo solução de guanidina 5M e as células foram submetidos à agitação contínua *overnight* em mesa agitadora orbital, à temperatura ambiente (20 a 25°C), para lise das membranas celulares. Após a lise, foram adicionados 50 µL de solução de dióxido de sílica acidificada. A mistura foi homogeneizada por inversão durante 5 minutos e, após, submetida à centrifugação a  $1.600 \times g/1$  minuto. O sedimento foi lavado 2 vezes com 500 µL de solução de lavagem de guanidina 5M (isotiocianato de guanidina 5M: Tris pH 6,4 0,1M), 2 vezes com 500 µL de etanol 70% (p/p) e 1 vez com 500 µL de acetona P.A. O sedimento foi submetido à secagem a 56°C/10 minutos em termobloco e re-hidratado com 35 µL de tampão Tris-EDTA pH 7,4 (Tris pH 6,4 0,1M: EDTA pH 8,0 0,2M) a 56°C/10 minutos. Após centrifugação de  $10.000 \times g/5$  minutos, o sobrenadante foi transferido para um microtubo livre de RNase e DNase. A fragmentação do DNA foi analisada após eletroforese em gel de agarose 2%, corada com brometo de etídeo. A corrida eletroforética foi realizada a 80V por 50 minutos em tampão TAE 1x (tris-ácido acético-EDTA). Os géis foram fotografados sob iluminação ultravioleta de 320 nm (HOEFER-Macro Vue UV20) utilizando-se um sistema de foto-documentação de géis (Doc-Print®-Biosystems).

### 3.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL

Para avaliar os efeitos dos derivados de imidas cíclicas sobre o potencial mitocondrial das células K562 e Jurkat foi utilizado o kit *MitoView* 633. Segundo o fabricante, o *MitoView* 633 é um corante fluorescente mitocondrial de coloração vermelha que se difunde através da membrana plasmática e se acumula na mitocôndria em concentrações nanomolares. As mitocôndrias com atividade fisiológica normal do potencial mitocondrial são coradas com o *MitoView* 633 e fluorescem após o acúmulo do corante no ambiente de lipídios das mitocôndrias. Quando há uma diminuição no potencial mitocondrial, as mitocôndrias perdem essa fluorescência.

Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. As células K562 e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram tratadas com os derivados de imidas cíclicas nas suas  $CI_{50}$  de 24 h, e incubadas durante 12 h em estufa úmida a  $37^\circ C$  com 5% de  $CO_2$ . Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS, submetidas à centrifugação a  $200 \times g$  por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados sobre o sedimento celular 100  $\mu L$  da solução de *MitoView* 633 diluído 1:10.000. As células foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Após esse período, as células foram centrifugadas a  $200 \times g$  por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 1 mL de PBS. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD *FACSCanto*<sup>TM</sup> (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.6. O controle negativo foi preparado com células sem tratamento para caracterização dos parâmetros a serem analisados no citômetro de fluxo.

### 3.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS AIF, Bcl-2, Bax, FasR, Caspase-3 ATIVA, p53, ABCC1 E LRP POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para estudar a expressão das proteínas AIF, Bcl-2, Bax, FasR, Caspase-3 ativa, p53, ABCC1 e LRP as células K562 e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram tratadas com os derivados de imidas cíclicas nas suas  $CI_{50}$  de 24 h, e incubadas em diferentes tempos (3, 6, 9, 12 ou 24 h) em estufa úmida a  $37^\circ C$  com 5% de  $CO_2$ . Para a fixação e permeabilização das células foi utilizado o kit BD *Cytofix/Cytoperm* (exceto para o FasR). Após os períodos de incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS, submetidas à centrifugação a  $200 \times g$  por

10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Ao sedimento celular foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  do reagente BD *Fix/Perm* e as amostras foram incubadas a 8°C por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 200 x g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento celular foi ressuspendido com 100  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem *Fix/Perm*. Foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  do anticorpo monoclonal anti-AIF, 3  $\mu\text{L}$  do anticorpo monoclonal anti-Bcl-2-FITC, 5  $\mu\text{L}$  do anticorpo monoclonal anti-Bax-PerCP, 5  $\mu\text{L}$  do anticorpo monoclonal anti-FasR-PE, 5  $\mu\text{L}$  do anticorpo monoclonal anti-caspase-3 ativa-FITC, 5  $\mu\text{L}$  do anticorpo monoclonal anti-p53 -PE, 5  $\mu\text{L}$  do anticorpo monoclonal anti-ABCC1 e 5  $\mu\text{L}$  do anticorpo monoclonal anti-LRP, as amostras foram incubadas a 8°C por 15 minutos no escuro. Após a incubação, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  do tampão de lavagem, e as amostras foram centrifugadas a 200 x g por 10 minutos. Para as amostras contendo o anti-AIF, o anti-ABCC1 e o anti-LRP adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de Alexa 488 (previamente diluído) e as amostras foram novamente incubadas a 8°C por 15 minutos no escuro. Após esta nova incubação, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  do tampão de lavagem, e as amostras foram centrifugadas a 200 x g por 10 minutos. Ao término das lavagens adicionou-se 1 mL de PBS ao sedimento celular para a posterior análise no citômetro de fluxo BD *FACSCanto*<sup>TM</sup> (Becton Dickinson Immunocytometry Systems). A avaliação dos resultados foi realizada pelo *software Infinicyt* versão 1.6. O controle negativo foi preparado com células sem tratamento com as imidas.

### 3.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS SURVIVINA E KI67 POR IMUNOCITOQUÍMICA

Para estudar a expressão das proteínas survivina e Ki67 foi empregado a técnica de imunocitoquímica, utilizando-se o método estreptoavidina-biotina-peroxidase (*labelled streptavidin biotin - LSAB*). As células K562 (1,0 x 10<sup>5</sup> células/poço) e Jurkat (2,0 x 10<sup>5</sup> células/poço) foram tratadas com os derivados de imidas cíclicas nas suas CI<sub>50</sub> de 24 h, e incubadas durante 24 h em estufa úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas em citocentrífuga (*CYTOPRO*<sup>TM</sup> - Wescor) em lâminas pré-tratadas com solução de silano a 5% em acetona PA. Em seguida, as células foram fixadas em etanol 95% por 1 hora à temperatura ambiente. Após a fixação, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS por 5 minutos e realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena, para evitar

reações inespecíficas falso-positivas, com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol absoluto por 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS por 5 minutos, e submetidas à permeabilização celular com solução de Triton X-100-PBS 0,2%. O anticorpo monoclonal antisurvivina, diluído a 1:50, e o anticorpo monoclonal anti-Ki67, diluído a 1:100 foram adicionados sobre as células nas lâminas, e as mesmas foram mantidas em câmara úmida a 8°C por 12 h. Após esse período, as lâminas foram lavadas duas vezes com tampão PBS e incubadas com anticorpo secundário biotilado do kit *LSAB + System-HRP* por 30 minutos. Logo após esta etapa, as lâminas foram novamente lavadas com PBS e incubadas com estreptavidina conjugada à peroxidase do kit *LSAB + System-HRP* por 40 minutos. Posteriormente às duas lavagens com PBS, as amostras foram submetidas à revelação colorimétrica com uma solução cromógena DAB, conforme recomendação do fabricante. Após a revelação, foi realizada a contracoloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris, desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol, diafanização em xilol e montagem em meio de montagem sintético. Utilizou-se, como controles positivos, tecidos sabidamente positivos para os antígenos pesquisados (carcinoma de mama para a proteína survivina e linfonodo para a proteína Ki67), e o controle negativo foi realizado sem adição do anticorpo primário nas reações. O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha no local da marcação pelo anticorpo. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio ótico NIKON ECLIPSE 50i acoplado a câmera NIKON DIGITAL SIGHT DS-5M e o programa NIS ELEMENTS F, VERSION 2.10, em aumento de 400X. As imagens foram avaliadas pelo programa de análise digital (NIH *ImageJ* 1.40 *software*, National Institute of Health website).

### 3.11 ENSAIO SEMI-QUANTITATIVO DA TRANSCRIPTASE REVERSA-REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR)

Para estudar a expressão do gene *abcc1*, as células K562 e Jurkat ( $3 \times 10^6$  células/poço) foram tratadas com os derivados de ímidas cíclicas nas suas  $CI_{50}$  de 24 h, e incubadas durante 6 h em estufa úmida a 37°C com 5% de  $CO_2$ . Células sem tratamento foram usadas para controle da reação.

### 3.11.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído utilizando-se o *QIAamp RNA Blood Mini Kit* para tanto, após a incubação, as células (K562 e Jurkat) foram lavadas três vezes com tampão PBS. O procedimento para extração do RNA total foi realizado conforme instruções do fabricante. Brevemente, as células foram lisadas utilizando-se 600  $\mu\text{L}$  de tampão de lise, fornecido pelo *kit*, e  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1%. O lisado de células foi transferido para a coluna *QIAshredder* e centrifugado a 10.000 g por 2 minutos. A coluna foi descartada e ao filtrado foram adicionados 600  $\mu\text{L}$  de etanol 70%. Todo o lisado foi transferido para uma coluna *QIAamp* e submetido a uma nova centrifugação de 10.000 g por 15 segundos. A coluna *QIAamp* foi lavada duas vezes com tampão de lavagem, também fornecido pelo *kit*. Após a lavagem, foram adicionados à coluna 50  $\mu\text{L}$  de água livre de RNases (fornecida pelo *kit*) e esta foi submetida a uma última centrifugação a 10.000 g por 1 minuto. O filtrado contendo o RNA total foi armazenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para ser posteriormente utilizado para a síntese de cDNA.

### 3.11.2 Síntese de DNA complementar

A quantificação do RNA total foi realizada por fluorimetria utilizando-se o *Qubit™ Quantitation Platform* (Invitrogen) e a sua qualidade foi avaliada pela visualização das bandas de RNA ribossomal (RNAr) em eletroforese em gel de agarose 2%. Foram consideradas apenas as amostras de boa qualidade, ou seja, aquelas que não apresentavam rastro abaixo das bandas de RNAr e cuja a banda referente ao RNAr 28S apresentava o dobro da intensidade da banda do rRNA 18S.

Para a síntese do cDNA, de 1  $\mu\text{g}$  a 5  $\mu\text{g}$  de RNA total foram adicionados em microtubos de 0,2 mL. O possível DNA contaminante nas amostras foi eliminado por digestão com DNase. Para tanto, adicionou-se ao RNA total 1  $\mu\text{L}$  de DNase (1 U/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de tampão de reação e água tratada com dietil pirocarbonato (água-DEPC) até o volume para 10  $\mu\text{L}$ . Após digestão de 15 minutos a temperatura ambiente, a DNase foi inativada por 1  $\mu\text{L}$  de EDTA (25 mM) e incubação de 10 minutos a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Após a inativação da DNase, as amostras foram submetidas a uma incubação de 5 minutos a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguida de uma incubação em gelo por 5 minutos. Após a incubação em gelo, a cada tubo de amostra foram adicionados 15  $\mu\text{L}$  de solução *mix* contendo: 5  $\mu\text{L}$  de tampão *5x first*

*strand* (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 2 µL de DTT (0,1M), 2 µL de *random hexamers* (100 ng/µL), 0,4 µL de dNTP *mix* (100 mM cada), 0,5 µL de RNase (40 U/µL), 0,5 µL de transcriptase reversa (200 U/µL) e água-DPEC q.s.p. para 15 µL. As amostras foram levadas ao termociclador (Mastercycler Personal, Eppendorf) e submetidas à seguinte programação: 25 °C por 5 minutos, 37 °C por 60 minutos e 90 °C por 5 minutos. Ao fim da programação, as amostras foram incubadas em gelo por 5 minutos. As amostras de cDNA foram dosados por fluorimetria utilizando-se o *Qubit™ Quantitation Platform* e armazenados em freezer a menos 20 °C para serem posteriormente utilizados nos ensaios de detecção da transcrição dos genes de resistência e na pesquisa da presença de translocações cromossômicas.

### 3.11.3 Detecção da transcrição gênica de *abcc1* por transcrição reversa

A avaliação de transcrição gênica das proteínas de resistência foi realizada utilizando-se a técnica de RT-PCR semiquantitativa.

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* (Quadro 1) utilizados para avaliar a transcrição de *abcc1* foram previamente descritos por Valera et al. (2004) e a transcrição de *gapdh* foi utilizada para a normalização das bandas.

**Quadro 1:** Sequência dos primers para a detecção de *abcc1*.

Gene	Sequência	Tamanho do produto
<i>abcc1</i>	sense: 5'' – TGGGACTGGAATGTCACG – 3'' antisense: 5'' – AGGAATATGCCCCGACTTC – 3''	260 pb
<i>gapdh</i>	sense: 5'' – CGTCTTCACCACC ATGGAGAA – 3'' antisense: 5'' – GAGGCAGGGATGATGTTCTG – 3''	330 pb

pb – Pares de base. Adaptado de: VALERA et al., 2004.

Todas as reações foram preparadas com um volume final de 50 µL. As reações de PCR com os *primers* para *abcc1* e *gapdh*, foram realizadas nas seguintes condições: 1 µg de cDNA, 5 µL de tampão 10X concentrado para Taq DNA polimerase (20 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,4 µL de dNTP *mix* (100 mM de cada), 1 µL de *primer sense* e *antisense* (10 µM cada), 0,4 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e água ultra-pura q.s.p para 50µL.

As amostras foram inicialmente desnaturadas a 94 °C por 5 minutos e, depois, submetidas às condições de reação ideal para cada par de *primers*, conforme Quadro 2. Ao fim dos ciclos da PCR, foi realizada uma extensão final 72 °C por 10 minutos. As condições ideais de reação e o número de ciclos utilizados foram estabelecidos em ensaios prévios realizados no Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) de forma que a PCR terminasse na fase exponencial da amplificação.

**Quadro 2:** Condições de reação para a detecção de *abcc1*.

<b>Primer</b>	<b>Desnaturação</b>	<b>Pareamento</b>	<b>Extensão</b>	<b>Ciclos</b>
<i>abcc1</i>	94°C/1 min	60°C/1 min	72°C/1 min	30
<i>gapdh</i>	94°C/30 seg	60°C/30 seg	72°C/30 seg	25

Os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% a 100 volts por 30 minutos e corados com brometo de etídio. As bandas foram visualizadas em transiluminador (HOEFER-MacroVue UV-20) sob luz UV de 320 nm e fotografadas com o sistema de foto-documentação de géis (*DOC-PRINT*<sup>®</sup>, Biosystems). O tamanho dos fragmentos foi estimado, por comparação, com o marcador de tamanho molecular 50 pb.

A intensidade média de cada banda foi avaliada pelo programa de análise digital (NIH *ImageJ* 1.40 *software*, *National Institute of Health website*). A intensidade das bandas do gene *abcc1* foi dividida pela intensidade do gene normalizador *gapdh*. Os resultados foram relatados na forma de transcrição relativa.

### 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram expressos como a média ± erro padrão da média (EPM). Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes. A análise estatística foi realizada utilizando-se a análise de variância de uma e duas vias (ANOVA), seguida pelo teste “*t*” de Bonferroni. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativo.

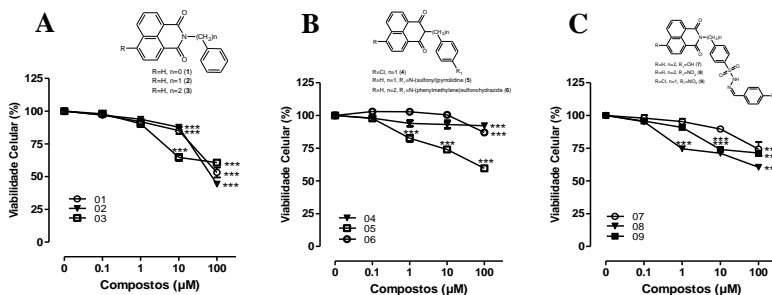


# CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO – MECANISMOS DE APOPTOSE EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO (B16F10)

## 4.1 EFEITO CITOTÓXICO DOS DERIVADOS DE IMIDAS CÍCLICAS SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10

Inicialmente o efeito citotóxico de diferentes derivados de imidas cíclicas foi avaliado em células de melanoma murino B16F10 pelo ensaio de viabilidade celular MTT (VAN DE LOOSDRECHT, et al., 1991), por 24 horas nas concentrações de 0,1 a 100  $\mu\text{M}$ , como pode ser observado na Figura 1.

**Figura 1:** Efeito citotóxico de derivados de imidas cíclicas 1-9 em células de melanoma murino B16F10.



As imidas cíclicas na concentração de 0,1 a 100  $\mu\text{M}$  foram incubadas com as células de melanoma murino B16F10 por 24 h. A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de MTT. A densidade óptica do grupo controle (célula sem tratamento) corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \*\*\* $p < 0,001$ , ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.

Após a incubação das células B16F10 por 24 horas, com os compostos, em concentrações crescentes (0,1 - 100  $\mu\text{M}$ ), foi possível determinar a  $\text{CI}_{50}$  (Concentração Inibitória 50%) para quatro imidas cíclicas (1 – 4), uma sulfonamida (5) e quatro sulfonil-hidrazonas (6 – 9), como pode ser observado na Tabela 1, onde também se observa que o único composto que apresentou valores de  $\text{CI}_{50}$  inferior a 100  $\mu\text{M}$  foi o composto 2, os compostos 1, 3, 6 e 8 apresentaram valores de  $\text{CI}_{50}$  que

variaram entre 100 e 200 $\mu$ M e os compostos **4** e **5** apresentaram valores de  $CI_{50}$  superior a 300 $\mu$ M.

Como pode ser observado, o composto **2** reduziu significativamente a viabilidade celular de maneira concentração-dependente, quando comparado ao grupo controle (células não tratadas), com  $CI_{50}$  de  $77,75 \pm 1.3 \mu$ M (Figura 1, Tabela 1).

**Tabela 1:** Valores da  $CI_{50}$  para os derivados de imidas cíclicas (1 – 9), em células B16F10.

Compostos	$CI_{50}$ ( $\mu$ M)
<b>1</b>	103,90 ( $\pm$ 2,8)
<b>2</b>	77,75 ( $\pm$ 1,3)
<b>3</b>	108,20 ( $\pm$ 8,2)
<b>4</b>	>300
<b>5</b>	>300
<b>6</b>	116,40 ( $\pm$ 7,3)
<b>7</b>	271,00 ( $\pm$ 7,3)
<b>8</b>	115,00 ( $\pm$ 9,4)
<b>9</b>	201,70( $\pm$ 12.1)

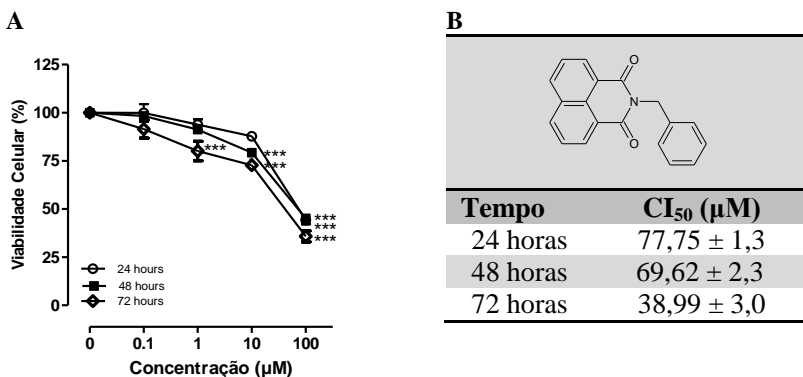
Vários estudos demonstraram que compostos derivados de imidas cíclicas apresentam atividade antitumoral (LOH; COSBY; SARTORELLI, 1980; FURNEL et al., 2002; KENDALL et al., 2007). Cechinel Filho e colaboradores (1994) sugerem que a atividade citotóxica das imidas cíclicas possa ser atribuída a natureza hidrofóbica (anel imídico) destes compostos e ao seu potencial eletricamente neutro, o que facilita a penetração dos compostos através da membrana celular (LOH; COSBY; SARTORELLI, 1980). Outros estudos relataram que os efeitos citotóxicos de compostos derivados de imidas cíclicas, possam estar relacionados com o tamanho e com as características dos grupamentos substituintes do anel imídico, e que estes grupamentos substituintes poderiam modificar as propriedades eletrônicas e estéricas dos compostos, alterando assim, a sua atividade citotóxica (CECHINEL-FILHO et al., 2003; PRADO et al., 2004). Os resultados encontrados neste trabalho corroboram essas teorias, pois apesar de todos os compostos causarem alguma redução na viabilidade celular, observou-se que a inserção de substituintes mais volumosos (benzenossulfonil cloreto, benzenesulfonohidrazide) diminuíram a atividade citotóxica dos derivados de imidas cíclicas, sugerindo a influência de parâmetros estéricos. Por exemplo, os compostos **1**, **2** e **3**, que não possuem esses substituintes mais volumosos, foram os que

demonstraram menores valores de  $CI_{50}$ , observa-se, também, que a inserção do grupamento cloro no anel imídico (composto **4**), diminuiu significativamente a sua atividade quando comparada com os compostos **1**, **2** e **3**, sugerindo a influência de parâmetros eletrônicos. Estes resultados poderiam ser mais bem explicados em um estudo mais aprofundado de relação estrutura atividade.

#### 4.2 EFEITO CITOTÓXICO DO COMPOSTO **2** SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10

Os mecanismos envolvidos na atividade antitumoral das imidas cíclicas ainda não foram bem definidos e precisam ser elucidados. Assim, com o objetivo de se obter o melhor entendimento destes mecanismos, o composto **2** foi selecionado para avaliação do seu efeito na proliferação, no ciclo e na morte celular. Inicialmente foi avaliado a citotoxicidade do composto **2** em diferentes concentrações (0,1 - 100  $\mu$ M), e em diferentes tempos (24, 48 e 72 horas).

**Figura 2:** Efeito citotóxico do composto **2** em células de melanoma murino B16F10.



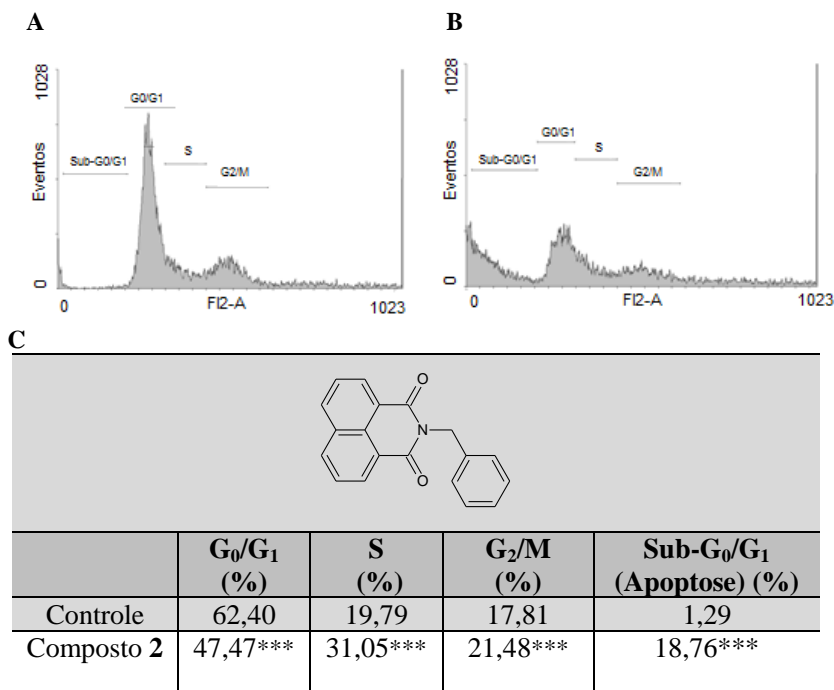
As células B16-F10 foram incubadas na presença e ausência de diferentes concentrações do composto **2** (0,1 - 100  $\mu$ M), e em diferentes tempos (24, 48 e 72h) (Painel A), para o cálculo da  $CI_{50}$  (Painel B). A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de MTT. A densidade óptica do grupo controle (célula sem tratamento) corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \* $p < 0,001$ , ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.

Como pode ser observado na Figura 2, o composto **2** apresentou efeito citotóxico de maneira concentração e tempo dependente, apresentando valores de  $CI_{50}$  de  $77,75 \pm 1,3 \mu\text{M}$ ,  $69,62 \pm 2,3 \mu\text{M}$  e  $38,99 \pm 3,0 \mu\text{M}$  para 24 horas, 48 horas e 72 horas, respectivamente. Esses resultados de  $CI_{50}$  foram considerados promissores e estão de acordo com os trabalhos anteriormente citados, que relatam atividade citotóxica para compostos derivados de imidas cíclicas (LOH; COSBY; SARTORELLI, 1980; CECHINEL-FILHO et al., 1984; FOURNEL et al., 2002; CECHINEL-FILHO et al., 2003; KENDALL et al., 2007), entretanto, mais estudos são necessários para avaliar o efeito do composto **2** na progressão e morte celular.

#### 4.3 EFEITO DA IMIDA CÍCLICA **2** SOBRE AS FASES DO CICLO CELULAR NAS CÉLULAS DE MELANOMA B16F10

Para avaliar o efeito composto **2** na progressão do ciclo celular, as células B16F10 foram tratadas com o composto **2**, na sua  $CI_{50}$  de 24 horas ( $77,75 \mu\text{M}$ ), e incubadas durante 24 horas em estufa úmida a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ . A análise das fases do ciclo celular foi realizada pela avaliação do conteúdo de DNA, por citometria de fluxo, utilizando o *PI/RNASE Solution kit*, cujo princípio consiste na coloração dos ácidos nucléicos pelo iodeto de propídio, após a digestão do RNA (Figura 3, Painel A e B). Os dados da Figura 3 (Painel C) foram obtidos pela separação das fases do ciclo celular em fase  $G_0/G_1$ , fase S e fase  $G_2/M$ , além da fase sub- $G_0/G_1$ , que caracteriza as células que não estão mais viáveis. Em comparação com o grupo controle (sem tratamento), observa-se que as células tratadas com o composto **2** apresentaram aumento significativo de células na fase sub- $G_0/G_1$  (18,76%), fase S (31,05%) e fase  $G_2/M$  (21,8%) acompanhado por uma significativa diminuição das células na fase  $G_0/G_1$  (47,47%) (Figura 3).

**Figura 3:** Análise do efeito do composto **2**, no ciclo celular de células de melanoma murino (B16-F10).



As células B16-F10 foram incubadas na presença e ausência de 77,75  $\mu\text{M}$  do composto **2** e a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi analisada pelo conteúdo de DNA. Paineis A-B: Representação das fases do ciclo celular, figura representativa de 3 experimentos independentes. Painel A: Grupo controle (células sem tratamento) Painel B: Células tratadas por 24 horas na presença do composto **2**. Painel C: Média  $\pm$  SEM de três experimentos independente, diferença estatisticamente significativa do grupo controle, \*\*\* $p < 0.001$ , usando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.

Diversos estudos demonstram que desordens no ciclo celular podem estar associadas com o desenvolvimento de diferentes tipos de tumores, e, que o entendimento dos mecanismos celulares envolvidos nessas desordens pode ser fundamental para o desenvolvimento de fármacos eficazes no tratamento do câncer. O ciclo celular é controlado nos denominados “pontos de checagem”, os quais permitem o desencadeamento do próximo passo somente após o término do estágio

precedente (PERES; CURI, 2005). O bloqueio do ciclo celular nesses “pontos de checagem” em resposta à detecção de um dano ao DNA leva à ativação de uma série de mecanismos de reparação do DNA para que o ciclo celular prossiga (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003; MALUMBRES; BARBACID, 2009). Após a identificação de algum dano no genoma celular, a célula possui três caminhos a seguir: reparo do dano, entrar em apoptose ou morrer por necrose. Se o dano for extenso, se a concentração de ATP for insuficiente ou se ocorrer a inativação das caspases, a apoptose torna-se impossibilitada e a célula morre por necrose. Se o dano for moderado, a célula poderá ativar a proteína p53 e reparar o dano ou induzir a apoptose. Em algumas situações, a célula pode iniciar o processo de apoptose, e com o consumo de ATP e inativação das caspases, entrar em processo de necrose (LEIST; NICOTERA, 1997; VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

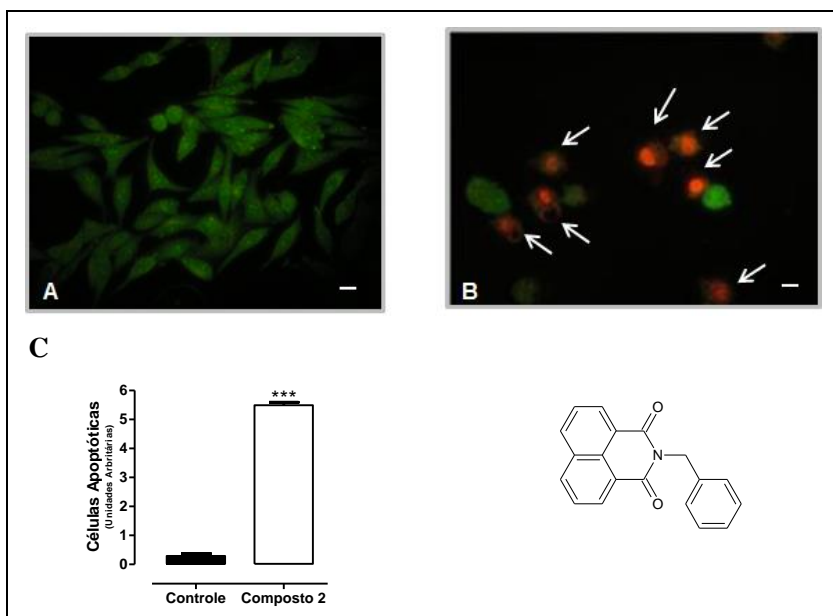
Nossos resultados até aqui mostram que o composto **2** causa morte celular de forma concentração e tempo dependentes (Figura 2), por bloqueio nas fases S e G<sub>2</sub>/M do ciclo celular (Figura 3). Sendo assim, o próximo foco de investigação foi avaliar a via de morte celular envolvida.

#### 4.4 EFEITO DA IMIDA CÍCLICA **2** NA INDUÇÃO DA APOPTOSE NAS CÉLULAS DE MELANOMA B16F10

Para analisar a via de morte, induzida nas células B16F10 pelo composto **2**, foram utilizadas duas metodologias: brometo de etídio e laranja de acridina e anexina V-FITC. No método do brometo de etídio e laranja de acridina as células viáveis apresentam uma fluorescência verde (corante laranja de acridina) e as células apoptóticas apresentam uma coloração alaranjada (corante brometo de etídio), quando observadas em microscópio de fluorescência. Isto se deve ao fato de que o laranja de acridina é um corante permeável à membrana intacta, enquanto que o brometo de etídio é permeável somente à membrana que possui sua integridade alterada, intercalando-se, assim, com o DNA. A fluorescência do brometo de etídio predomina sobre a fluorescência do laranja de acridina, assim, as células viáveis apresentam fluorescência verde, as células em apoptose inicial apresentam núcleo com fluorescência verde e cromatina condensada ou fragmentada, as células em apoptose tardia apresentam núcleo com fluorescência laranja e cromatina condensada ou fragmentada, e as células necróticas

apresentam fluorescência laranja uniforme (RENVOIZÉ et al., 1998). Como pode-se observar na Figura 4, após a incubação do composto **2** (77,75  $\mu\text{M}$ ) com as células B16F10 por 24 horas houve um aumento significativo de células nas fases iniciais de apoptose, as quais ainda possuem membrana intacta e núcleo corado em verde. Entretanto algumas células parecem estar em fases tardia de apoptose, pois apresentam cromatina condensada e áreas alaranjadas no núcleo; deferentes daquelas observadas no grupo controle que apresentam fluorescência verde.

**Figura 4:** Análise da apoptose, causada pelo composto **2**, em células de melanoma (B16-F10), através da microscopia de fluorescência.

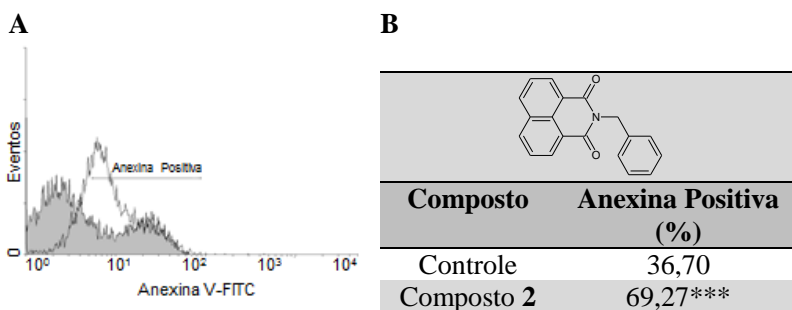


Painel A: Grupo controle (células sem tratamento). Painel B: Células B16F10 tratadas 24 horas na presença do composto **2** (77,75  $\mu\text{M}$ ). Painel C: Os resultados representam a análise das imagens expressos através da média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes. A apoptose foi determinada pelo ensaio de brometo de etídio e laranja de acridina através da microscopia de fluorescência. A análise foi realizada através do *software* ImageJ, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \*\*\* $p < 0,001$ , utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni. A barra representa 20  $\mu\text{m}$  e o aumento utilizado foi de 400X. Figura representativa de 3 experimentos independentes.

A análise da apoptose também foi realizada pelo ensaio de Anexina V-FITC. Esse ensaio baseia-se na propriedade da fosfatidilserina, que normalmente está presente na camada interna da membrana plasmática, ser externalizada para fora da membrana durante o estágio inicial da apoptose, promovendo assim, a perda da assimetria da membrana plasmática. A anexina V possui a propriedade de ligar-se especificamente aos resíduos de fosfatidilserina e quando conjugada ao FITC, permite identificar e quantificar as células que expõem esses resíduos, por citometria de fluxo (ENGELAND et al., 1998).

Como pode ser observado na Figura 5, após a incubação do composto **2** (77,75  $\mu\text{M}$ ) com as células B16F10 por 12 horas, houve um aumento significativo da expressão de anexina V nas células B16F10 (69,27%) quando comparado com o grupo controle (36,70 %), o que sugere que a morte celular causada pelo Composto **2** ocorre pela indução da apoptose. Esses resultados confirmam que as células B16F10 observadas na fase sub- $G_0/G_1$  são apoptóticas (Figura 3) e são compatíveis com os resultados obtidos no ensaio de MTT (Figura 2) e com o ensaio de brometo de etídio e laranja de acridina (Figura 4).

**Figura 5:** Análise da apoptose causada pela imida cíclica **2**, em células de melanoma murino (B16-F10), por citometria de fluxo.



As células B16F10 foram tratadas, por 12 horas, na ausência e na presença da imida cíclica **2** (77,75  $\mu\text{M}$ ) (Painel A). Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes (Painel B). O controle está representado em cinza e as imidas cíclicas em branco. A apoptose foi determinada pelo ensaio de anexina V-FITC por citometria de fluxo. Figura representativa de 3 experimentos independentes. \*\*\* $p < 0.001$  comparado com o grupo controle, usando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.



Os efeitos biológicos observados até aqui sugerem promissoras aplicações para os derivados de imida cíclica, em especial para o composto **2** (2-benzil-1H-benzo [de] isoquinolina-1,3 (2H)-dione), no entanto, mais estudos serão necessários para determinar o mecanismo de bloqueio do ciclo celular e os mecanismos de apoptose induzidos pelos derivados de imidas cíclicas, para a continuidade desses estudos outras linhagens celulares serão utilizadas.



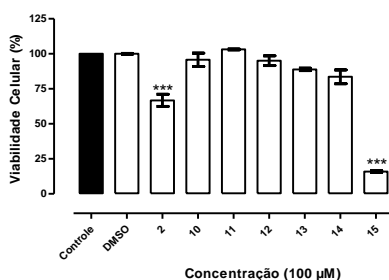
## CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO – MECANISMOS DE APOPTOSE EM CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (K562) E EM CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (JURKAT)

### 5.1 EFEITO CITOTÓXICO DOS DERIVADOS DE IMIDAS CÍCLICAS SOBRE CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E EM CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT

Considerando que os resultados do composto **2** (2-benzil-1H-benzo [de] isoquinolina-1,3 (2H)-dione) em relação ao seu efeito citotóxico contra as células de linhagem de melanoma murino (B16F10) foram satisfatórios, foi proposto uma nova alteração estrutural em outros derivados das imidas cíclicas com a finalidade de se obter novos compostos com  $CI_{50\%}$  mais baixas, o que originou seis novos derivados (Esquema 9). No entanto, nessa segunda etapa para avaliar o efeito citotóxico desses compostos foram selecionadas duas linhagens de células tumorais de origem humana, a K562 (Leucemia Mieloblástica Aguda) e a Jurkat (Leucemia Linfoblástica Aguda).

Dessa forma, uma nova triagem para avaliar a citotoxicidade foi realizada com o composto **2**, juntamente com seis novos derivados (**10**, **11**, **12**, **13**, **14**, **15**) em células K562.

**Figura 6:** Efeito citotóxico dos compostos derivados de imidas cíclicas **2**, **10**, **11**, **12**, **13**, **14** e **15** sobre células de leucemia mieloide aguda (K562).



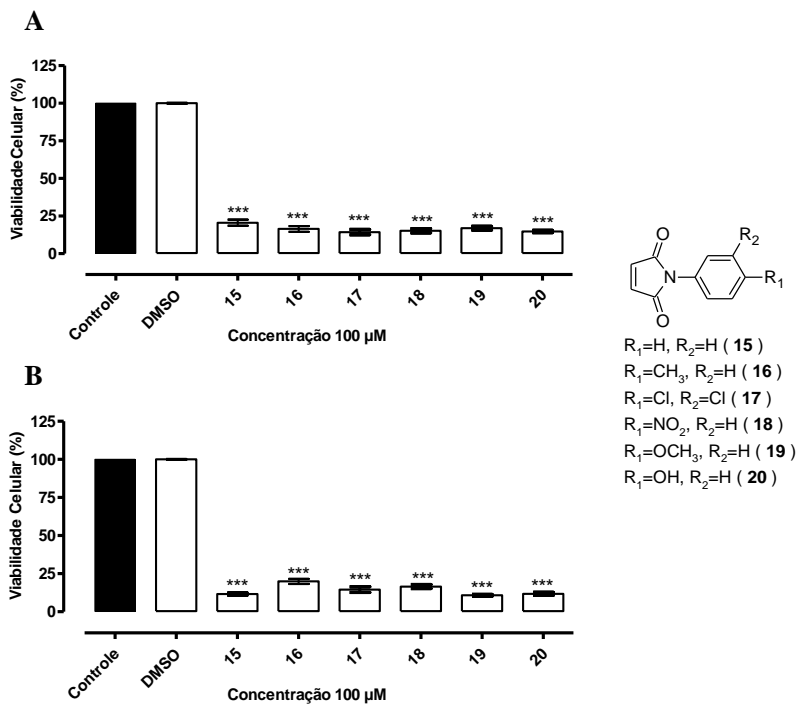
Os compostos **2**, **10**, **11**, **12**, **13**, **14** e **15** (100 µM) foram incubados com as células por 24 horas. A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de MTT. A densidade óptica do grupo controle (célula sem tratamento) corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \*\*\* $p < 0,001$ , utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.

Como pode ser observado na Figura 6, após a incubação das células K562 com os compostos (**2**, **10**, **11**, **12**, **13**, **14** e **15**) na concentração de 100  $\mu$ M por 24 horas, somente os compostos **2** e **15** demonstraram redução estatisticamente significativa de células viáveis, quando comparados ao controle (células não tratadas) e ao DMSO (controle do solvente). Desses, o composto **15** (1-fenil-1H-pirrol-2,5-diona) foi o mais citotóxico ( $15,97 \pm 1,02$  % de células vivas), por esse motivo, foi selecionado para dar continuidade dos estudos.

Como já mencionado anteriormente, estudos relatam que o efeito citotóxico de imidas cíclicas está relacionado com o tamanho e as características dos grupos substituintes do anel imídico, que podem modificar as suas propriedades eletrônicas e estéricas, alterando assim, a sua atividade potencial (CECHINELFILHO et al., 1994). Nesse sentido, na busca por compostos que fossem bioativos em concentrações mais baixas (menor  $CI_{50}$ ) modificações estruturais foram realizadas no composto mais ativo (composto **15**) com a inserção de diferentes substituintes no anel aromático, o que originou cinco novos compostos: composto **16** - (4-metilfenil)-1H-pirrol-2,5-diona; composto **17** (1 - (3,4 diclorofenil)-1H-pirrol-2,5-diona); composto **18** (1 - (4 -nitrofenil)-1H-pirrol-2,5-diona); composto **19** (1 - (4-metoxifenil)-1H-pirrol-2,5-diona) e composto **20** (1 - (4-hidroxifenil)-1H-pirrol-2,5-diona).

Um nova triagem para avaliar a citotoxicidade desses novos compostos foi realizada utilizando-se as células K562 e Jurkat, nas mesmas condições citadas anteriormente. Como pode ser observado na Figura 7 houve uma redução significativa da viabilidade celular para ambas as células tratadas com todos os compostos, quando comparado ao grupo controle (células não tratadas) e ao DMSO (controle de solvente). A partir desses resultados, foi investigado o efeito citotóxico dos compostos em diferentes concentrações e tempos em ambas às células, K562 e Jurkat.

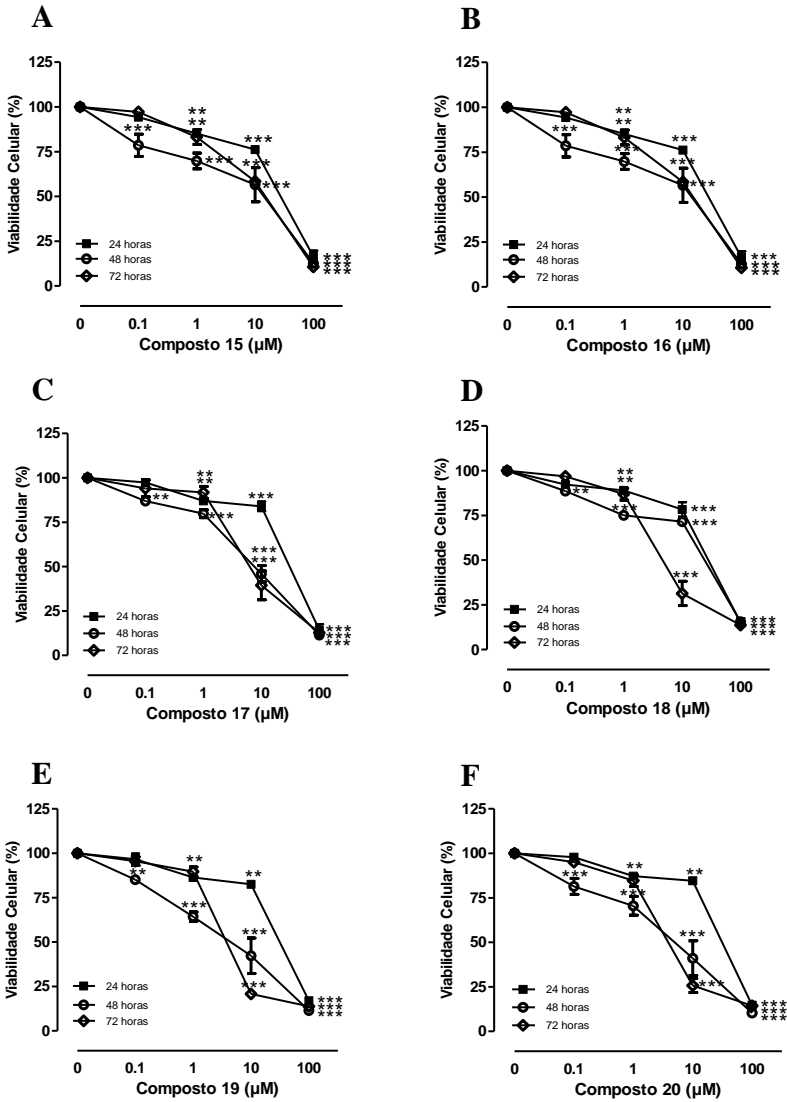
**Figura 7:** Efeitos citotóxicos dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** sobre células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfóide aguda (Jurkat).



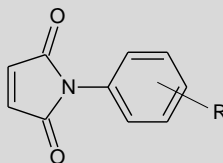
Os compostos **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** (100  $\mu$ M) foram incubados com as células K562, (Painel A) e Jurkat (Painel B), por 24 horas. A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de MTT. A densidade óptica do grupo controle (célula sem tratamento) corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \*\*\* $p < 0,001$ , utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.

Como pode ser observado na Figura 8 os derivados de imidas cíclicas (compostos **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**) em diferentes concentrações (0,1-100  $\mu$ M), e em tempos diferentes (24, 48 e 72 horas), causaram morte das células K562 de maneira concentração e tempo-dependente, quando comparado ao controle (células não tratadas).

**Figura 8:** Efeito citotóxico dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** sobre células de leucemia mieloide aguda (K562).



## G



Compostos	R	CI <sub>50</sub> (μM) de 24 horas	CI <sub>50</sub> (μM) de 48 horas	CI <sub>50</sub> (μM) de 72 horas
15	4-H	29,88 ± 0,82	10,63 ± 1,12	8,68 ± 0,52
16	4-Me	24,99 ± 1,39	6,61 ± 1,38	12,10 ± 0,66
17	3,4-Cl <sub>2</sub>	29,81 ± 1,43	6,88 ± 0,59	7,38 ± 0,73
18	4-NO <sub>2</sub>	26,29 ± 1,28	16,71 ± 1,94	5,32 ± 0,56
19	4-OMe	30,42 ± 1,46	3,70 ± 0,93	4,13 ± 0,48
20	4-OH	30,62 ± 1,46	4,00 ± 0,91	4,28 ± 0,50
Taxol	-	9,06 ± 1,17	1,67 ± 0,28	1,46 ± 1,01

Os compostos **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**, nas concentrações de 0,1 a 100 μM foram incubadas com as células K562 por 24, 48 e 72 horas (Painéis A, B, C, D, E e F, respectivamente), para o cálculo das CI<sub>50</sub> (Painel G). A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de MTT. A densidade óptica do grupo controle (célula sem tratamento) corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média ± EPM de três experimentos independentes. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \*\**p*<0,01 e \*\*\**p*<0,001, utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.

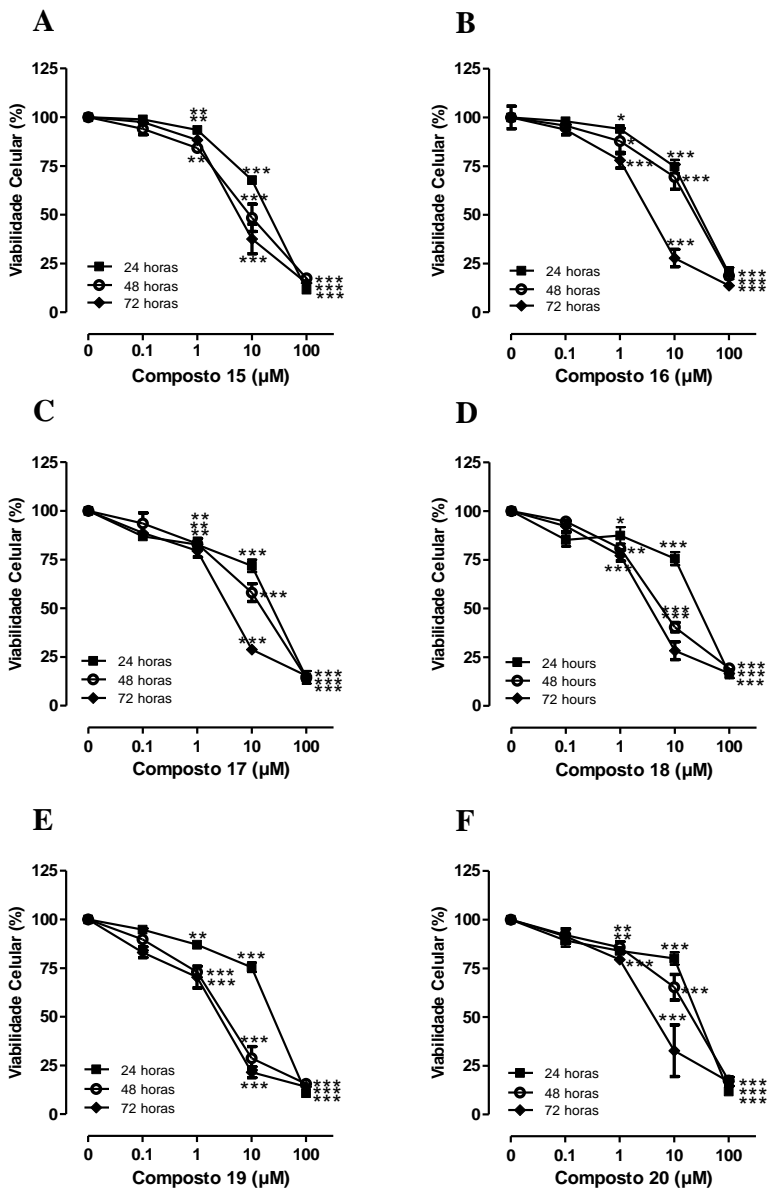
As CI<sub>50</sub> foram calculadas para os diferentes tempos (Figura 8, Painel G). Os valores de CI<sub>50</sub> variaram entre 24,99 (±1,39) e 30,62 (±1,46) para 24 horas; entre 6,61 (±1,38) e 16,71 (±1,94) para 48 horas e entre 4,13 (±0,48) e 12,10 (±0,60) para 72 horas. Os compostos **19** e **20** foram os que demonstraram maior efeito citotóxico (menor CI<sub>50</sub>). Quando esses valores foram comparados ao controle positivo, Taxol, quimioterápico utilizado na clínica para o tratamento diversos tipos de câncer, observou-se que as CI<sub>50</sub> de alguns compostos como o **19** e **20** foram semelhantes ao Taxol (Painel G), o que sugere um bom potencial citotóxico para esses compostos.

As células Jurkat também foram incubadas com os diferentes derivados de imidas cíclicas (compostos **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**), em diferentes concentrações (0,1-100  $\mu\text{M}$ ) e diferentes tempos (24, 48 e 72 horas). Como pode ser observado na Figura 9, todos os compostos reduziram a viabilidade celular de maneira concentração e tempo-dependente, quando comparados ao controle (células não tratados). As  $\text{CI}_{50}$  foram calculadas (Painel G) e os valores encontrados variaram entre 18,41 ( $\pm 0,43$ ) e 27,16 ( $\pm 1,35$ ) para 24 horas, entre 3,54 ( $\pm 0,09$ ) e 17,74 ( $\pm 0,09$ ) para 48 horas e entre 2,40 ( $\pm 0,64$ ) e 6,85 ( $\pm 0,61$ ) para 72 horas. Quando esses valores foram comparados ao controle positivo (Taxol), observou-se que a  $\text{CI}_{50}$  do composto **19** para 48 e 72 h, foi semelhante ao Taxol, o que sugere um bom potencial citotóxico para esse composto.

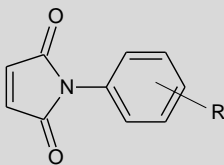
Observando as estruturas analisadas pode-se sugerir que as diferentes substituições eletrônicas no composto **15**, não provocaram alterações na resposta biológica, como pode ser observado nas Figuras 8 e 9, sugerindo que o anel imídico seja de fundamental importância para a resposta biológica. Resultados semelhantes foram observados em um trabalho realizado por Yunes e colaboradores (2008), no qual correlacionam a atividade citotóxica de uma série de imidas cíclicas com a presença do anel imídico diretamente ligado a um anel aromático. Entretanto, para explicar melhor os resultados aqui apresentados seria necessário um estudo sobre a estabilidade dos compostos (**15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**), pois segundo Sortino e colaboradores (2008) o anel imídico das maleimidias em meio aquoso pode sofrer hidrólise a ácido maleânico. Esse fator deve ser considerado, pois o meio de cultura (RPMI) utilizado nos experimentos é uma solução aquosa.



**Figura 9:** Efeito citotóxico dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**, sobre células de leucemia linfóide aguda (Jurkat).



## G



Compostos	R	CI <sub>50</sub> (μM) de 24 horas	CI <sub>50</sub> (μM) de 48 horas	CI <sub>50</sub> (μM) de 72 horas
15	4-H	18,41 ± 0,43	9,69 ± 0,07	6,85 ± 0,61
16	4-Me	27,16 ± 1,35	15,51 ± 0,07	3,94 ± 0,48
17	3,4-Cl <sub>2</sub>	19,96 ± 1,69	12,41 ± 0,08	4,18 ± 0,52
18	4-NO <sub>2</sub>	24,81 ± 1,85	7,15 ± 0,05	4,05 ± 0,54
19	4-OMe	22,06 ± 1,10	3,54 ± 0,09	2,40 ± 0,64
20	4-OH	25,35 ± 1,78	17,74 ± 0,09	4,96 ± 0,97
Taxol	-	8,23 ± 1,12	2,59 ± 0,35	0,17 ± 0,04

Os compostos **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**, na concentração de (0,1 - 100 μM), foram incubadas com as células Jurkat por 24, 48 e 72 horas, (Painéis A, B, C, D, E e F, respectivamente), para o cálculo das CI<sub>50</sub> (Painel G). A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de MTT. A densidade óptica do grupo controle (célula sem tratamento) corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média ± EPM de três experimentos independentes. \*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \* $p < 0,5$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.

Quando comparados os valores das CI<sub>50</sub> dos derivados de imidas cíclicas, obtidas com as duas linhagens celulares (K562 e Jurkat), observa-se que apesar dos compostos terem demonstrado bons resultados para ambas as linhagens, de maneira geral, as células Jurkat foram mais sensíveis aos efeitos citotóxicos das imidas cíclicas testadas do que as células K562 (Figuras 8 e 9, Painéis G). Acredita-se que essa diferença encontrada, entre os valores de CI<sub>50</sub>, possa ser atribuída às diferenças entre as linhagens celulares e as particularidades de cada subtipo de leucemia aguda. A linhagem K562 é uma linhagem de LMA secundária a uma leucemia mieloide crônica, que na experiência clínica esse tipo de leucemia tende a ser mais agressivo e menos responsivo ao

tratamento do que os demais subtipos de leucemias agudas (LAs), assim como o da linhagem Jurkat, que é uma LLA de células T (LARSON, 2007; SEKERES et al., 2009).

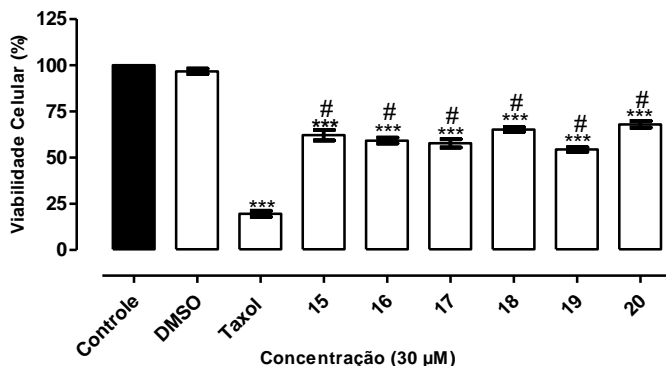
Esses resultados corroboram com alguns trabalhos, que demonstram o efeito citotóxico de alguns derivados de imidas cíclicas e seu potencial uso na terapia antitumoral, como por exemplo, os compostos mitonafida e amonafida que apresentaram atividade citotóxica pela intercalação no DNA (QUAQUEBEKE et al., 2007; ANTONINI et al., 2008; OTTO et al., 2008; OTTO et al., 2009; WU et al., 2009; CHEN et al., 2010; MUKHERJEE et al., 2010; LI et al., 2011; OTTO et al., 2011), essa atividade citotóxica pode ser observada em células de linhagem de câncer de pulmão (QUAQUEBEKE et al., 2007; WU et al., 2009; LI et al., 2011), de adenocarcinoma de próstata (QUAQUEBEKE et al., 2007; WU et al., 2009) e de diferentes tipos de leucemia (QUAQUEBEKE et al., 2007; WU et al., 2009; MUKHERJEE et al., 2010), no entanto, esses compostos ainda se encontram em estudos na fase clínica.

## 5.2 EFEITO CITOTÓXICO DOS COMPOSTOS **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

O efeito citotóxico dos compostos derivados de imidas cíclicas (**15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**) e do controle positivo (Taxol) também foram avaliados em mononucleares humanos, e apesar de todos os compostos apresentarem uma redução significativa na viabilidade celular, quando comparados ao controle (células não tratadas), observa-se que os compostos **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**, demonstraram citotoxicidade significativamente menor quando comparados com o controle positivo (Taxol) (Figura 10). Esses resultados foram considerados promissores, pois sugerem uma possível seletividade dos compostos (**15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**) para células tumorais, a qual seria importante na diminuição dos efeitos adversos, causados pela citotoxicidade inespecífica dos quimioterápicos em uso no mercado, visto que a maioria dos quimioterápicos disponíveis atualmente, ao destruírem células tumorais, também causam lesões às células saudáveis vizinhas. Esse mecanismo é responsável pela maioria dos processos inflamatórios e autoimunes envolvidos nos tratamentos antileucêmicos, como, por exemplo, supressão da medula óssea, toxicidades gastrointestinais e perda de cabelo. Assim, uma maior seletividade do composto implica diretamente

na diminuição da morbidade e mortalidade sofrida pelos pacientes portadores de LAs (MILLIGAN et al., 2005).

**Figura 10:** Efeito citotóxico dos compostos derivados imidas cíclicas **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**, sobre células mononucleares de indivíduos saudáveis.



Os compostos **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** foram adicionadas às células mononucleares de indivíduos saudáveis e incubadas por 24 horas. A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de MTT. A densidade óptica do grupo controle (célula sem tratamento) corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \*\*\*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $p < 0,001$ , ANOVA seguida de teste  $t$  de Bonferroni. #Diferença estatisticamente significativa em relação ao Taxol,  $p < 0,001$ , utilizando ANOVA *one way* e post teste  $t$  de Bonferroni.

Embora diversos estudos utilizem esta metodologia para analisar a especificidade dos compostos estudados em células tumorais, e dessa forma, prever possíveis efeitos adversos, como citado acima, acreditamos que estudos *in vivo* devam ser realizados para que se possa concluir algo a respeito da especificidade de ação das imidas sobre as células tumorais, pois as condições *in vitro* são diferentes daquelas observadas *in vivo*.

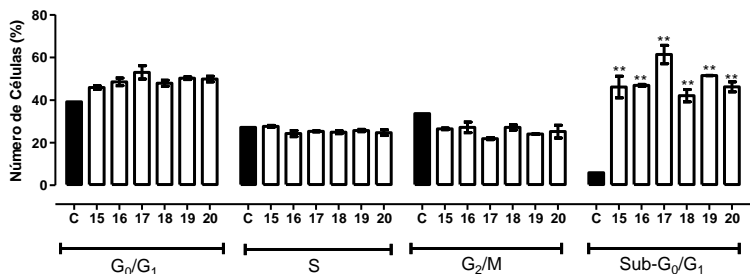
### 5.3 EFEITO DOS COMPOSTOS **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** SOBRE AS FASES DO CICLO CELULAR NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E EM CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT

As respostas celulares para os danos ao DNA, aos quais as células estão constantemente sujeitas, envolvem diferentes mecanismos de reparo relacionados à interrupção da progressão do ciclo celular ou à indução da morte celular programada (RING et al., 2012). Apesar de não estar claro na literatura como o bloqueio do ciclo celular ou a indução à apoptose se relacionam ao processo de reparo ao DNA, estes dois fatores são altamente desejados na investigação de novos compostos (KASTAN e BARTEK, 2004; ABBAS, DUTTA, 2009). Considerando que estudos demonstram que diversos compostos derivados de imidas, como o mitonafida e amonafida, apresentam atividade citotóxica pela intercalação no DNA (QUAQUEBEKE et al., 2007; ANTONINI et al., 2008; OTTO et al., 2008; OTTO et al., 2009; WU et al., 2009; CHEN et al., 2010; MUKHERJEE et al., 2010; LI et al., 2011; OTTO et al., 2011), e para compreender melhor os mecanismos de citotoxicidade dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**, analisou-se o efeito dos mesmos sobre a progressão do ciclo celular e apoptose.

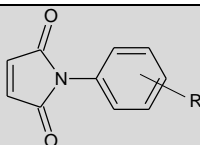
Como pode ser observado na Figura 11, após 24 horas de incubação das células K562 com os compostos (**15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**) não ocorreu bloqueio em nenhuma fase específica do ciclo, apenas um aumento estatisticamente significativo na proporção de células na fase Sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, o que sugere morte celular por apoptose.

**Figura 11:** Efeitos dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** sobre o ciclo celular das células de leucemia mieloide aguda (K562).

**A**



**B**



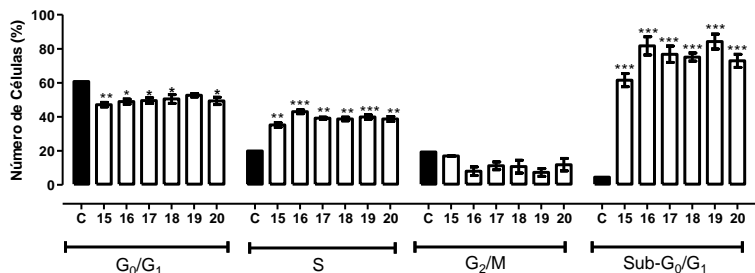
Compostos	R	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> (%)	S (%)	G <sub>2</sub> /M (%)	Sub-G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> (Apoptose) (%)
Controle	-	39,17 ±5,8	27,2 ±1,4	33,6 ±1,0	5,8 ±2,5
15	4-H	45,86 ± 1,4	27,67 ±0,7	26,45 ±0,7	46,10 ±8,8**
16	4-Me	48,56 ±3,1	24,28 ±2,5	27,16 ±4,3	46,90 ±0,8**
17	3,4-Cl <sub>2</sub>	53,00 ±5,4	25,32 ±0,4	21,68 ±0,8	61,40 ±7,5**
18	4-NO <sub>2</sub>	47,90 ±2,4	24,94 ±1,2	27,16 ±2,2	42,10 ±5,0**
19	4-OMe	50,26 ±1,1	25,70 ±0,9	24,04 ±0,2	51,50 ±0,1**
20	4-OH	49,85 ±2,3	24,70 ±2,4	25,50 ±5,2	46,20 ±4,1**

As células K562 foram incubadas por 24 horas na ausência, grupo controle (C), e na presença dos compostos **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**, nas suas respectivas CI<sub>50</sub> de 24 horas. Painel A: As fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>/M e Sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> foram determinadas pela análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo e avaliadas pelo *software WinMID* versão 2.8 e *Infinicyt* versão 1.7. Painel B: Cada ponto representa a média ± EPM de três experimentos independentes. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \*\**p*<0,01, utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.

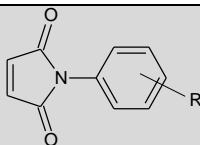
Diferente do que foi observado com as células K562, nas células Jurkat os compostos (**15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**) bloquearam significativamente o ciclo celular na fase S (Figura 12), o que sugere que os compostos causam morte nas células K562 e Jurkat por mecanismos diferentes. Além disso, os compostos (**15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**) também causaram um aumento estatisticamentesignificativo na proporção de células na fase Sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, o que sugere morte celular por apoptose (Figura 12). Outros trabalhos também demonstram que compostos imidicos alteram o ciclo celular, como o estudo realizado por Mukherjee e colaboradores (2010), que ao avaliarem uma série de imidas em células Molt-4, observaram um bloqueio no ciclo celular nas fases S e G<sub>2</sub>/M. Além deste, diferentes estudos demonstram que diversos derivados de imidas bloqueiam o ciclo celular apenas na fase G<sub>2</sub>/M, em células HL-60 (ZHU et al., 2007; WU et al., 2009; WU et al., 2011; LIANG et al.; 2011; LI et al., 2012).

**Figura 12:** Efeitos dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** no ciclo celular das células de leucemia linfóide aguda (Jurkat).

**A**



**B**



Compostos	R	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> (%)	S (%)	G <sub>2</sub> /M (%)	Sub-G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> (Apoptose) (%)
Controle	-	60,75 ± 0,5	19,90 ± 1,6	19,35 ± 1,4	4,50 ± 2,1
15	4-H	47,15 ± 2,3**	35,20 ± 2,3**	16,96 ± 0,2	61,59 ± 6,6***
16	4-Me	49,00 ± 2,5*	43,00 ± 1,9***	8,03 ± 4,4	81,74 ± 9,3***
17	3,4-Cl <sub>2</sub>	49,56 ± 2,9*	39,20 ± 1,0**	11,21 ± 4,0	76,79 ± 8,4***
18	4-NO <sub>2</sub>	50,51 ± 4,5*	38,75 ± 1,9**	10,73 ± 6,5	75,14 ± 4,1***
19	4-OMe	52,71 ± 1,7	39,95 ± 2,2***	7,34 ± 4,0	84,24 ± 7,6***
20	4-OH	49,36 ± 3,7*	38,75 ± 2,5**	11,89 ± 6,3	72,93 ± 6,7***

As células Jurkat foram incubadas por 24 horas na ausência, grupo controle (C), e na presença dos compostos **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**, nas suas respectivas CI<sub>50</sub> de 24 horas. Painel A: As fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>/M e Sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> foram determinadas pela análise do conteúdo de DNA no citômetro de fluxo BD *FACSCanto*<sup>TM</sup> (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software WinMID* versão 2.8 e *Infinicyt* versão 1.7. Painel B: Cada ponto representa a média ± EPM de três experimentos independentes. Cada ponto representa a média ± EPM de três experimentos independentes. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \**p*<0,05, \*\**p*<0,01 e \*\*\**p*<0,001, utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.



Estes resultados sugerem que os compostos **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** causam morte celular em células Jurkat, provavelmente por afetar o processo de duplicação do DNA das células tumorais, antes que a mitose ocorra, entretanto, existem vários mecanismos reguladores envolvidos nesta replicação, e o mecanismo pelo qual as imidas cíclicas (**15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**) causam o bloqueio da fase S do ciclo celular ainda precisa ser esclarecido.

#### 5.4 EFEITO DOS COMPOSTOS **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** NA INDUÇÃO DA APOPTOSE NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E EM CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT

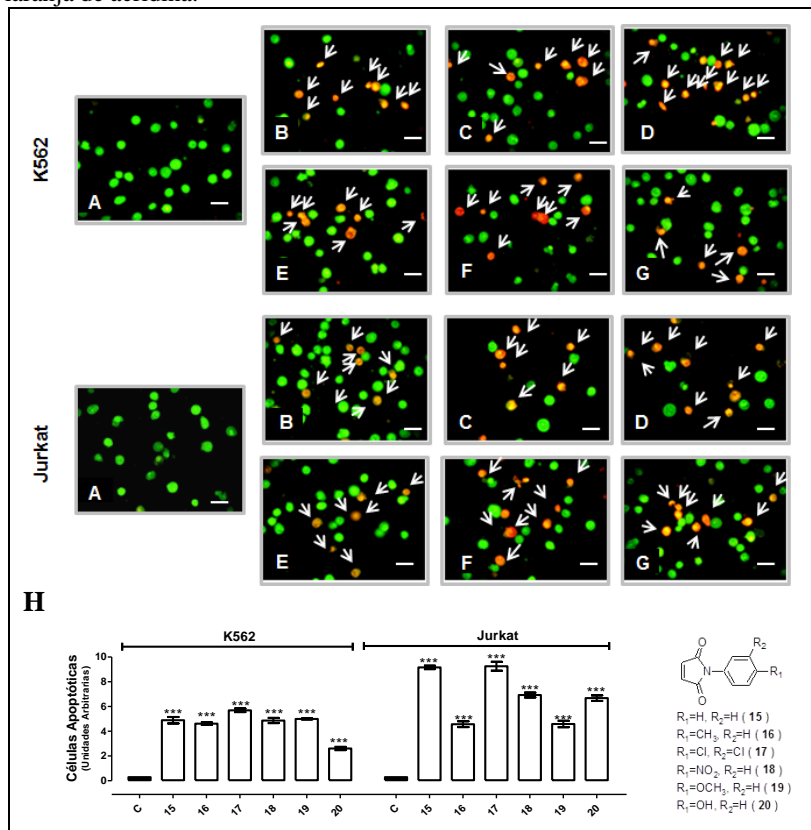
Como já visto anteriormente, o bloqueio do ciclo celular tem a finalidade de reparar o DNA frente a situações de estresse, impedindo a progressão de mutações que possam gerar um processo neoplásico. Se o reparo não ocorrer de forma apropriada, diversas proteínas induzem a célula à morte programada, principalmente a apoptose (RING et al., 2012).

A apoptose é um mecanismo de morte comum para vários agentes antitumorais (HICKMAN, 1992), é considerado um processo sincronizado com mecanismos bioquímicos dependentes de energia, causado por uma série de estímulos endógenos e exógenos, (ELMORE, 2007; RASTOGI; SINHA, 2009), que levam a modificações na morfologia celular, essas modificações ocorrem de maneira temporalmente coordenada no núcleo, no citoplasma e na membrana citoplasmática, como já descrito anteriormente (RENVOIZÉ et al., 1998; FERREIRA; ROCHA, 2004).

Considerando os resultados anteriores que demonstram que os compostos **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**, causam morte celular, assim, a fim de verificar os mecanismos envolvidos na morte celular foram selecionadas três diferentes metodologias para avaliar esse efeito: brometo de etídio e laranja de acridina, fragmentação de DNA e anexina V-FITC.

Inicialmente a apoptose foi avaliada pela análise da morfologia celular, utilizando-se o ensaio de brometo de etídio e laranja de acridina. Como pode ser observado na Figura 13, o tratamento das células K562 e Jurkat com os diferentes compostos (**15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**), nas suas  $CI_{50}$  por 24 horas, causou um aumento significativamente estatístico do número de células apoptóticas, quando comparado com o controle (células não tratadas).

**Figura 13:** Análise da apoptose induzida pelos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** em células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfóide aguda (Jurkat), através do ensaio de brometo de etídio e laranja de acridina.



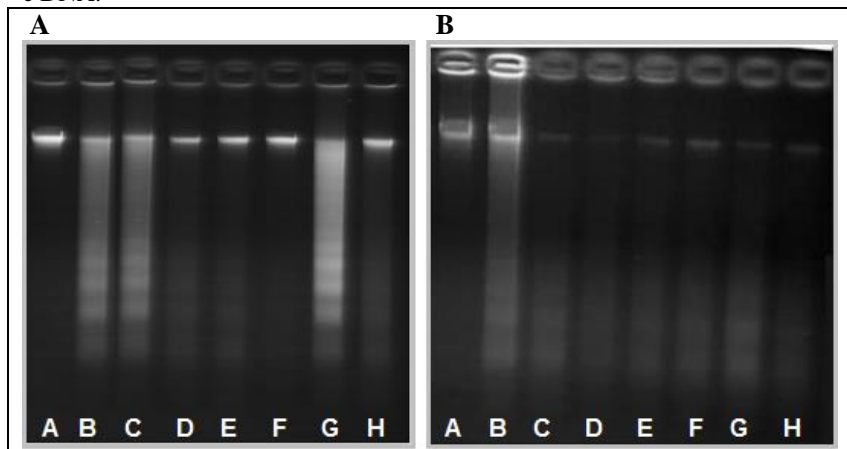
Painéis A: Células não tratadas (grupo controle); Painéis B: composto **15**; Painéis C: composto **16**; Painéis D: composto **17**; Painéis E: composto **18**; Painéis F: composto **19**; Painéis G: composto **20**; Pannel H: Os resultados representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independente. As células K562 e Jurkat foram incubadas com os derivados de imidas cíclicas **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**, nas suas  $CI_{50}$  por 24 horas. A apoptose foi determinada pelo ensaio de brometo de etídio e laranja de acridina em microscópio de fluorescência. A análise foi realizada através *software ImageJ*, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \*\*\* $p < 0,001$ , utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni. A barra representa 20  $\mu m$  e o aumento utilizado foi de 400X. A figura é representativa de 3 experimentos independentes.

Este aumento pode ser evidenciado ao compararmos o grupo controle (Painel A), onde observa-se um predomínio de células uniformes, com o núcleo íntegro, coradas de verde pela ação do corante laranja de acridina, que é capaz de penetrar nas membranas celulares, com o grupo das células tratadas com os compostos **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** (Painel B, C, D, E, F e G), onde observa-se um aumento significativo de células nas fases iniciais de apoptose, as quais ainda possuem membrana intacta, núcleo corado em verde, porém a cromatina não está uniforme; e também por células nas fases tardia de apoptose, que apresentam cromatina condensada e áreas alaranjadas no núcleo, devido a intercalação no DNA pelo brometo de etídio. Este aumento, significativamente estatístico do número de células apoptóticas, também pode ser observado no Painel H (Figura 13) que apresenta a análise dessas imagens.

Posteriormente o processo apoptótico foi avaliado pela da análise do DNA, que se baseia no processo de degradação interssomal do DNA observado durante o processo apoptótico, o qual pode ser observado após eletroforese do DNA em gel, onde verifica-se um padrão característico “em escada” opondo-se ao arrastado visto na necrose. Isso se deve ao fato de que na apoptose as quebras no DNA ocorrem entre os nucleossomas, formando fragmentos múltiplos de 200 pares de bases, e que a membrana plasmática não se rompe prevenindo a liberação de componentes celulares para o meio extracelular (KERR et al., 1995).

Como demonstrado na Figura 14, após incubação das células K562 e Jurkat com os compostos **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**, nas suas  $CI_{50}$  por 24h, observa-se que esses compostos causam fragmentação de DNA para células K562 e Jurkat, semelhante ao observado no controle positivo (Taxol), o que confirma os resultados da análise do brometo de etídio e laranja de acridina e do ciclo celular (aumento de células na fase Sub- $G_0/G_1$ ) que a morte celular causada pelos compostos é via apoptose.

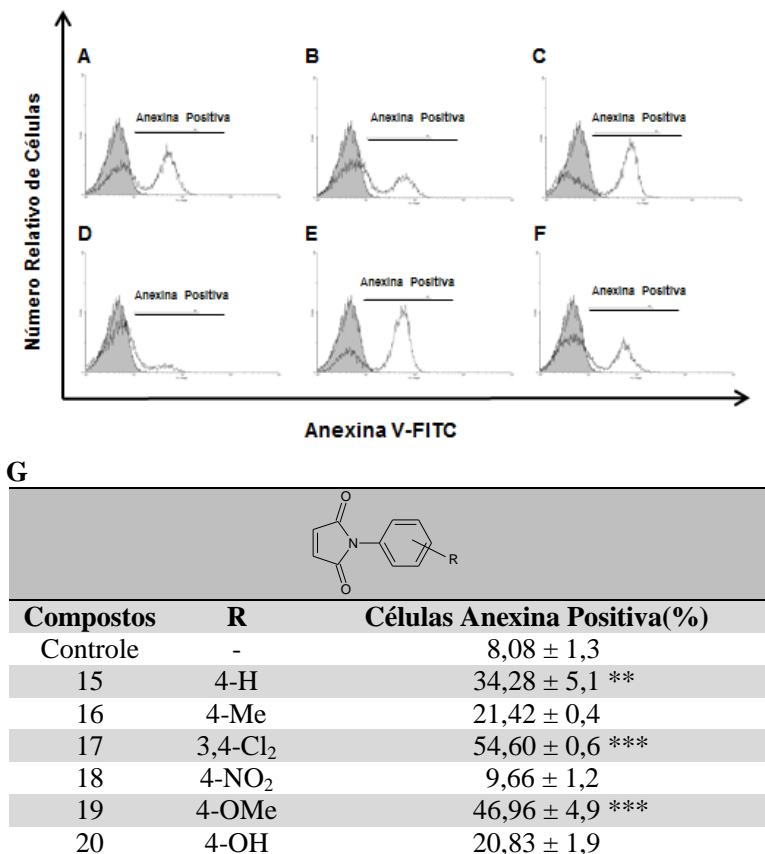
**Figura 14:** Análise da apoptose induzida pelos compostos derivados imidas cíclicas **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** sobre células de leucemia mieloide aguda (K562) e células de leucemia linfóide aguda (Jurkat), através do ensaio de fragmentação de DNA.



A: Células não tratadas (grupo controle); B: Taxol (controle positivo); C: composto **15**; D: composto **16**; E: composto **17**; F: composto **18**; G: composto **19**; H: composto **20**. As células K562 (Painel A) e Jurkat (Painel B) foram incubadas com as imidas cíclicas **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20**, nas suas  $CI_{50}$  por 24 horas. A apoptose foi determinada pelo ensaio de fragmentação de DNA. A figura é representativa de 3 experimentos independentes.

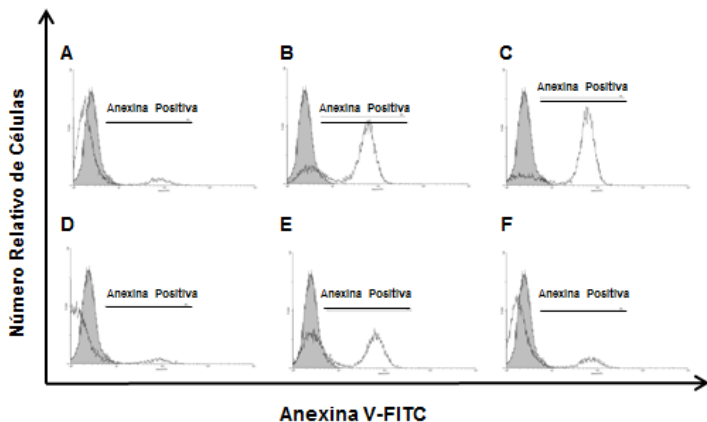
Por último, a apoptose também foi avaliada pela anexina-V ligada ao FITC, como descrito anteriormente. Como pode ser observado na Figura 15, os compostos (**15**, **16**, **17**, **19** e **20**), nas suas  $CI_{50}$ , após incubação de 16 horas com as células K562 causam aumento significativo da percentagem de células anexina-V positivas, quando comparado com o controle. Os compostos **15**, **17** e **19** foram os que causaram maior efeito apoptótico, com uma percentagem de anexina positiva de 34,28 ( $\pm 5,1$ ), 54,60 ( $\pm 0,6$ ) e 46,96 ( $\pm 4,9$ ) respectivamente (Figura 15, Painel G).

**Figura 15:** Efeito dos derivados de imidas cíclicas **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** sobre a exposição dos resíduos de fosfatidilserina em células de leucemia mieloide aguda (K562).



A apoptose foi determinada pela análise da marcação com anexina V-FITC nas células K562 incubadas por 16 horas com o composto **15** (Painel A); o composto **16** (Painel B); o composto **17** (Painel C); o composto **18** (Painel D); o composto **19** (Painel E); e o composto **20** (Painel F), nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes (Painel G). O controle está representado em cinza e as imidas cíclicas em branco. Os histogramas representam os resultados de um, dentre os três experimentos independentes realizados. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD *FACSCanto*<sup>TM</sup> (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelos softwares *WinMID* versão 2.8 e *Infinicyt* versão 1.7. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.

**Figura 16:** Efeito dos derivados de imidas cíclicas **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** sobre a exposição dos resíduos de fosfatidilserina em células de leucemia linfóide aguda (Jurkat).



Compostos	R	Porcentage (%) Anexina Positiva
Controle	-	7,09 ± 0,4
15	4-H	19,75 ± 5,8
16	4-Me	71,58 ± 0,1 ***
17	3,4-Cl <sub>2</sub>	84,82 ± 3,5 ***
18	4-NO <sub>2</sub>	16,19 ± 4,9
19	4-OMe	59,02 ± 8,3 **
20	4-OH	18,16 ± 1,9

A apoptose foi determinada pela análise da marcação com anexina V-FITC nas células Jurkat incubadas por 16 horas com o composto **15** (Painel A); o composto **16** (Painel B); o composto **17** (Painel C); o composto **18** (Painel D); o composto **19** (Painel E); o composto **20** (Painel F), nas suas respectivas CI<sub>50</sub> de 24 horas. Os resultados representam a média ± EPM de três experimentos independentes (Painel G). O controle está representado em cinza e as imidas cíclicas em branco. Os histogramas representam os resultados de um, dentre os três experimentos independentes realizados. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD *FACSCanto*<sup>TM</sup> (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelos softwares *WinMID* versão 2.8 e *Infinicyt* versão 1.7. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.

Na Figura 16 pode-se observar que todos os compostos demonstraram um aumento de células Jurkat anexina-V positivas, especialmente os compostos **16**, **17** e **19** que exibiram um maior percentual de células anexina-V positivas, com valores de 71,58 ( $\pm 0,1$ ); 84,82 ( $\pm 3,5$ ) e 59,02 ( $\pm 8,3$ ), respectivamente.

Esses resultados são compatíveis com aqueles observados no ensaio do brometo de etídio e laranja de acridina (Figuras 13) e no ensaio de fragmentação de DNA (Figura 14), além disso, também sugerem que as células encontradas na fração sub-G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> do ciclo celular (Figuras 11 e 12), são apoptóticas. Diversos estudos demonstram que diversos compostos derivados de imidas, como, por exemplo, a Azonafida e Amonafida e seus análogos, possuem a capacidade de induzir a apoptose, em diferentes linhagens celulares, principalmente por intercalação do DNA (ZHU, et al.; 2007; INGRASSIA et al., 2009; LV e XU, 2009; VINCENZO et al.; 2009; WU et al.; 2009; XIE et al.; 2011a; Wu et al.; 2011).

Os resultados encontrados no presente estudo são particularmente interessantes, visto que a apoptose é um mecanismo comum a vários agentes antitumorais, e o foco deste trabalho é investigar novos compostos que possam ser usados para o desenvolvimento de fármacos quimioterápicos. No entanto, os mecanismos de apoptose dos derivados de imidas cíclicas ainda requerem investigação mais detalhada. Para isso, os compostos **15**, **17** e **19**, foram selecionados e seus efeitos avaliados sobre o potencial mitocondrial e sobre as proteínas AIF, Bcl-2, Bax, caspase, survivina, p53 e Ki67, e do receptor Fas, em células de LMA (K562) e LLA (Jurkat).

#### 5.5 EFEITO DOS COMPOSTOS **15**, **17** e **19** SOBRE O POTENCIAL MITOCONDRIAL DAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E DAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.

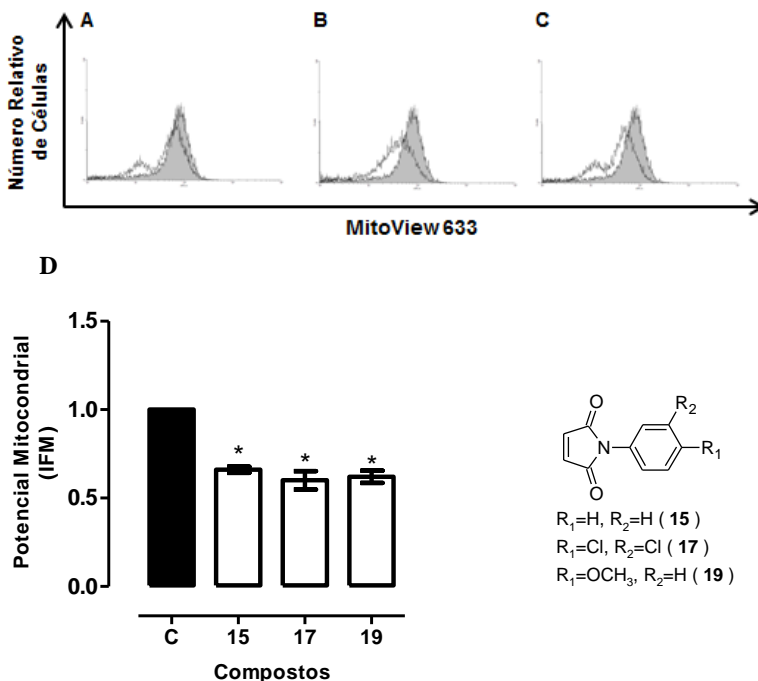
Como já descrito anteriormente, a ativação da via intrínseca da apoptose inicia-se na mitocôndria, e diversos estímulos podem levar a ativação dessa via, (MITA; MITA; TOLCHER, 2006; ELMORE 2007; MELLET et al., 2008, FRENZEL et al., 2009). Todos esses estímulos causam alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, através da formação de poros, isso leva a perda do potencial

transmembrânico mitocondrial, e, como consequência, a liberação de proteínas pró-apoptóticas da mitocôndria para o citoplasma (ELMORE, 2007). No câncer alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial podem levar a célula à apoptose, constituindo, dessa forma, um dos objetivos do tratamento quimioterápico (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007) e também dessa investigação.

Para verificar se a apoptose causada pelos compostos (**15**, **17** e **19**) envolvem danos ao potencial mitocondrial, as células K562 e Jurkat foram incubadas com os compostos nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas, por 12 horas, e o potencial mitocondrial foi avaliado pelo índice de fluorescência média (IFM) analisado por citometria de fluxo.

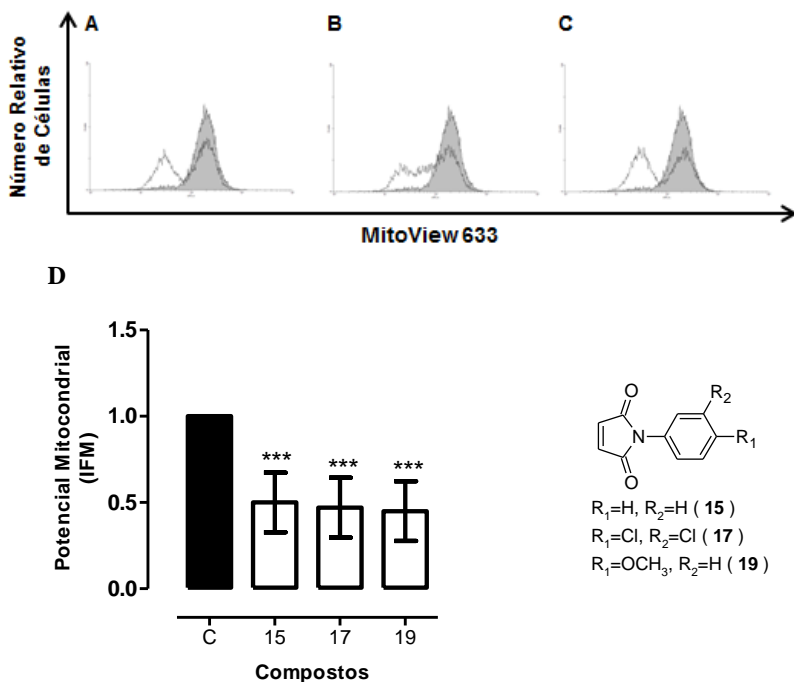


**Figura 17:** Efeito dos derivados de imidas cíclicas **15**, **17** e **19** sobre o potencial mitocondrial das células de leucemia mieloide aguda (K562).



O potencial mitocondrial foi determinado nas células K562 incubadas por 12 horas na ausência, grupo controle (C), e na presença do composto **15** (Painel A), composto **17** (Painel B) e composto **19** (Painel C), nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes (Painel D). O controle está representado em cinza e os compostos em branco. Os histogramas representam os resultados de um, dentre os três experimentos independentes realizados. A determinação do índice de fluorescência média (IFM) para avaliação do potencial mitocondrial foi realizada por citometria de fluxo. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD *FACSCanto*<sup>TM</sup> (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas com o *software Infinicyt* versão 1.7. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \* $p < 0,05$ , utilizando ANOVA one way e post teste *t* de Bonferroni

**Figura 18:** Efeito dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **17** e **19** sobre o potencial mitocondrial das células de leucemia linfóide aguda (Jurkat).



O potencial mitocondrial foi determinado nas células Jurkat incubadas por 12 horas na ausência, grupo controle (C), e na presença do composto **15** (Painel A), composto **17** (Painel B) e composto **19** (Painel C), nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes (Painel D). O controle está representado em cinza e as imidas cíclicas em branco. Os histogramas representam os resultados de um, dentre os três experimentos independentes realizados. A determinação do índice de fluorescência média (IFM) para avaliação do potencial mitocondrial foi realizada por citometria de fluxo. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD *FACSCanto*<sup>TM</sup> (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas com o *software Infinicyt* versão 1.7. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \*\*\* $p < 0,001$ , utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.

Como pode ser observado nas Figuras 17 e 18, os compostos (**15**, **17** e **19**) causaram redução estatisticamente significativa do potencial mitocondrial nas células K562 e Jurkat. Pode-se observar ainda, que o dano no potencial mitocondrial causado pelos compostos foi significativamente maior nas células Jurkat (Figura 18), quando comparado com os resultados encontrados para as células K562 (Figura 17). Esses resultados sugerem o envolvimento da via intrínseca da apoptose, na morte causada pelos compostos **15**, **17** e **19** nessas células, e corroboram com estudo realizado por Liang e colaboradores (2010), que demonstram em seu trabalho que compostos imídicos alteraram o potencial mitocondrial, em células leucêmicas, além desse, Zhu e colaboradores (2007), apesar de não avaliarem diretamente o potencial mitocondrial, demonstraram em seu estudo o envolvimento da via intrínseca na indução da apoptose ocasionada por imidas.

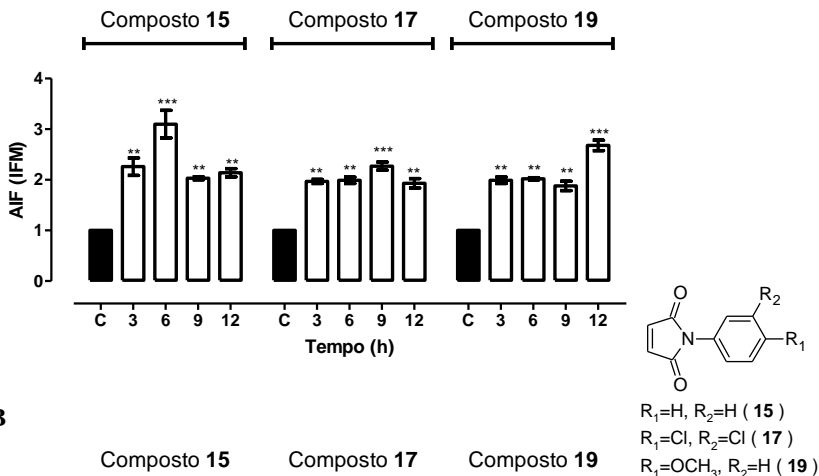
#### 5.6 EFEITO DOS COMPOSTOS **15**, **17** e **19** SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA AIF NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT

Com visto anteriormente, com a perda do potencial mitocondrial ocorre o extravasamento de proteínas apoptóticas como o AIF, entre outras (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007; TAIT; GREEN, 2010). Como os compostos **15**, **17** e **19** causaram alteração no potencial mitocondrial (Figura 17 e 18), na sequência das investigações foi avaliado a expressão do fator indutor de apoptose (AIF) após 3, 6, 9 e 12 horas de incubação das células K562 e Jurkat com os compostos **15**, **17** e **19** (em suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas).

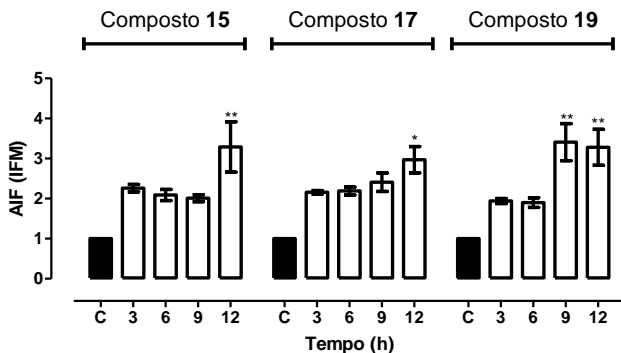
Na Figura 19 (Painel A) pode-se observar que os compostos (**15**, **17** e **19**) causaram aumento estatisticamente significativo da expressão da proteína AIF nas células K562 nos quatro tempos avaliados (3, 6, 9 e 12 horas). Já para as células Jurkat, os compostos **15** e **17** causaram aumento da expressão da proteína AIF apenas após 12 horas de incubação. No entanto, o composto **19** causou aumento da expressão a partir de 9 horas após a incubação (Figura 19, Painel B).

**Figura 19:** Efeito dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **17** e **19** sobre a expressão da proteína AIF nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e de leucemia linfóide aguda (Jurkat).

**A**



**B**



As células K562 (Painel A) e Jurkat (Painel B) foram incubadas na ausência, grupo controle (C), e na presença dos compostos **15**, **17** e **19**, em suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas, por 3, 6, 9 e 12 horas. A determinação do índice de fluorescência média (IFM) para avaliação da expressão da proteína AIF, em cada um dos tempos de incubação, foi realizada por citometria de fluxo. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD *FACSCanto*<sup>TM</sup> (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7. \*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.

Uma vez liberado no citoplasma, o AIF transloca-se para o núcleo, causando a fragmentação do DNA e a condensação da cromatina. Além desse efeito nuclear, o AIF também pode induzir a permeabilização mitocondrial, ocasionando o extravasamento do citocromo-c, e iniciando, conseqüentemente, o processo de apoptose (MODJTAHEDI et al., 2006; ELMORE, 2007; SEVRIUKOVA, 2011).

O aumento da expressão de AIF causada pelos compostos demonstra que o mesmo está envolvido no processo de apoptose causado pelos compostos (**15**, **17** e **19**), e corroboram com os resultados encontrados por Zhu e colaboradores (2007), que demonstraram que a apoptose causada pelo composto R16 (2-(2-dimethylamino)-6-thia-2-aza-benzo-[def]-chrysene-1,3-diones), uma naftalimida análoga do amonafida, envolve o aumento na expressão de AIF, associado a um aumento da liberação do citocromo-c. Esses resultados sugerem novamente o envolvimento da via intrínseca da apoptose no processo de morte celular causada por esses compostos.

#### 5.7 EFEITO DOS COMPOSTOS **15**, **17** e **19** SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA BCL-2 E PRÓ-APOPTÓTICA BAX NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT

A permeabilidade de membrana mitocondrial alterada, a perda do potencial mitocondrial e a liberação de proteínas, como o AIF, da mitocôndria constituem o evento central da via intrínseca da apoptose, e como visto nos resultados acima descritos, a apoptose causada pelos compostos (**15**, **17** e **19**) envolve o dano ao potencial mitocondrial (Figura 17 e 18) e a liberação da proteína AIF (Figura 19). Entretanto, como já descrito anteriormente, esses mecanismos sofrem regulação de algumas proteínas, entre elas podemos destacar as proteínas da família Bcl-2. Essa família é constituída de proteínas com funções opostas, isto é, enquanto algumas possuem efeito antiapoptótico, como a Bcl-2, outras possuem efeito pró-apoptóticos, como a Bax (CORY; ADAMS, 2002; ELMORE, 2007; YOULE; STRASSER, 2008; FRENZEL et al., 2009; ROLLAND; CONRADT, 2010).

Assim, com o objetivo de avaliar se a apoptose induzida pelos compostos **15**, **17** e **19** envolvia as proteínas da família Bcl-2, analisamos o efeito dos derivados de imidas cíclicas (nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas) sobre a expressão das proteínas

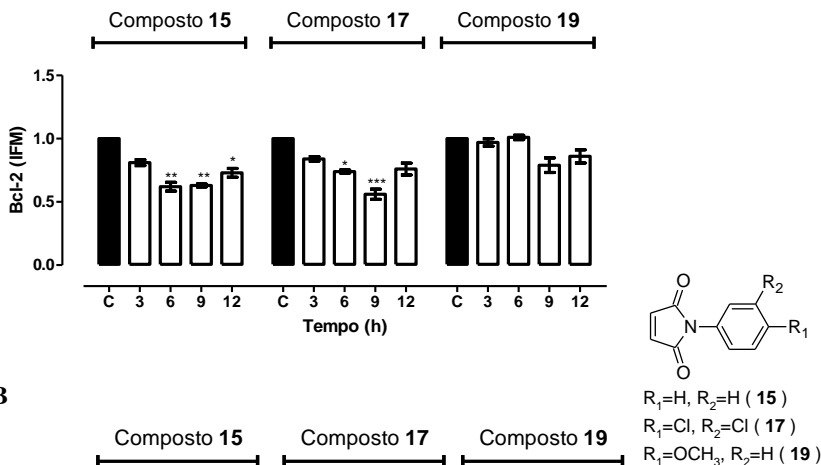
antiapoptótica Bcl-2 e pró-apoptótica Bax, após 3, 6, 9 e 12 horas de incubação, com as células K562 e Jurkat, por citometria de fluxo.

Como pode ser observado na Figura 20 (Painel A), apenas os compostos **15** e **17** causaram diminuição significativa da expressão da proteína Bcl-2 nas células K562, nos tempos de 6 e 9 horas. Curiosamente, após 12 horas de incubação, somente o composto **15** manteve a expressão da Bcl-2 diminuída, o que sugere que após a inicialização do sinal de apoptose, as proteínas antiapoptóticas envolvidas são inibidas, no entanto, se o sinal de inibição não persistir, as mesmas voltam a ser expressas.

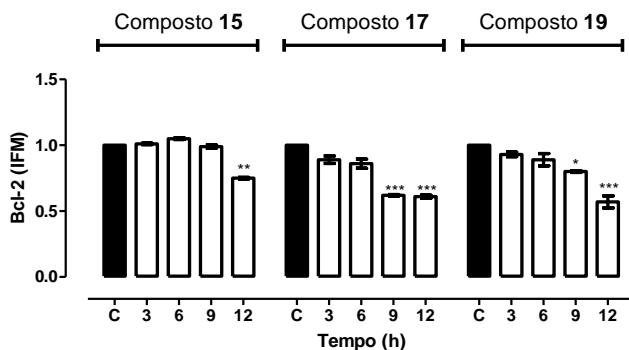
Nas células Jurkat, todos os compostos estudados causaram diminuição significativa da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 (Figura 20, Painel B). O composto **15** diminuiu a expressão dessa proteína apenas após 12 horas de incubação, já com os compostos **17** e **19**, essa diminuição ocorreu após 9 e 12 horas de incubação. Esses resultados corroboram outros estudos, que recentemente também demonstraram a diminuição da proteína antiapoptótica Bcl-2 em células de diferentes linhagens celulares, tratadas com diferentes derivados imídicos (LIANG et al., 2010; LIANG et al., 2011; LI et al., 2012; XIE et al., 2012).

**Figura 20:** Efeito dos compostos derivados imidas cíclicas **15**, **17** e **19** sobre a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfóide aguda (Jurkat).

**A**



**B**



As células K562 (Painel A) e Jurkat (Painel B) foram incubadas na ausência, grupo controle (C), e na presença dos compostos **15**, **17** e **19**, com suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas, por 3, 6, 9 e 12 horas. A determinação do índice de fluorescência média (IFM) para avaliação da expressão da proteína Bcl-2, em cada um dos tempos de incubação, foi avaliado por citometria de fluxo. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD *FACSCanto*<sup>TM</sup> (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo do *software Infinicyt* versão 1.7. \*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.

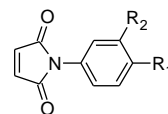
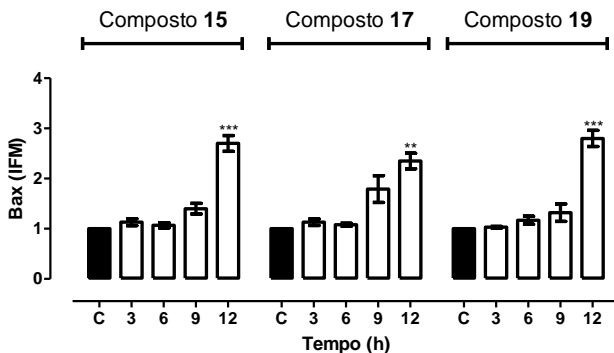
As proteínas que possuem efeito antiapoptótico, como a Bcl-2, localizam-se principalmente na membrana mitocondrial, onde protegem a mitocôndria contra a permeabilização da membrana, pela inibição das proteínas pró-apoptóticas, como a Bax, que por sua vez é importante para a indução da permeabilidade da membrana mitocondrial pela formação de poros, e subsequente liberação de moléculas que induzem a apoptose (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007; OW et al., 2008; SHERIDAN et al., 2008; AUTRET; MARTIN, 2009; TAIT; GREEN, 2010). Para avaliar essa etapa do mecanismo intrínseco da apoptose, verificou-se se a expressão da proteína pró-apoptótica Bax também estaria envolvida na apoptose causada pelos compostos **15**, **17** e **19**.

Pode-se observar na Figura 21 (Painel A) que após 12 horas de tratamento com os compostos (**15**, **17** e **19**) ocorre um aumento significativo da expressão da proteína Bax nas células K562. Nas células Jurkat, os compostos derivados de imidas cíclicas alteraram a expressão da proteína Bax de forma diferenciada (Figura 21, Painel B). Os compostos **15** e **19** também causaram aumento da expressão de Bax apenas após 12 horas de incubação, porém o composto **17** causou aumento da expressão a partir de 9 horas de incubação. Esses resultados corroboram com outros estudos, que demonstraram o aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax, em diferentes linhagens celulares tratadas com compostos imídicos (LIANG et al., 2010; LIANG et al., 2011; LI et al., 2012).



**Figura 21:** Efeito dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **17** e **19** sobre a expressão da proteína proapoptótica Bax nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfóide aguda (Jurkat).

**A**

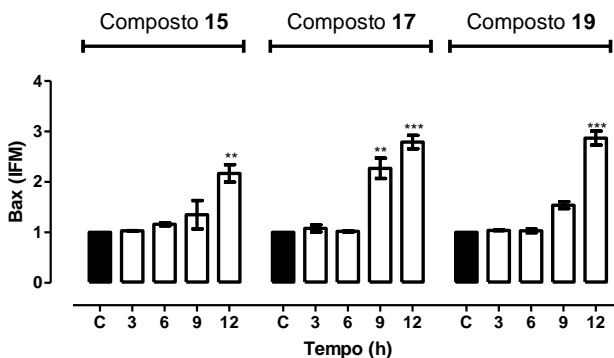


$R_1=H, R_2=H$  ( **15** )

$R_1=Cl, R_2=Cl$  ( **17** )

$R_1=OCH_3, R_2=H$  ( **19** )

**B**



As células K562 (Painel A) e Jurkat (Painel B) foram incubadas na ausência, grupo controle (C), e na presença dos compostos **15**, **17** e **19**, nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas, por 3, 6, 9 e 12 horas. A determinação do índice de fluorescência média (IFM) para avaliação da expressão da proteína Bax, em cada um dos tempos de incubação, foi realizada por citometria de fluxo. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD *FACSCanto*<sup>TM</sup> (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.

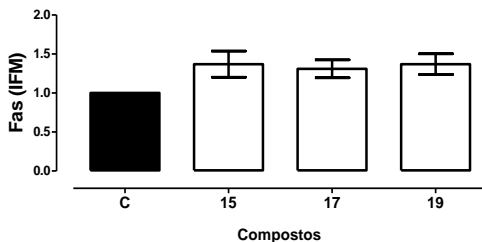
Alguns trabalhos relatam que a superexpressão da proteína Bcl-2 tem mostrado ser um fator de mau prognóstico nos pacientes com LAs (KUSENDA, 1998; RUVOLO; DENG; MAY, 2001), e que a inversão da proporção Bax/Bcl-2 predispõe a célula à apoptose (CORY; ADAMS, 2002). Além disso, o aumento da expressão de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 ou a diminuição da expressão de membros antiapoptóticos está associado à diminuição do potencial oncogênico e a maiores taxas de resposta à quimioterapia. O desequilíbrio da proporção de Bcl-2/Bax em favor da proteína Bax, encontrada no presente trabalho, também foi observada em um estudo realizado por Zhu e colaboradores (2007), no qual mostra o efeito do composto R16 (2-(2-dimethylamino)-6-thia-2-aza-benzo-[def]-chryseno-1,3-diones), uma naftalimida análoga do amonafida, sobre diferentes linhagens celulares (S-180 e H<sub>22</sub>). Esses resultados novamente demonstram o envolvimento da via intrínseca da apoptose, na morte causada pelos compostos **15**, **17** e **19**.

#### 5.8 EFEITO DOS COMPOSTOS **15**, **17** e **19** SOBRE A EXPRESSÃO DO RECEPTOR FAS NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT

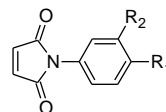
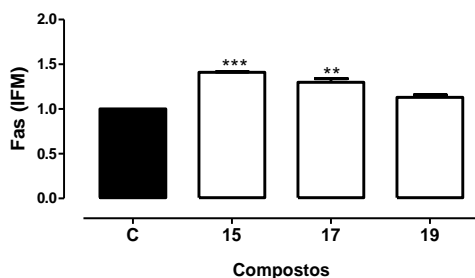
A ativação da via extrínseca da apoptose está associada à sinalização de receptores de morte, que são membros da família TNF (Tumor Necrosis Factor), como visto anteriormente, um destes receptores é o Fas (SHEARWIN-WHYTT; KUMMAR, 1999; HAIL et al., 2006; ELMORE, 2007). Dessa forma, para avaliar o envolvimento da via extrínseca da apoptose, na morte causada pelos compostos (**15**, **17** e **19**), as células K562 e Jurkat foram incubadas com os compostos, na sua CI<sub>50</sub> por 12 horas, e o efeito sobre a expressão do receptor Fas foi analisada por citometria de fluxo. Como pode ser observado na Figura 22, houve um aumento significativo da expressão do receptor Fas, somente nas células Jurkat (Painel B), tratada com os compostos **15** e **17**, o que demonstra o envolvimento da via extrínseca na apoptose causada por esses compostos. Esses resultados sugerem que os menores valores de CI<sub>50</sub> encontrados para células Jurkat (Figura 10) possam ser justificados, quando comparados as células K562 (Figura 9), pois a morte causada pelas imidas nessas às duas vias de apoptose (intrínseca e extrínseca).

**Figura 22:** Efeito dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **17** e **19** na expressão do receptor Fas nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfóide aguda (Jurkat).

**A**



**B**



$R_1=H, R_2=H$  ( **15** )

$R_1=Cl, R_2=Cl$  ( **17** )

$R_1=OCH_3, R_2=H$  ( **19** )

As células K562 (Painel A) e Jurkat (Painel B) foram incubadas na ausência, grupo controle (C), e na presença dos compostos **15**, **17** e **19**, em suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas, por 12 horas. A determinação do índice de fluorescência média (IFM) para avaliação da expressão do receptor Fas, foi realizada por citometria de fluxo. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo *BD FACSCanto™* (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$ , utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.

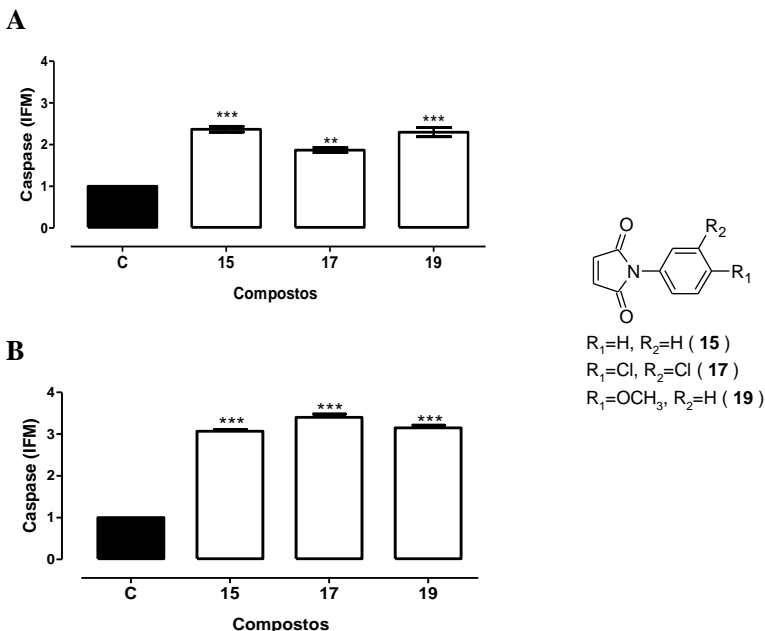
Entretanto outras famílias de receptores ainda precisam ser estudados, para elucidar melhor o envolvimento da via extrínseca na morte causada pelos compostos. Esses resultados corroboram com estudos realizados por Lautrette e colaboradores (2006) e Zhu e

colaboradores (2007), que demonstraram em seus trabalhos o envolvimento do ligante Fas na apoptose causada por compostos imídicos, em células Jurkat e HL-60.

### 5.9 EFEITO DOS COMPOSTOS **15**, **17** e **19** SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CASPASE NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT

A via extrínseca e intrínseca da apoptose terminam em um ponto de execução em comum, neste ponto ocorre a ativação das caspases executoras (caspases-3, -6 e -7) (ELMORE, 2007). Dessa forma, para avaliar se a apoptose causada pelos compostos **15**, **17** e **19**, envolve a ativação da proteína caspase-3, as células K562 e Jurkat, foram tratadas com os compostos (**15**, **17** e **19**) em suas  $CI_{50}$  por 24 horas e a sua expressão foi analisada por citometria de fluxo. A Figura 23 demonstra que os compostos causaram um significativo aumento da expressão da proteína caspase-3, em células K562 (Painel A) e em células Jurkat (painel B). Pode-se observar ainda, que essa expressão foi maior nas células Jurkat, quando comparado com as células K562.

**Figura 23:** Efeito dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **17** e **19** sobre a expressão da proteína caspase-3 ativa nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfóide aguda (Jurkat).



As células K562 (Painel A) e Jurkat (Painel B) foram incubadas na ausência, grupo controle (C), e na presença dos compostos **15**, **17** e **19**, em suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas, por 24 horas. A determinação do índice de fluorescência média (IFM) para avaliação da expressão da proteína caspase-3, foi realizada por citometria de fluxo. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD *FACSCanto*<sup>TM</sup> (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.

Outros estudos corroboram com esses resultados, os quais evidenciam o aumento das caspases em diversas linhagens celulares tratadas com derivados imídicos. Por exemplo, Zhu e colaboradores (2007) demonstraram que a apoptose causada pela naftalimida (2-(2-dimetilamino)-6-thia-2-aza-benzo-[def]-chrysene-1,3-dione) em

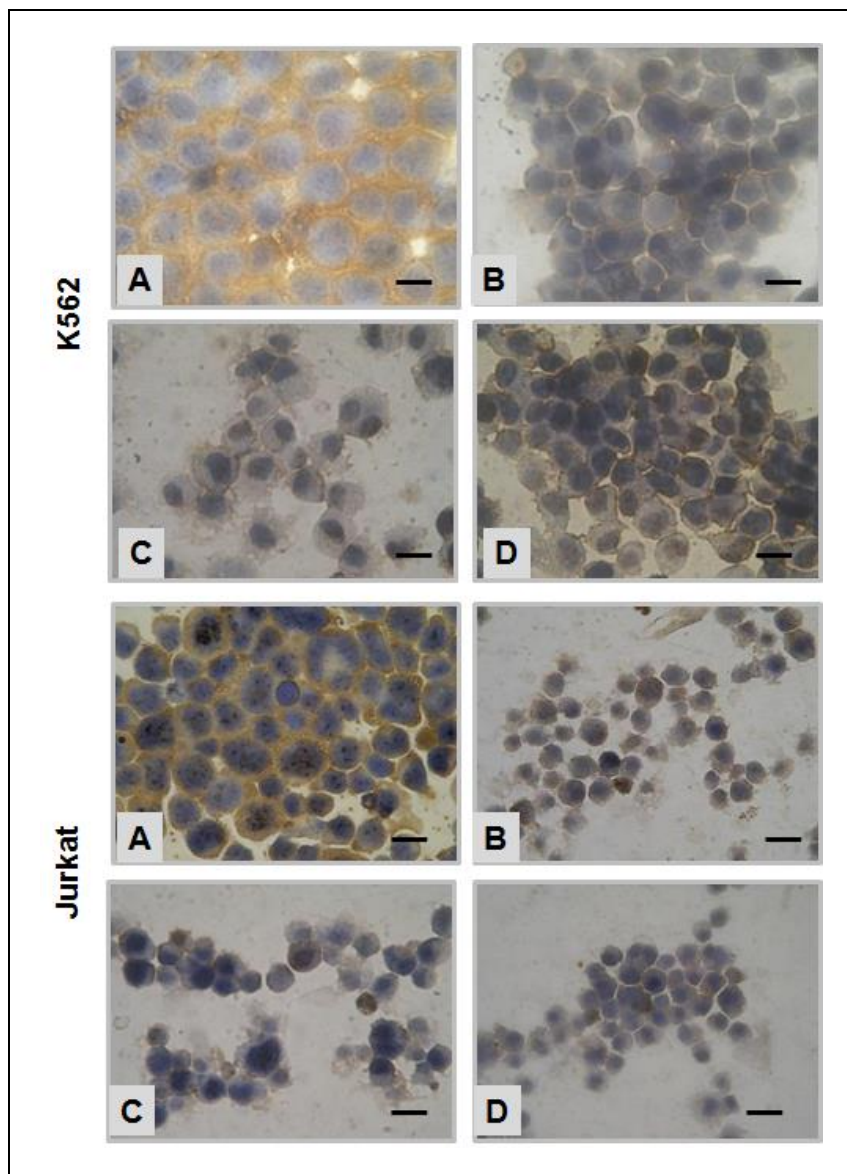
células HL-60 envolve a ativação das caspase -3 e -9, e Mukherjee e colaboradores (2010) mostraram que a imida (6-Nitro-2-(3-hydroxypropyl)-1H-benz[de]isoquinoline-1,3-dione) causa morte celular por apoptose com o aumento da atividade das caspases -3 e -6 em células MOLT-4. Além desses, outros trabalhos demonstram que apoptose causada por compostos imídicos envolve o aumento da atividade da caspase-3 em células leucêmicas (TUMIATTI et al., 2009; LIANG et al., 2010, LI et al., 2012) e o aumento das caspases -3, -8 e -9, em diferentes linhagens celulares (Xie et al., 2011a, 2011b e 2012)

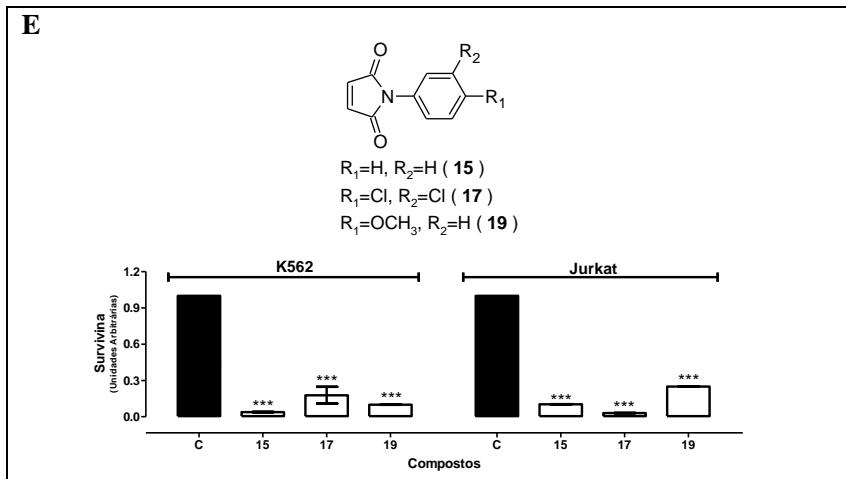
#### 5.10 EFEITO DOS COMPOSTOS **15**, **17** e **19** SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SURVIVINA NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT

A apoptose também pode estar relacionada à diminuição da expressão de proteínas que inibam a cascata das caspases, como, por exemplo, as IAPs, como já citado anteriormente. O principal membro dessa família é a survivina, cuja expressão costuma estar aumentada em células tumorais. De acordo com a literatura, a diminuição da expressão dessa proteína está relacionada à indução da célula tumoral à apoptose e à uma melhor resposta ao tratamento (HARIKUMAR et al., 2009). Alguns trabalhos relatam que sua superexpressão está relacionada a um prognóstico desfavorável, com a diminuição de sobrevida em pacientes com câncer (ZAFFARONI; PENNATI; DAIDONE, 2005, NAKAYAMA; KAMIHIRA, 2002; FULDA, 2009), e com o desenvolvimento de resistência a quimioterápicos (ALTIERI, 2001; WRZESIEN-KUS et al., 2004; ZAFFARONI; PENNATI; DAIDONE, 2005), representando assim, um alvo para o tratamento do câncer. Nessa perspectiva, investigamos se alterações na expressão dessa proteína estão relacionadas ao mecanismo de ação citotóxico dos compostos **15**, **17** e **19**.

Os compostos **15**, **17** e **19** (nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h) foram incubados por 24 horas com as células, K562 e Jurkat, e a expressão da proteína antiapoptótica survivina, avaliada por imunocitoquímica.

**Figura 24:** Efeito dos derivados de imidas **15**, **17** e **19** sobre a expressão da proteína antiapoptótica survivina nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfóide aguda (Jurkat).





Painéis A: Células não tratadas (grupo controle); Painéis B: composto **15**; Painéis C: composto **17**; Painéis D: composto **19**. Pannel H: Os resultados representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independente. As células K562 e Jurkat foram incubadas por 24 horas na ausência (grupo controle) e na presença dos compostos **15**, **17** e **19**, nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas. A detecção da proteína survivina foi realizada por imunocitoquímica, utilizando o método estreptoavidina-biotina-peroxidase. O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha citoplasmática no local da marcação pelo anticorpo anti-survivina. As fotografias das lâminas foram realizadas no microscópio ótico NIKON ECLIPSE 50i, em aumento de 400X, com a câmera NIKON DIGITAL SIGHT DS-5M e o programa NIS ELEMENTS F, VERSION 2.10. A análise foi realizada através *software ImageJ*, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \*\*\* $p < 0,001$ , utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni. A barra representa 20  $\mu$ m.

De acordo com a Figura 24, as células K562 e Jurkat, apresentam expressão da proteína survivina de forma constitutiva, a qual pode ser evidenciada pela coloração acastanhada no citoplasma. Entretanto, após o tratamento das células K562 e Jurkat com os compostos (**15**, **17** e **19**), mesmo apresentando um menor número de células devido à morte celular causada pelos compostos, pode-se observar uma diminuição da expressão dessa proteína no citoplasma. Esses resultados sugerem que a inibição da expressão da proteína antiapoptótica survivina fragiliza as células K562 e Jurkat aos efeito citotóxicos dos compostos **15**, **17** e **19**, e corroboram com o estudo



realizado por Ghosh e Altieri (2005), que evidenciaram a diminuição da expressão da proteína survivina em células HCT116 tratadas com compostos imídicos.

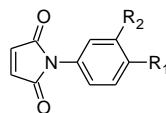
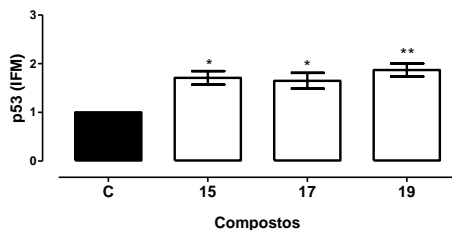
#### 5.11 EFEITO DOS COMPOSTOS **15**, **17** e **19** SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P53 NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT

Outra proteína relacionada com o processo apoptótico é a p53, essa proteína ativa a transcrição de genes de reparo ao DNA com o objetivo de impedir a propagação do erro genético para as células filhas. Se o reparo ao DNA não for efetuado de forma satisfatória, a p53 dispara o mecanismo de apoptose pela ativação do gene Bax, cuja proteína inibe a ação antiapoptótica da proteína Bcl-2 (KASTAN; BARTEK, 2004; GHOBRIAL et al., 2005; HUNTER; LACASSE; KORNELUK, 2007; GU; ZHU, 2012).

Nessa perspectiva, para verificar o envolvimento da proteína p53 no processo de apoptose causado pelos compostos **15**, **17** e **19** as células K562 e Jurkat foram incubadas, 12 horas, com esses compostos, em suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h, e sua expressão foi avaliada por citometria de fluxo.

**Figura 25:** Efeito dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **17** e **19** sobre a expressão da proteína p53 nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfóide aguda (Jurkat).

**A**

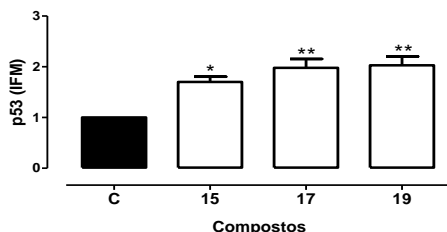


$R_1=H, R_2=H$  ( **15** )

$R_1=Cl, R_2=Cl$  ( **17** )

$R_1=OCH_3, R_2=H$  ( **19** )

**B**



As células K562 (Painel A) e Jurkat (Painel B) foram incubadas na ausência, grupo controle (C), e na presença dos compostos 15, 17 e 19, em suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h, por 12 horas. A determinação do índice de fluorescência média (IFM) para avaliação da expressão da proteína p53, em cada um dos tempos de incubação, foi realizada por citometria de fluxo. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de dois experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD *FACSCanto*<sup>TM</sup> (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ , utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.

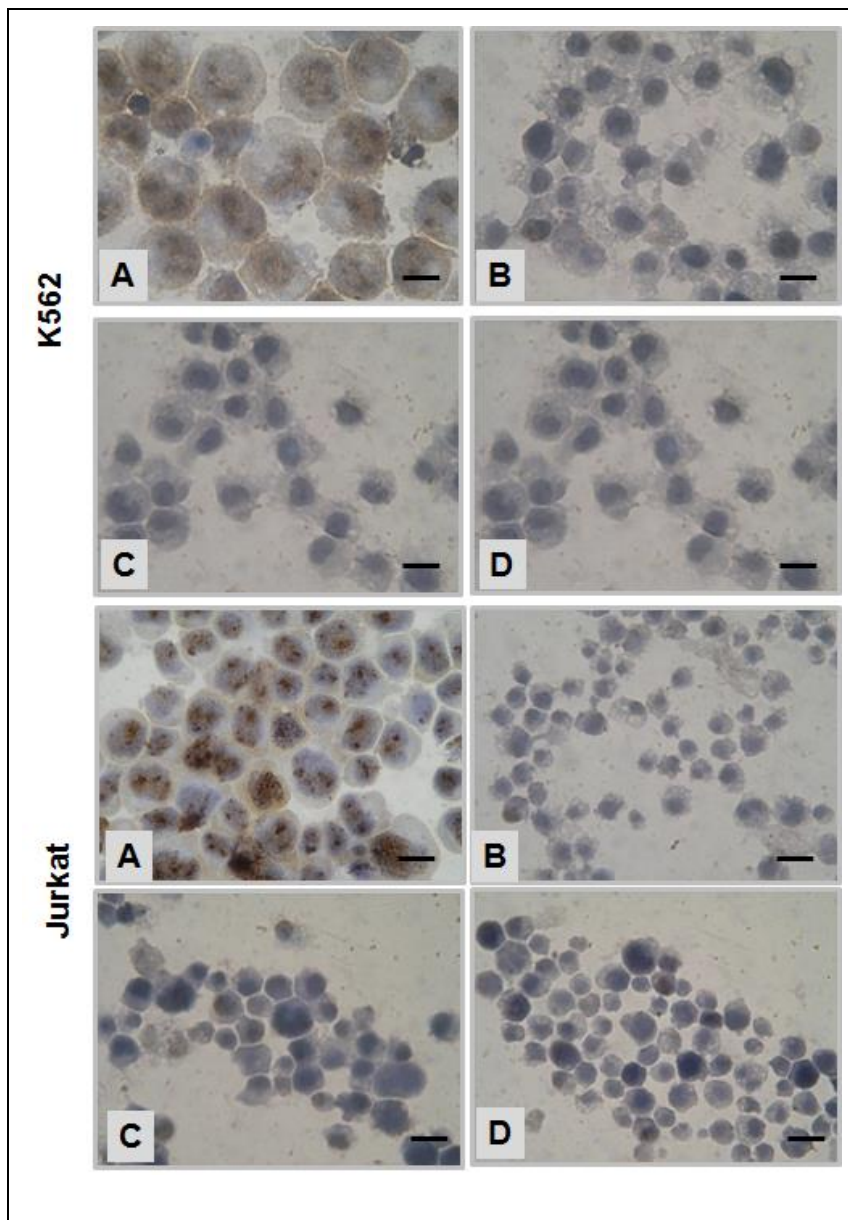
Como podem ser observados na Figura 25, todos os compostos aumentaram a expressão da proteína p53, o que demonstra o envolvimento dessa proteína na morte causada pelos compostos. Esses resultados corroboram com outros estudos, que também demonstraram o aumento da expressão da proteína p53, em diversas linhagens celulares, tratadas com compostos imídicos (GHOSH; ALTIERI, 2005; TUMIATI et al., 2009; LIANG et al., 2011; XIE et al., 2012).

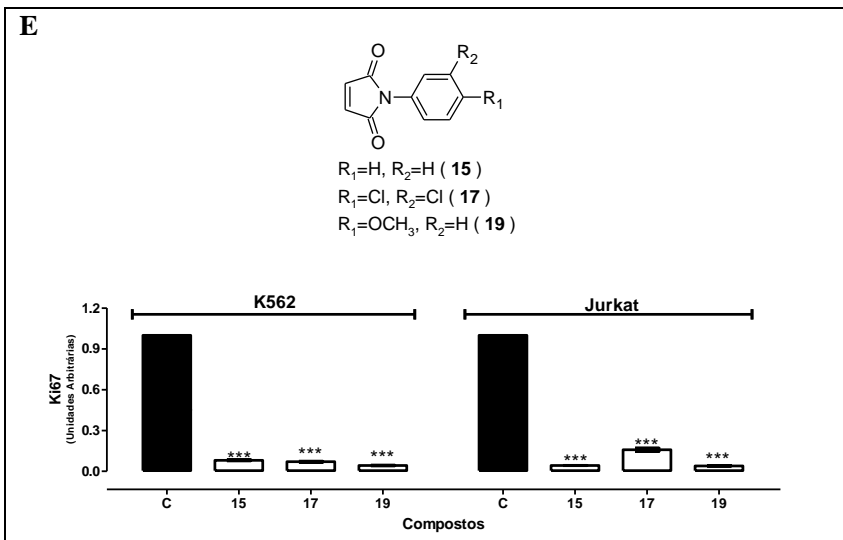
## 5.12 EFEITO DOS COMPOSTOS **15**, **17** e **19** SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA KI67 NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT

A proliferação celular descontrolada é considerada um dos principais mecanismos biológicos envolvidos na oncogênese. A proteína nuclear Ki67 está presente em todas as células em proliferação, tanto as normais quanto tumorais, por isso, é considerada como um marcador de proliferação celular (SCHOLZEN; GERDES, 2000). Além disso, também é considerada como um marcador de diagnóstico e prognóstico em diversos tipos de neoplasias (LO et al., 2011).

Nessa perspectiva, considerando-se a importância da proteína Ki67 na proliferação celular, o efeito dos compostos **15**, **17** e **19**, nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas, sobre a expressão da proteína Ki67 foi avaliado por imunocitoquímica, após incubação por 24 horas com as células K562 e Jurkat.

**Figura 26:** Efeito dos derivados de imidas **15**, **17** e **19** sobre a expressão da proteína Ki67 nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfóide aguda (Jurkat).





Painéis A: Células não tratadas (grupo controle); Painéis B: composto **15**; Painéis C: composto **17**; Painéis D: composto **19**. Paineis E-H: Os resultados representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes. As células K562 e Jurkat foram incubadas por 24 horas na ausência (grupo controle) e na presença das imidas **15**, **17** e **19**, nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas. A detecção da proteína Ki67 foi realizada por imunocitoquímica, utilizando o método estreptoavidina-biotina-peroxidase. O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha nuclear no local da marcação pelo anticorpo anti-Ki67. As fotografias das lâminas foram realizadas no microscópio ótico NIKON ECLIPSE 50i, em aumento de 400X, com a câmera NIKON DIGITAL SIGHT DS-5M e o programa NIS ELEMENTS F, VERSION 2.10. A análise foi realizada através *software ImageJ*, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \*\*\* $p < 0,001$ , utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni. A barra representa 20  $\mu$ m.

De acordo com a Figura 26, mesmo apresentando um menor número de células devido à morte celular causada pelos compostos (**15**, **17** e **19**), as células K562 e Jurkat tratadas com os compostos por 24 horas apresentaram diminuição evidente da expressão da proteína nuclear KI-67, a qual pode ser evidenciada pela coloração nuclear acastanhada. Até o presente momento, não foram encontrados estudos relacionando o efeito de imidas na expressão dessa proteína.

Em conjunto, os resultados aqui expostos, sugerem que os compostos **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** causaram morte das células K562 e Jurkat por apoptose. Causam diminuição da expressão da proteína Ki67, a qual interfere na divisão e proliferação das células leucêmicas, o que resulta no bloqueio do ciclo celular. Esses sinais celulares intrínsecos desencadearam a apoptose via mitocondrial com diminuição do potencial mitocondrial, desequilíbrio da proporção de Bcl-2/Bax em favor da proteína Bax, e liberação do citocromo c, o que culminou na ativação da caspase -3, a qual é a proteína executora da apoptose. Seu efeito sobre as células pode ser evidenciado pelo aumento da externalização da fosfatidilserina, fragmentação nuclear e alterações morfológicas características. Além disso, os compostos causaram liberação do AIF, diminuição da expressão da proteína antiapoptótica survivina e da p53, o que ampliou o efeito pró-apoptótico. Ainda, nas células Jurkat, os compostos **15** e **17**, também ativaram a apoptose pela via extrínseca, evidenciado pelo aumento da expressão do receptor Fas. Esses resultados sugerem que os compostos **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** são citotóxicos para células leucêmicas epromissores para o desenvolvimento de novos fármacos antileucêmicos, porém estudos *in vivo* serão necessários.

## **CAPÍTULO 6: RESULTADOS E DISCUSSÃO – MECANISMOS DE RESISTÊNCIA TUMORAL EM CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (K562) E EM CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (JURKAT)**

Como descrito anteriormente, a resistência à quimioterapia é um dos maiores obstáculos no tratamento das leucemias, pois está associada à ausência de remissão completa e à ocorrência de recidivas em portadores de LA (STEINBACH, LEGRAND, 2007). Estudos demonstraram que a resistência ao tratamento quimioterápico é conferida por dois diferentes mecanismos: MDR e recrudescimento leucêmico (HERR; DEBATIN, 2001; ELSAYED; ISMAIL; MONEER, 2011). A MDR frequentemente resulta da superexpressão de duas famílias de proteínas de membrana, a superfamília das proteínas ABC-transportadoras e a família das proteínas MVP (BORST et al., 2000; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK et al., 2007; RODRIGUES et al., 2012). Essas proteínas são capazes de transportar fármacos para fora das células ou para longe de seus alvos, o que leva à diminuição das concentrações intracelulares de quimioterápicos (LUQMANI, 2005; LAGE, 2008). Além dessas proteínas, outros mecanismos podem estar envolvidos na MDR, como alterações nas vias que regulam a apoptose, a superexpressão de gama-glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GT) e o aumento da concentração de glutathione reduzida (GSH) (RODRIGUES et al., 2012).

### **6.1 EFEITO DOS COMPOSTOS 15, 17 E 19 SOBRE A TRANSCRIÇÃO DO GENE E A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLOS FÁRMACOS *abcc1*/ABCC1 EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA HUMANA K562 E DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA HUMANA JURKAT**

Como citado previamente, a ABCC1 é uma proteína da superfamília ABC-transportadoras, que encontra-se amplamente distribuída em diferentes tecidos (LESLIE, DEELEY, COLE, 2005; COLE, DEELEY, 2006; DEELEY, WESTLAKE, COLE 2006; RODRIGUES et al., 2012). Por ser capaz de transportar um amplo espectro de substratos aniônicos hidrofóbicos através da membrana celular, entre eles, o leucotrieno C<sub>4</sub>, a glutathione oxidada (GSSG) e a GSH; a ABCC1 tem sido associada ao fenômeno MDR (LOE, DEELEY, COLE, 1996; VAN DER DEEN et al.; 2005). O mecanismo de ação

mais aceito para explicar a resistência conferida pela ABCC1 é pela formação de complexos da GSH com agentes quimioterápicos, o que possibilita a extrusão desses compostos pela ABCC1 para fora da célula ou para dentro de vesículas citoplasmáticas (ZAMAN et al., 1995; BORST et al.; 2006; COLE, DEELEY, 2006).

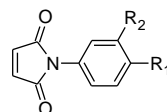
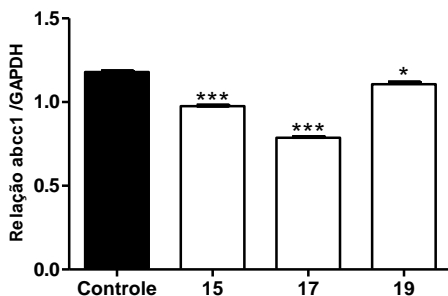
Nesta perspectiva, e com o objetivo de avaliar se a apoptose causada pelos compostos **15**, **17** e **19** envolveria alterações na transcrição ou na expressão da proteína de resistência ABCC1, avaliou-se o efeito dos compostos (**15**, **17** e **19**) sobre a transcrição do gene *abcc1* e a expressão da proteína ABCC1 em células K562 e Jurkat.

Como pode ser observado, no grupo controle (Figura 27, Painel A), as células K562 apresentaram expressão constitutiva de *abcc1*, a qual foi inibida após 6 h de tratamento com os compostos **15**, **17** e **19**. Já nas células Jurkat, a expressão constitutiva da *abcc1*, foi inibida somente pelos compostos **17** e **19** (Figura 27, Painel B).



**Figura 27:** Efeito dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **17** e **19** na transcrição do gene *abcc1* nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfóide aguda (Jurkat).

**A**

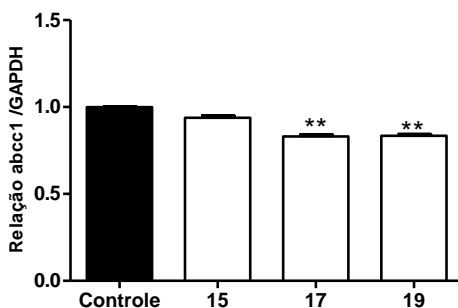


$R_1=H, R_2=H$  (**15**)

$R_1=Cl, R_2=Cl$  (**17**)

$R_1=OCH_3, R_2=H$  (**19**)

**B**

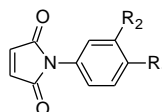
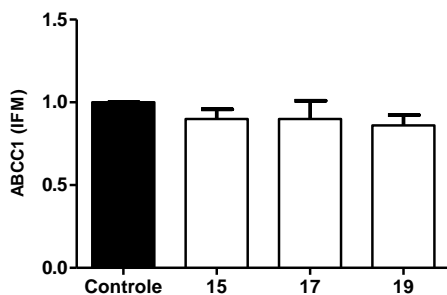


As células K562 (Painel A) e Jurkat (Painel B) foram incubadas com os compostos **15**, **17** e **19**, em suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 horas, por 6 horas. O grupo controle representa as células sem tratamento. Após 6 horas, as células foram lisadas, o RNA total extraído e a reação de RT-PCR realizada. A transcrição dos genes *abcc1* e *gapdh* foram analisadas por eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio. Cada resultado representa a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.

A Figura 28 mostra a expressão da proteína ABCC1 nas células K562 (Painel A) e Jurkat (Painel B) após 24 h de incubação com os compostos **15**, **17** e **19**. Como pode ser observado, quando comparados com o grupo controle, os compostos não causaram alterações significativas na expressão da proteína ABCC1.

**Figura 28:** Efeito dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **17** e **19** na expressão da proteína ABCC1 nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfóide aguda (Jurkat).

A

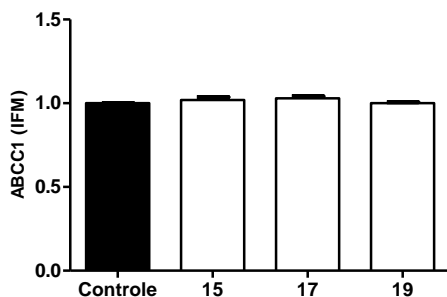


$R_1=H$ ,  $R_2=H$  ( **15** )

$R_1=Cl$ ,  $R_2=Cl$  ( **17** )

$R_1=OCH_3$ ,  $R_2=H$  ( **19** )

B



As células K562 (Painel A) e Jurkat (Painel B) foram incubadas com os compostos **15**, **17** e **19**, em suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h, por 24 h. O grupo controle representa as células sem tratamento. A determinação do índice de fluorescência média (IFM) para avaliação da expressão da proteína ABCC1 foi realizada por citometria de fluxo. Cada resultado representa a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD *FACSCanto*<sup>TM</sup> (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.6. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.

Como pode ser observado nas Figuras 27 e 28, houve divergência entre os resultados da transcrição do gene e da expressão da proteína. Essa divergência, possivelmente, ocorreu devido ao curto tempo de incubação no ensaio de avaliação da expressão fenotípica de ABCC1. Como observado na Figura 27, as células K562 e Jurkat

apresentam expressão constitutiva de ABCC1, provavelmente com o tempo de meia-vida superior a 24 h. Por isso, mesmo que a síntese das proteínas tenha sido diminuída, a sua concentração não se apresenta significativamente reduzida, pois a incubação com os compostos foi de apenas 24 h. Dessa forma, seriam necessários novos ensaios com tempos de incubação superiores a 24 h para avaliar se a expressão fenotípica de ABCC1 será afetada pela diminuição da transcrição gênica gerada pelos compostos estudados.

Na literatura, não foram encontrados estudos que correlacionem o efeito de imidas na transcrição do gene *abcc1* e/ou na expressão de ABCC1. No entanto, um estudo, realizado por Uršiča e colaboradores (2009) demonstrou que o transporte de maleimida para fora das células, pelas proteínas ABCC1, ocorre por meio de conjugação com a GSH. Embora este estudo não possa ser correlacionado com os resultados encontrados no presente trabalho, ele corrobora com o mecanismo de ação mais aceito para explicar o efluxo causado por essa proteína.

## 6.2 EFEITO DOS COMPOSTOS **15**, **17** E **19** SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLOS FÁRMACOS LRP EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA HUMANA (K562) E DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA HUMANA (JURKAT)

Como já mencionado, o mecanismo de ação da LRP no fenótipo MDR ainda não está completamente compreendido (SCHEPER et al., 1993; SCHEFFER et al., 1995). Devido a sua localização nas membranas citoplasmática, vesicular e nuclear, um dos mecanismos de ação proposto para estas proteínas é que elas transportem agentes quimioterápicos através dessas membranas e afastem os fármacos de seus sítios de ação (SWERTS et al., 2008).

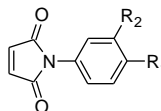
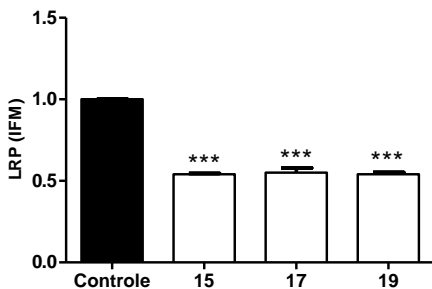
Nesse contexto, e com o objetivo de avaliar se os compostos **15**, **17** e **19**, alterariam a expressão da proteína de resistência LRP, as células K562 e Jurkat foram incubadas com os compostos (**15**, **17** e **19**) e a expressão fenotípica de LRP foi avaliada.

Como pode ser observado na Figura 29, as células K562 (Painel A) incubadas com os compostos **15**, **17** e **19**, por 24 h apresentaram diminuição significativa na expressão de LRP, quando comparadas com o grupo controle (sem tratamento). Já nas células Jurkat (Painel B), essa diminuição ocorreu somente quando as células foram tratadas com o composto **17**. No entanto, a discussão mais abrangente desses resultados

ficou prejudicada, pois não foram encontrados estudos que correlacionem a expressão da proteína LRP com compostos imídicos.

**Figura 29:** Efeito dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **17** e **19** na expressão da proteína LRP nas células de leucemia mieloide aguda (K562) e leucemia linfóide aguda (Jurkat).

**A**

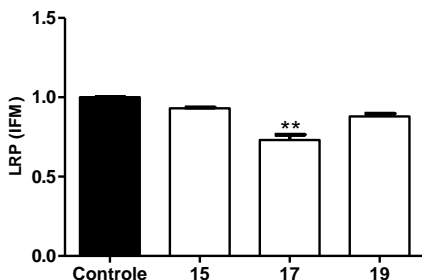


R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H ( **15** )

R<sub>1</sub>=Cl, R<sub>2</sub>=Cl ( **17** )

R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H ( **19** )

**B**



As células K562 (Painel A) e Jurkat (Painel B) foram incubadas com os compostos **15**, **17** e **19**, em suas respectivas CI<sub>50</sub> de 24 h, por 24 horas. O grupo controle representa as células sem tratamento. A determinação do índice de fluorescência média (IFM) para avaliação da expressão da proteína LRP, em cada um dos tempos de incubação, foi realizada por citometria de fluxo. Cada resultado representa a média ± EPM de três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD *FACSCanto*<sup>TM</sup> (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.6. Diferença estatisticamente significante em relação ao grupo controle, \*\**p*<0,01 e \*\*\**p*<0,001, utilizando ANOVA *one way* e post teste *t* de Bonferroni.

Considerando que a expressão das proteínas ABCC1 e LRP, está associada à diminuição da concentração citoplasmática dos quimioterápicos e, conseqüentemente, a uma pior resposta ao tratamento (STEINBACH, LEGRAND, 2007), os resultados aqui expostos são particularmente interessantes, pois demonstram que os compostos (**15**, **17** e **19**) causam apoptose sem estimular o aumento da expressão das proteínas de resistência ABCC1 e LRP, sendo que em algumas situações, a transcrição dos genes responsáveis pela síntese dessas proteínas foi até diminuída.

Como anteriormente mencionada, outro mecanismo envolvido no fenômeno MDR é a alteração da regulação do processo de apoptose. Quando os mecanismos que regulam a apoptose são alterados em favor da sobrevivência das células, eles contribuem para o desenvolvimento e a persistência do câncer, conseqüentemente com o fenômeno MDR (LODISH et al., 2000; REED, 2000; LUQMANI, 2005, RODRIGUES et al., 2012).

Nesse contexto, pode-se citar a Bcl-2 e a survivina, duas proteínas envolvidas na regulação da apoptose, cuja superexpressão contribui para o fenômeno MDR. Essas proteínas pertencem a diferentes famílias e atuam em etapas distintas da apoptose, no entanto, ambas são capazes de inibir a apoptose. Dessa forma, o aumento da sua expressão propicia além do desenvolvimento tumoral, a resistência ao tratamento quimioterápico, e, conseqüentemente, a persistência da neoplasia (SUAREZ et al.; 2001; KUMAR et al.; 2004; FULDA 2008; LACASSE et al.; 2008; RED, 2008; YIP, 2008; FULDA, 2009; RODRIGUES et al., 2012).

No capítulo 5, foi demonstrado que a incubação das células K562 e Jurkat com os compostos **15**, **17** e **19** causou diminuição significativa da expressão de Bcl-2 e survivina (Figura 20 e 24, respectivamente). A diminuição da expressão dessas proteínas induzida pelos compostos propicia não só a indução da apoptose, mas também uma forma de inibir a resistência à quimioterapia em algumas células tumorais que apresentam superexpressão dessas proteínas.

A compilação dessas evidências nos permite demonstrar que os compostos **15**, **17** e **19** além de induzir a apoptose, inibem os mecanismos de resistência à quimioterapia nas células leucêmicas pela redução da transcrição do gene *abcc1* e da diminuição da expressão de LRP, Bcl-2 e survivina. Apesar de todas estas proteínas estarem envolvidas no fenômeno MDR, é importante ressaltar que este é um fenômeno multifatorial e que diferentes células leucêmicas podem apresentar distintos mecanismos de resistência (RODRIGUES et al.,

2012), ressaltando desta forma que mais estudos ainda precisam ser realizados. Os resultados expostos no presente trabalho sugerem promissoras aplicações para os compostos **15**, **17** e **19**.

## CAPÍTULO 7: CONCLUSÕES

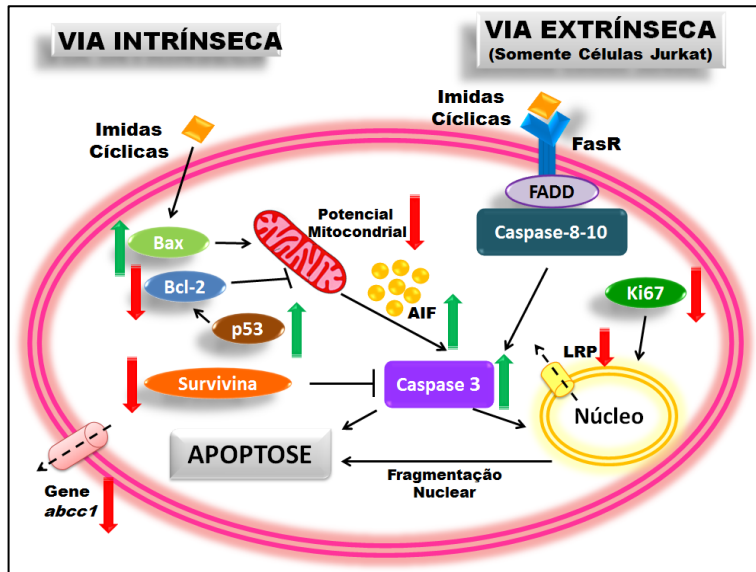
Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

1. O composto derivado de imida cíclica **2** apresentou efeito citotóxico estatisticamente significativo contra as células de melanoma murino B16F10.
2. O composto **2** reduziu a viabilidade celular das células B16F10 de maneira concentração e tempo dependente.
3. O composto **2** causou um bloqueio das fases S e G<sub>2</sub>/M do ciclo celular, nas células B16F10. Além disso, causou aumento na proporção de células B16F10 na fase Sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.
4. O composto **2** causou morte celular por meio da indução da apoptose, nas células B16F10.
5. Os compostos derivados de imidas cíclicas **2** e **15** apresentaram efeito citotóxico estatisticamente significativo contra as células de linhagem de leucemia mieloide aguda humanas (K562).
6. Os compostos **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** causaram redução da viabilidade celular das células humanas de leucemia mieloide aguda (K562) e das células humanas de leucemia linfóide aguda (Jurkat) de maneira da concentração e tempo dependente.
7. Os compostos **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** causam uma baixa citotoxicidade para mononucleares de indivíduos saudáveis.
8. Os compostos **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** causaram bloqueio na fase S do ciclo celular nas células Jurkat e na fase sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, do ciclo celular nas células K562 e Jurkat.
9. Os compostos **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **20** causam morte celular por meio da indução da apoptose, nas células K562 e Jurkat.
10. A apoptose induzida pelos compostos **15**, **17** e **19** envolve a ativação da via intrínseca, evidenciada pela diminuição do potencial mitocondrial, aumento da proteína AIF, diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax, nas células K562 e Jurkat.
11. A apoptose induzida pelos compostos **15** e **17**, em células Jurkat, também envolve a ativação da via extrínseca, que foi evidenciado pelo aumento da expressão do receptor Fas.
12. A apoptose induzida pelos compostos **15**, **17** e **19** envolve ainda o aumento da expressão das proteínas caspase-3 ativa e p53, a diminuição da expressão da proteína antiapoptótica survivina e da expressão da proteína Ki67, nas células K562 e Jurkat.

13. Além dos efeitos nos mecanismos de apoptose, os compostos **15**, **17** e **19** causaram diminuição da expressão constitutiva do gene *abcc1* e da proteína LRP nas células K562 e Jurkat.

Finalmente, como pode ser observado no Esquema 11, a compilação dos resultados obtidos nos permite sugerir que apoptose induzida pelos compostos **15**, **17** e **19**, em células K562 e Jurkat, envolve a ativação da via intrínseca, a qual foi evidenciada pela diminuição do potencial mitocondrial e da expressão da proteína Bcl-2 e pelo aumento da expressão das proteínas AIF e Bax. Além disso, nas células Jurkat, também houve ativação da via extrínseca, que foi evidenciada pelo aumento da expressão do receptor Fas. Os compostos **15**, **17** e **19** provocaram aumento da expressão da caspase-3 ativa e da proteína p53, e a diminuição da expressão das proteínas survivina e Ki67. Também inibiram os mecanismos de resistência à quimioterapia nas células de linhagem de LMA (K562) e de LLA (Jurkat), que foi evidenciado pela redução da transcrição do gene *abcc1* e pela diminuição da expressão de LRP, Bcl-2 e survivina.

**Esquema 11:** Esquema ilustrativo do mecanismo geral de ação das imidas cíclicas, em células K562 e Jurkat.





## PERSPECTIVAS

1. Investigar o efeito, dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **17** e **19**, na expressão do gene *lrp* nas células de linhagem de leucemia linfoblástica aguda (Jurkat) e de leucemia mielóide aguda (K562) de origem humana;
2. Investigar o efeito, dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **17** e **19**, no fenótipo das proteínas de resistência a múltiplas drogas ABCC1 e LRP, em diferentes tempos, nas células de linhagem de leucemia linfoblástica aguda (Jurkat) e de leucemia mielóide aguda (K562) de origem humana;
3. Investigar o efeito, dos compostos derivados de imidas cíclicas **15**, **17** e **19**, na atividade das proteínas de resistência a múltiplas drogas ABCC1 e LRP nas células de linhagem de leucemia linfoblástica aguda (Jurkat) e de leucemia mielóide aguda (K562) de origem humana.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, T.; DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews Cancer**, v.9, n.6, p.400-414, 2009

ADANS, J.M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. **Genes Development**, v.17, n.20, p.2481-2495, 2003

ALONSO, S.R.; OTIZ, P.; POLLÁN, M.; PÉREZ-GOMEZ, B.; SÁNCHEZ, L.; ACUÑA, M.J.; PAJARES, R.; MARTÍNEZ-TELLO, F.J.; HORTELANO, C.M.; PIRIS, M.A.; RODRÍGUEZ-PERALTO, J.L. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: A tissue microarray-based study. **The American Journal of Pathology**, v.164, n.1, p.193-203, 2004.

ALTIERI, D.C. The molecular basis and potencial role of survivin in cancer diagnosis and therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v.7, n.12, p.542-547, 2001.

ANDRICOPULO, A.D. **Síntese de compostos n-aril e n-alquilarilínídicos cíclicos. correlação estrutura química – Atividade biológica**, Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas-CFM- UFSC, 1996.

ANGUIANO-HERNANDEZ, Y.; CHARTIER, A.; HUERTA, S. Smac/DIABLO and colon cancer. **Anti-Cancer Agents Medicinal Chemistry**, v.7, p.467-473, 2007.

ANTONINI, I.; VOLPINI, R.; BEN, D.D.; LAMBERTUCCI, C.; CRISTALLI, G. Design, synthesis, and biological evaluation of new mitonafide derivatives as potential antitumor drugs. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.16, n.18, p.8440-8446, 2008.

AOUALI, N.; EDDABRA, L.; MACADRE, J.; MORJANI, H. Immunosuppressors and reversion of multidrug-resistance. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.56, p.61-70, 2005.

ARORA, A.; ATTWOOD, J. Common skin cancer and their precursors. **Surgical Clinics of North America**, v.89, n.3, p.703-712, 2009.

- ASBURY, R.F.; BLESSING, J.A.; SOPER, J.T. A Gynecologic Oncology Group Phase II Study of Amonafide (NSC # 308847) in Squamous Cell Carcinoma of the Cervix. **American Journal of Clinical Oncology**, v.17, p.125, 1994.
- AUTRET, A.; MARTIN, S. J. Emerging role for members of the Bcl-2 family in mitochondrial morphogenesis. **Molecular Cell**, v. 36, n. 3, p. 355-363, 2009.
- AVVISATI, G.; LOCOC, F.; MANDELLI F. Acute promyelocytic leukemia: clinical and morphological features and prognóctic factors. **Hematology**, v.38, n.1, p. 4-12, 2001.
- AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. Risco crescente de melanoma de pele no Brasil. **Saúde Pública**. São Paulo, v.26, n.4, p.290-294, 1992.
- AZULAY, R.D. Neoplasias melanocíticas e dermatoscopia. **Dermatologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- BAETU, T.M.; HISCOTT, J. On the TRAIL to apoptosis. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v.13, p.199-207, 2002.
- BAILLY, C.; CARRASCO, C.; JOUBERT, A.; BAL, C.; WATTEZ, N.; HILDEBRAND, M.P.; LANSIAUX, A.; COLSON, P.; HOUSSIER, C.; CACHO, M.; RAMOS, A.; BRANÃ, M.F. Chromophore-Modified Bisnaphthalimides: DNA Recognition, Topoisomerase Inhibition, and Cytotoxic Properties of Two Mono- and Bisfuronaphthalimides, **Biochemistry**, v.42, p.4136-4150, 2003.
- BAIN, B.J. **Diagnósticos em Leucemias**. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda; 2003.
- BARBOSA, C.M.P.L. Manifestações músculo-esqueléticas como apresentação inicial das leucemias agudas na infância. **Journal of Pediatrics**, v.78, n.6, p.481-484, 2002.
- BELIZÁRIO, J.E.; ALVES, J.; OCCHIUCCI, J.M.; GARAY-MALPARTIDA, M.; SESSO, A. A mechanistic view of mitochondrial death decision pores. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n.8, p.1011-1024, 2007.

BÉNÉ, M.C.; BERNIER, M.; CASASNOVAS, R.O.; CASTOLDI, G.; DOEKHARAN, D.; VAN DER HOLT, B.; KNAPP, W.; LEMEZ, P.; LUDWIG, W. D.; MATUTES, E.; ORFAO, A.; SCHOCH, C.; SPERLING, C.; VAN'T VEER, M. B. Acute myeloid leukaemia M0: haematological, immunophenotypic and cytogenetic characteristics and their prognostic significance: an analysis in 241 patients. **British Journal of Haematology**, v.113, n.3, p.737-745, 2001.

BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D.A.; GRALNICK, H.R.; SULTAN, C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **British Journal of Haematology**, v.33, n.4, p.451-458, 1976.

BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; GALTO, D.A.G.; GRALNICK, H.R.; SULTAN, C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French American British Cooperaive Group. **Annals of Internal Medicine**, v.103, p.620-625, 1985.

BENNETT, J.M.; BERGER, R.; CATOVSKY, D. Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukemias. Second MIC Cooperative Study Group. **British Journal of Haematology**, v.68, p.487-494, 1988.

BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0). **British Journal of Haematology**, v.78, p.325-329, 1991.

BENETT, D.C. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. **Oncogene**, v.22, p.3063-3069, 2003.

BITTENCOURT, R.; FOGLIATO, L.; DAUDT, L.; BITTENCOURT, H.N.S.; FRIEDERICH, J.R.; FERNANDES, F.; ONSTEN, T.; FASSINA, K.; ROCHA, L.K.; MORENO, F.; SILVA, G.; CRUZ, M.S.; GARCIA, R.G.; WASNIEVSKI, J.C.; SILLA, L.M.R. Leucemia Mielóide Aguda: Perfil de Duas Décadas do Serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – RS. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.25, n.1, p. 17-24, 2003.

BOATRRIGHT, K.M.; RENATUS, M.; SCOTT, F.L.; SPERANDIO, S.L SHIN, H.; PEDERSEN, I.M.; RICCI, J.E.; EDRIS, W.A., SUTHERLIN, D.P.; GREEN, D.R.; SALVESN, G. S. A unified model for apical caspase activation. **Molecular Cell**, v.11, n.2, p.529-541, 2003

BOATRRIGHT, K.M.; SALVESEN, G.S. Mechanisms of caspase activation. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, p.725-31, 2003.

BOERSMA, H.H.; KIETTSCLAER, B.L.J.H.; STOLK, L.M.L.; BENNAGHMOUCH, A.; HOFSTRA, L.; NARULA, J.; HEIDENDAL, G.A.K.; REUTELINGSPERGER, C.P.M. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. **Journal of Nuclear Medicine**, v.46, n.12, p.2035-2050, 2005.

BORST, P.; EVERS, R.; KOOL, M.; WIJNHODS, J. A family of transporters: the multidrug resistance-associated proteins. **Journal of the National Cancer Institute**, v.92, n.16, p.1295-1302, 2000

BORST, P.; ELFERINK, R.O. Mammalian ABC transporters in health and disease. **Annual Review of Biochemistry**, v.71, p.537–592, 2002.

BORST, P.; ZELCER, N.; VAN DE WETERRING, K.; POOLMAN, B. On the putative co-transport of drugs by multidrug resistance proteins. **FEBS Letters**, v.580, n. 4, p.1085-1093, 2006.

BOUJRAD, H.; GUBKINA O.; ROBERT N.; KRANTIC S.; SUSIN S. A. AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die. **Cell Cycle**, v.6, n.21, p.2612-2619, 2007.

BOUMENDJEL, A.; BOUTONNAT, J.; ROBERT, J., Eds.; **In ABC trans-porters and multidrug resistance**; Wang, B., Ed.; Drug Discovery and Development; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, USA, 2009

BRANA, M.F.; CASTELLANO, J.M.; PERRON, D.; MAHER, C.; CONLON, D.; BOUSQUET, P.F.; GEORGE, J.; QIAN, X.D.; ROBINSON, S.P.; Chromophoremodified bis-naphthalimides: synthesis and antitumor activity of bisdibenz[de,h]isoquinoline-1,3-diones. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.40, p.449-454, 1997.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry (Mosc)**, v.70, n.2, p. 231-239, 2005.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2009.

CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.; NETO, A.S.O.; VALLE, R.M.R.; RAE, G.A.; BRAZ, J. Antispasmodic effects of an alkaloid extracted from *Phyllanthus sellowianus*: a comparative study with papaverine. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.17, p.313, 1984.

CAMPBELL, M.K. **Bioquímica/ Mary K Campbell**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2006. 752 p.

CECHINEL FILHO, V.; BELLA CRUZ, A.; MORETTO, E.; PINHEIRO, T.; NUNES, R.J.; YUNES, R.A.; Antibacterial activity of n-phenilmaleimides, n-phenilsuccinimides and related compounds. Structure-activity relationships. **IL Fármaco**, v.49, p.675-677, 1994.

CECHINEL FILHO, V.; CAMPOS, F.; CORRÊA, R.; YUNES, R.A.; NUNES, R.J. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da Literatura. **Química Nova**, v.26, n.2, p.230-241, 2003.

CHAU, D.T.; KORSMEYER, S.J. Bcl-2-Family: regulators of cell death. **Annual Review of Immunology**, v.16, p.395-419, 1998.

CHAUHAN, P. S.; BHUSHAN, B.; SINGH, L. C.; MISHRA, A. K.; SALUJA, S.; MITTAL, V.; GUPTA, D. K.; KAPUR, S. Expression of genes related to multiple drug resistance and apoptosis in acute leukemia: response to induction chemotherapy. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 92, n. 1, p. 44-9, 2012.

CHEN, G.; GOEDDEL, D.V. TNF-R1 Signaling: a beautiful pathway. **Science**, v.296, p.1634-1635, 2002.

CHEN, Z.; LIANG, X.; ZHANG, H.; XIE, H.; LIU, J.; XU, Y.; ZHU, W.; WANG, Y.; WANG, X.; TAN, S.; KUANG, D.; QIAN, X.J. A new class of naphthalimide-based antitumor agents that inhibit

topoisomerase II and induce lysosomal membrane permeabilization and apoptosis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.53, n.6, p. 2589-2600, 2010.

CHINKWO, K.A. *Surtherleia frutescens* extracts can induce apooptosis in cultured carcinoma cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, p.163-170, 2005.

CHIPUK, J.E. BOUCHIER-HAYES, L.; GREEN, D.R. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. **Cell Death and Differentiation**, v.13, n.8, p.1396-1402, 2006.

COHEN, P.R.; TALPAZ, M.; KURZROK, R. Malignancy-associated Sweet's syndrome: review of the world literature. **Journal of Clinical Oncology**, v.6, p.1887-1897, 1988.

COLE, S.P.; DEELEY, R.G. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.27, n.8, p.438-446, 2006.

CORNELL, R.F.; PALMER, J. Adult acute leukemia. **Dis Mon**, v.58, n.4, p.219-38, 2012.

CORY, S.; ADAMS, J.M. The bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Review**, v.2, p.647-656, 2002.

COSTACHE, M.; SIMIONESCU, O.; SAJIN, M.; CHEFANI, A.; ENE, A.M.; TEODOROV, A.M.; LONICA, E. Apoptosis in cutaneous melanomas. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v.48, n.4, p.343-247, 2007.

COSTANZA M.E.; BERRY D.; HENDERSON I.C.; RATAIN M.J.; WU K.; SHAPIRO C.; DUGGAN D.; KALRA J.; BERKOWITZ, L.Y.S.S. Amonafide: An active agent in the treatment of previously untreated advanced breast cancer – a cancer and leukemia group B study (CALGB 8642). **Clinical Cancer Research**, v.7, p.699-704, 1995.

CRAWFORD, E.D.; WELLS, J.A. Caspase substrates and cellular remodeling. **Annual Review of Biochemistry**, v.80, p.1055-87, 2011.



DEAN, M.; HAMON, Y.; CHIMINI, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **The Journal of Lipid Research**, v.42, n.7, p.1007-1017, 2001.

DEBNATH, J.; BAEHRECKE, E.H.; KROEMER, G. Does autophagy contribute to cell death ? **Autophagy**, v.1, n.2, p. 66-74, 2005.

DEELEY, R.G.; WESTLAKE, C.; COLE, S.P. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. **Physiological Reviews**, v.86, n.3, p.849-899, 2006.

DESTANCHINA, E.; CURRACH, M.E.; ZINDY, F.; SHIEH, S.Y.; FERBEYRE, G.; SAMUELSON, A.V.; PRIVES, C.; ROUSSEL, M.F.; SHERR, C.J.; LOWE, S.W. E1A signaling to p53 involves the p19 (ARF) tumor suppressor. **Genes and Development**, v.12, p.2434-2442, 1998.

DILLER, L.; LI, F.P. Epidemiology of cancer in childhood. In: NATHAN, D.G.; ORKIN, S.H. (Eds). **Haematology of infancy and childhood**. 5 ed, cap 27, Philadelphia: Saunders, 1998.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v.35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ELSAIED, G.M.; ISMAIL, M.M; MONEER, M.M. Expression of P-glycoprotein, Cyclin D1 and Ki-67 in acute lymphoblastic leukemia: relation with induction chemotherapy and overall survival. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v.27, n.3, p.157-163, 2011

ENARI, M.; SAKAHIRA, H.; YOKOMA, H.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; NAGATA, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**, v.391, n.6662, p.43-50, 1998

ENGELAND, M.V.; NIELAND, L.J.W.; RAMAEKERS, F.C.S.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C.P.M. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v.31, n.1, p.1-9, 1998.

ESTEY, E.H. Therapeutic options for acute myelogenous leukemia. **Cancer**, v.92, n.5, p.1059-1073, 2001.

FENECH, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. **Drug Discovery Today**, v.7, p.1128-1137, 2002.

FERLAY, J.; SHIN, H. R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M. GLOBOCAN 2008 v1.2, **Cancer Incidence and Mortality Worldwide**: IARC Cancer Base N<sup>o</sup>.10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year> Acesso em: 06 de dezembro de 2012.

FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

FERRI, K.F.; KROEMER, G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. **Nature Cell Biology**, v.3, p.255-263, 2001.

FINE, H.A.; FIGG, W.D.; JAECKLE, K.; WEN, P.Y.; KYRITSIS, A.P.; LOEFFLER, J.S.; LEVIN, V.A.; BLACK, P.M.; KAPLAN, R.; PLUDA, J.M.; YUNG, W.K. Phase II trial of the antiangiogenic agent thalidomide in patients with recurrent high-grade glioma. **Journal of Clinical Oncology**, v.18, p.708-715, 2008.

FOLKMAN, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v.82, p.4-6, 1990.

FOURNEL, M.; TRACHY-BOURGET, M.C.; YAN, P.T.; KALITA, A.; BONFILS, C.; BEAULIEU, C.; FRECHETTE, S.; LEIT, S.; ABOU-KHALIL, E.; WOO, S.H.; DELORME, D.; MACLEOD, A.R.; BESTERMAN, J.M.; LI, Z. Sulfonamide anilides, a novel class of histone deacetylase inhibitors, are antiproliferative against human tumors. **Cancer Research**, v.62, n.15, p. 4325-30, 2002.

FRANKS, L.M.; TEICH, N.M. **Introduction to the cellular and molecular biology of cancer**. Oxford University Press Inc: New York, 1998.

FRENZEL, A.; GRESPI, F.; CHMELEWSKI, W.; VILLUNGER, A. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. **Apoptosis**, v.14, n.4, p. 584-596, 2009.

FULDA, S. Targeting inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) for cancer therapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.8, p.533-539, 2008.

FULDA, S. Cell death in hematological tumors. **Apoptosis**, v.14, n.4, p.409-423, 2009.

GAMAGE, S.A.; SPICER, J.A.; FINLAY, G.J.; STEWART, A.J.; CHARLTON, P.; BAGULEY, B.C.; DENNY, W.A.; Dicationic bis(9-methylphenazine-1-carboxamides): relationships between biological activity and linker chain structure for a series of potent topoisomerase targeted anticancer drugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.44, p.1407-1415, 2001.

GARBE, C.; EIGENTLER, T.K.; KEILHOLZ, U.; HAUSCHILD, A.; KIRKWOOD, J.M. Systematic review of medical treatment in melanoma: Current status and future prospects. **Oncologist**, v.16, n.1, p.5-24, 2011.

GELLER, A.C. Screening for melanoma. **Dermatologic Clinics**, v.20, p.629-640, 2002.

GENG, C.X.; ZENG, Z.C.; WANG, J.Y. Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. **World Journal of Gastroenterology**, v.9, p.696-700, 2003.

GHOBRAL, I.M.; WITZIG, T.E.; ADJEI, A.A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA: A Cancer journal for clinicians**, v. 55, n. 3, p. 178 – 194, 2005.

GHOSH, J. C.; ALTIERI, D. C. Activation of p53-Dependent Apoptosis by Acute Ablation of Glycogen Synthase Kinase-3 beta in Colorectal Cancer Cells. **Clinical Cancer Research**, v.11, p.4580-4588, 2005.

GOL B, J.; ZAGOZDZON, R.; KAMINSKI, R.; KOZAR, K.; GRYSKA, K.; IZYCKI, D.; MACKIEWICZ, A.; STOKLOSA, T.; GIEMASZ, A.; LASEK, W.; JAKOBISIAK, M. Potentiated

antitumor effectiveness of combined chemo-immunotherapy with interleukin-12 and 5-fluorouracil of L1210 leukemia in vivo. **Leukemia**, v.15, n.4, p.613-620, 2001.

GONG, J.; TRAGANOS, F.; DARZYNKIEWICZ, Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. **Analytical Biochemistry**, v.218, n.2, p. 314-319, 1994.

GOTTESMAN, M.M.; FOJO, T.; BATES, S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nature Reviews Cancer**, v.2, p. 48-58, 2002.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, p.335-343, 2007.

GU, B.; ZHU, W.G. Surf the post translational modification network of p53 regulation. **International journal of biological science**, v. 8, n.5, p. 672 – 684, 2012.

GUERCI, A.; MERLIN, J.L.; MISSOUM, N.; FELDMANN, L.; MARCHAL, S.; WITZ, F.; ROSE, C.; GUERCI, O. Predictive value for treatment outcome in acute myeloid of cellular daunorubicin accumulation and P-glycoprotein simultaneously determined by flow cytometry. **Blood**, v.85, n.8, p.2147-2153, 1995

GUPTA, S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **Life Sciences**, v.69, p.2957-2964, 2001.

HAIL J.R,N.; CARTER B.Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v.11 p.889–904, 2006.

HAJRA, K M.; LIU, J.R. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis**, v.9, p.691-704, 2004.

HALL, I.H.; WONG, O.T.; SCOVILL, J.P.The cytotoxicity of Npyridinyl and N-quinolinyl substituted derivates of phthalimide and succinimide. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.5, p.251-258, 1995.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, p.57-7-, 2000.

HARGREAVES, M.K.; PRITCHARD, J.G.; DAVE, H.R. Cyclic Carborylic Monoimides. **Chemical Reviews**, v.70, p.439, 1970.

HARIKUMAR, K.B.; KUNNUMAKKARA, A.B.; AHN, K.S.; ANAND, P.; KRISHNAN, S.; GUHA, S.; AGGARWAL, B.B. Cells. **Blood**, v.113, n.9, p.2003-2013, 2009.

HARTWELL, L.H.; WEINERT, T.A. Checkpoints: Controls that Ensure the Order of Cell Cycle Events. **Science**, v.246, p.629-634, 1989.

HERR, I.; DEBATIN, K.M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood**, v.98, n.9, p.2603-2614, 2001.

HICKMAN, J.A. Apoptosis induced by anticancer drugs. **Cancer and Metastasis Review**, v.11, p.121-139, 1992.

HIRATSUKA, S.; WATANABE, A.; ABURATANI, H.; MARU, Y. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. **Nature Cell Biology**, v.8, p.1369-1375, 2006.

HOFFMAN, R.; BENZ, J.E.; SHATTIL, S.J.; FURIE, B.; COHEN, H.J.; SILBERSTEIN, I. (eds). **Hematology: Basic Principles and Practice**. 4 ed. St Louis, Missouri: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

HOMSI, J.; KASHANI-SABET, M.; JANE, L. Cutaneous melanoma: prognostic factors. **Cancer Control**, v.12, n.4, p.223-229, 2005.

HOOD, J.L.; SAN, R.S.; WICKLINE, S.A. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. **Cancer Research**, v.71, p.3792-3801, 2011.

HU, L.; LI, Z.; WANG, Y.; WU, Y.; JIANG, J.; BOYKIN, D.W. Novel pyridinyl and pyrimidinylcarbazole sulfonamides as antiproliferative agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letter**, v.17, n.5, p.1193-1196, 2007.

HUNTER, A. M.; LACASSE, E. C.; KORNELUK, R.G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. **Apoptosis**, v.12, p.1543-1568, 2007.

HWU, W.J.; KROWN, S.E.; MENELL, J.H.; PANAGEAS, K.S.; MERRELL J.; LAMB, L.A.; WILLIAMS, L.J.; QUINN, C.J.; FOSTER, T.; CHAPMAN, P.B.; LIVINGSTON, P.O.; WOLCHOK, J.D.; HPUGHTON, A.N. Phase II study of temozolomide plus thalidomide for the treatment of metastatic melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v.21, p.3351-3356, 2003.

IBRAHIM, N.; HALUSKA, F.G. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. **The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v.4, p.551-579, 2009.

INCA. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

INCA. **ABC do Câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2012.

INGRASSIA, L.; LEFRANC, F.; KISS, R.; MIJATOVIC, T. Naphthalimides and azonafides as promising anti-cancer agents. **Current Medicinal Chemistry**, v.16, n.10, p.1192-213, 2009.

JAFFE, E.S.; HARRIS, N.L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J.W. World health organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. **Lyon**, 2001.

JOHNSON, D.G.; WALKER, C.L. Cyclins and cell cycle checkpoints. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.39, p.295-312, 1999.

KANG, M.H.; REYNOLDS, C.P. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. **Clinical Cancer Research**, v.15, p.1126-1132, 2009.

KASTAN, M.B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v.18, n.432, p.316– 323, 2004.

KAUFMANN, S.H.; VAUX, D.L. Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. **Oncogene**, v.22, p.7414-7430, 2003.

KEBRIAELI, P.; ANASTASI, J.; LARSON, R.A. Acute lymphoblastic leucemia: diagnosis and classification. **Best Practice and Research Clinical Hematology**. v.15, n.4, p.597-621, 2003.

KELVES, D.J. **A Busca impopular: uma história de coragem, vírus e câncer em histórias esquecidas da ciência**. Rio de Janeiro: Editora Paz e Terra, p.61-91, 1997.

KENDALL, J.D.; REWCASTLE, G.W.; FREDERICK, R.; MAWSON, R.; DENNY, W. A.; MARSHALL, E.S.; BAGULEY, B.C.; CHAUSSADE, C.; JACKSON, S.P.; SHEPHERD, P.R. Synthesis, biological evaluation and molecular modelling of sulfonohydrazides as selective PI3K p110alpha inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letter**, v.15, n.24, p.7677-7687, 2007.

KERR, J.F.R.; GOBE, G. C.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Anatomical methods in cell death. **Methods Cell Biology**, v.46, p.1-27, 1995.

KIER, L.B.; ROCHE, E.B. Medicinal chemistry of the mesoionic compounds. **American Pharmaceutical Association**, v.56, n.2, p.149-168, 1967.

KOH, H.K.; GELLER, A.C. Public health interventions for melanoma: prevention, early detect and education. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v.12, n.4, p.903-928, 1998.

KOURTI, M.; VAVASTSI, N.; GOMBAKIS, N.; SIDI, V.; TZIMAGIORGIS, G. PAPAGEORGIU, T.; KOLIOUSKAS, D.; ATHANASSIADOU, F. Expression of multidrug resistance 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein 1 (MRP1), lung resistance protein (LRP) and breast cancer resistance protein (BCRP) genes and clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. **International Journal of Hematology**, v.86, n.2, p.166-173, 2007.

KRISHNA, R.; MAYER, L.D. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR

modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.11, n.4, p.265-283. 2000.

KROEMER, G.; EL-DEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P.; PETER, M.E.; VAUX, D.; VANDENABEELE, P.; ZHIVOTOVSKY, B.; BLAGOSKLONNY, M.V. MALORNI, W.; KNIGHT, R.A.; PIACENTINI, M.; NAGATA, S.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell death and differentiation**. v.12, p.1463-1467, 2005.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiological Reviews**, v.87, p.99 -163, 2007.

KUMAR, M.V.; SHIRLEY, R.; MA, Y.; LEWIS, R.W. Role of genomics-based strategies in overcoming chemotherapeutic resistance. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.5, p.471-480, 2004.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ASTER, I. **Patologia bases patológicas das doenças**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KUO, M. T. Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.11, n.1, p.99-133. 2009.

KUSENDA, J. Bcl-2 family proteins and leukemia. Minireview. **Neoplasma**, v.45, n.3, p.117-122, 1998.

KUTUK, O.; BASAGA, H. Bcl-2 protein family: Implications in vascular apoptosis and atherosclerosis. **Apoptosis**, v.11, p.1661-1675, 2006.

LABI, V.; GRESPI, F.; BAUMGARTNER, F.; VILLUNGER, A. Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetic: a breakthrough in anticancer therapy? **Cell death and differentiation**, v.15, p.977-987, 2008.

LACASSE, E.C.; MAHONEY, D.J.; CHEUNG, H.H.; PLENCHETTE, S.; BAIRD, S.; KORNELUK, R.G. IAP-targeted therapies for cancer. **Oncogene**, v.27, n.48, p.6252-6275, 2008.



LAGE, H. An overview of cancer multidrug resistance: a still un-solved problem. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.65, p.3145-3167, 2008.

LARSON, R. A. Is secondary leukemia an independent poor prognostic factor in acute myeloid leukemia? **Best Practice and Research Clinical Haematology**, v. 20, n. 1, p. 29-37, 2007.

LAUTRETTE, C.; LOUM-RIBOT, E.; PETIT, D.; VERMOT-DESROCHES, C.; WIJDENES, J.; JAUBERTEAU, M. O. Increase of Fas-induced apoptosis by inhibition of extracellular phosphorylation of Fas receptor in Jurkat cell line. **Apoptosis**, v.11, p.1195–1204, 2006.

LEIST, M.; NICOTERA, P. The shape of cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v.236, n.1, p. 1-9, 1997

LEITH, C.P.; KOPECKY, K.J.; GODWIN, J.; MCCONELL, T.; SLOVAK, M.L.; CHEN, I.M.; HEAD, D.R.; APPELBAUM, F.R.; WILLMAN, C.L. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetic distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. **Blood**, v.89, n.9, p.3323-3329, 1997.

LESLIE, E.M.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.204, n.3, p.216-237, 2005.

LI, X.; LIN, Y.; WANG, Q.; YUAN, Y.; ZHANG, H.; QIAN, X. The novel anti-tumor agents of 4-triazol-1,8-naphthalimides: synthesis, cytotoxicity, DNA intercalation and photocleavage. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, n.4, p.1274-1279, 2011.

LI, Y.; SHAO, J.; SHEN, K.; XU, Y.; LIU, J.; QIAN, X. E2F1-dependent pathways are involved in Amonafide analogue 7-d-induced DNA damage, G2/M arrest, and apoptosis in p53-deficient K562 cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.113, p.3165–3177, 2012.

LIANG, X.; WU, A.; XU, Y.; XU, K.; LIU, J.; QIAN, X. B1, a novel naphthalimide-based DNA intercalator, induces cell cycle arrest and

apoptosis in HeLa cells via p53 activation. **Investigation of New Drugs**, v.29, p.646–658, 2011.

LIANG, X.; XU, Y.; XU, K.; LIU, J.; QIAN, X. B1, a novel Amonafide analogue, overcomes the resistance conferred by Bcl-2 in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Molecular Cancer Research**, v.8, p.1619-1632, 2010.

LIAO X.; TANG, S.; THRASHER, J. B.; GRIEBLING, T. L.; LI, B. Small-interfering RNA-induced androgen receptor silencing leads to apoptotic cell death in prostate cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.4, n.4, p.505-515, 2005.

LINET, M.S. **The leukemia: epidemiologic aspects**. New Your: Oxford University Press, 1985.

LO, J.; MCNAUGHTAN, J.; RANI, V.; MARIC, D.; SMITH, A.; MCCULLOUGH, M.; CHANDU, A. An immunohistochemical analysis of cell cycle markers in oral mucosal dysplastic lesions treated by laser therapy. a pilot study. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, v.10, n.3, p.190-194, 2011.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J E. **Molecular Cell Biology**. New York: W. H. FREEMAN. 2000. 1184 p.

LOE, D.W.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P. Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP. **European Journal of Cancer**, v.32, n.6, p.945-57, 1996.

LOH, W.; COSBY, L.A.; SARTORELLI, A.C.J. Synthesis and antineoplastic activity of phenyl-substituted benzenesulfonylhydrazones of 2-pyridinecarboxyaldehyde 1-oxide. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.23, n.6, p.631-634, 1980.

LOPES, L.F.; MENDES, L.F. Leucemias na Infância. In: De Camargo, B.; Lopes, L.F. **Pediatria Oncológica. Noções Fundamentais para o Pediatra**. LEMAR: São Paulo, 2000.

LOURENCO, J.J.; MAIA, R.C.; SCHEINER, M.A.; VASCONCELOS, F.C.; MOREIRA, M.A. Genomic variation at the MDR1 promoter and

P-glycoprotein expression and activity in AML patients. **Leukemia Research**, v.32, n.6, p.976-979, 2008.

LU, C.;SHERVINGTON, A. Chemoresistance in gliomas. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.312, n.1-2, p.71-80, 2008.

LU, Y.; CHEN, G.Q. Effector caspases and leukemia. **International Journal of Cell Biology**, 2011.

LUQMANY, Y.A. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. **Medical Principles and Practice**, v.14, p.35-48, 2005.

LV, M.; XU, H. Overview of naphthalimide analogs as anticancer agents. **Current Medicinal Chemistry**, p.16, n.36, p.797-813, 2009.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v.9, n.3, p.153-166, 2009.

MELET, A.; SONG, K.; BUCUR, O.; JAGANI, Z.; GRASSIAN, A.R.; KHOSRAVI-FAR, R. Apoptotic pathways in tumor progression and therapy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.615, p. 47- 79, 2008.

MIGNOTTE, B.; VAYSSIERE, J.L. Review Mitochondria and apoptosis. **European Journal of Biochemistry**, v.252, p.1-15, 1998.

MILLER, K.E.; GRACE, J.M.; MACDONALD, T.L.; The Stabilization of DNA Topoisomerase II Cleavable Complex by Mitonafide Analogues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.4, p.1646-1648, 1994.

MILLIGAN, D.; GRIMWADE, D.; CULLIS, J.; SWIRSKY, D.; CRADDOCK, C.; KELL, J. **Guidelines on the management of acute myeloid leukaemia in adults**. London: British Society of Haematology, 2005.

MITA, M.M.; MITA, A.C.; TOLCHER, A.W. Apoptosis: mechanisms and implications for cancer therapeutics. **Targeted Oncology**, v.1, n.4, p.197-214, 2006.

MODJTAHEDI, N.; GIORDANETTO, F.; MADEO, F.; KROEMER, G. Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. **Trends in cell biology**, v.16, n.5, p.264-272, 2006.

MUKHERJEE, A.; DUTTA, S.; SHANMUGAVEL, M.; MONDHE, D.M.; SHARMA, P.R.; SINGH, S.K.; SAXENA, A.K.; SANYAL, U.J. 6-Nitro-2-(3-hydroxypropyl)-1H-benz[de]isoquinoline-1,3-dione, a potent antitumor agent, induces cell cycle arrest and apoptosis. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v.29, p.175, 2010.

MUNOZ-PINEDO, C.; GUIO-CARRION, A.; GOLDSTEIN, J.C.; FITZGERALD, P.; NEWMYER, D.D.; GREEN, D.R. Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.31, p.11573-11578, 2006.

NAKAYAMA, K.; KAMIHIRA, S. Survivin an important determinant for prognosis in adult T-cell leukemia: a novel biomarker in practical hemato-oncology. **Leukemia and Lymphoma**, v.43, n.12, p.2249-2255, 2002.

NCCN. National Comprehensive Cancer Network. **Clinical Practice Guidelines in Oncology: Acute Lymphoblastic Leukemia**. 2012a. Disponível em: <[http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/all.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/all.pdf)>. Acesso em: 28 de agosto de 2012.

\_\_\_\_\_. National Comprehensive Cancer Network. **Clinical Practice Guidelines in Oncology: Acute Myeloid Leukemia**. 2012b. Disponível em: <[http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/aml.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/aml.pdf)>. Acesso em: 28 de agosto de 2012.

NICHOLSON, D.W.; THORNBERRY, N.A. Caspases: killer proteases. **Trends in Biochemical Sciences**, v.22, p.299-306, 1997.

NORGAARD, J. M.; OLESEN, L. H.; HOKLAND, P. Changing picture of cellular drug resistance in human leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 50, n. 1, p. 39-49, 2004.

NORMAN, M.H.; MINICK, D.J.; RIGDON, G.C. Effect of kinking bridge modifications on the antipsychotic profile of some phthalimide and isoindolinone derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.39, p.149-157, 1996.

NORTON, J.T.; WITSCHI, M.A.; LUONG, L.; KAWAMURA, A.; GHOSH, S.; STACK, M.S.; SIM, E.; AVRAM, M.J.; APPELLA, D.H.; HUANG, S. Synthesis and anticancer activities of 6-amino Amonafide derivatives. **Anticancer Drugs**. v.19, n.1, p.23-36, 2008.

NUNES, R.J. **The chemistry and biological activity of cyclic imidobenzenesulphonyl derivatives**. Tesis (PhD). The Hatfield Polytechnic. 1986.

OREN, M. Decision making by p53: life, death and cancer. **Cell death and Differentiation**, v.10, n.4, p.431-442, 2003.

OSKARSSON, T.; ACHARYYA, S.; ZHANG, X.H.; VANHARANTA, S.; TAVAZOIE, S.F.; MORRIS, P.G.; DOWNEY, R.J.; MANOVA-TODOROVA, K.; BROGI, E.; MASSAGUÉ, J. Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. **Nature Medicine**, v.17, p.867-874, 2011.

OTT, I.; XU, Y.; LIU, J.; KOKOSCHKA, M.; HARLOS, M.; SHELDRIK, W.S.; QIAN, X. Sulfur-substituted naphthalimides as photoactivatable anticancer agents: DNA interaction, fluorescence imaging, and phototoxic effects in cultured tumor cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letter**, v.16, n.15, p.7107-7116, 2008.

OTT, I.; QIAN, X.; XU, Y.; VLECKEN, D. H. W.; MARQUES, I. J.; KUBUTAT, D.; WILL, J.; SHELDRIK, W.S.; JESSE, P.; PROKOP, A.; BAGOWSKI, C.P.J. A gold(I) phosphine complex containing a naphthalimide ligand functions as a TrxR inhibiting antiproliferative agent and angiogenesis inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.53, n.3, p.763-770, 2009.

OTT, I.; XU, Y.; QIAN, X.J. Fluorescence properties and antiproliferative effects of mono-, bis-, and tris-thiophenyl naphthalimides: results of a comparative pilot study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.105, n.1, p.75-80, 2011.

OW, Y.L.P.; GREEN, D.R.; HAO, Z.; MAK, T.W. Cytochrome c: functions beyond respiration. **Cancer**, v.9, p.532-542, 2008.

PADRO, S.; CECHINEL-FILHO, V.; CAMPOS-BUZZI, F.; CORRÊA, R.; CADENA, S.; OLIVEIRA, M. Biologics evaluation of some selected cyclic imides: mitochondrial effects and in vitro cytotoxicity. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v.59, p.663-672, 2004.

PAOLUZZI, L.; GONEN, M.; GARDNER, J.R.; MASTRELLA, J.; YANG, D.; HOLMLUND, J.; SORENSEN, M.; LEOPOLD, L.; MANOVA, K.; MARCUCCI, G.; HEANEY, M.L.; O'CONNOR, O. A. Targeting Bcl-2 family members with the BH3 mimetic AT-101 markedly enhances the therapeutic effects of chemotherapeutic agents in in vitro and in vivo models of B-cell lymphoma. **Blood**, v.111, p.5350-5358, 2008a.

PAOLUZZI, L.; GONEN, M.; BHAGAT, G.; FURMAN, R.R.; GARDNER, J.R.; SCOTTO, L.; GUEORGUIEV, V.D.; HEANEY, M.L.; MANOVA, K.; O'CONNOR, O. A. The BH3-only mimetic ABT-737 synergizes the anti-neoplastic activity of proteasome inhibitors in lymphoid malignancies. **Blood**, v.112, p.2906-2916, 2008b.

PEINADO, H.; KOVIĆ, M.A.; LAVOTSHKIN, S.; MATEI, I.; COSTA-SILVA, B.; MORENO-BUENO, G.; HERGUETA-REDONDO, M.; WILLIAMS, C.; GARCÍA-SANTOS, G.; GHAJAR, C.M.; NITADORI-HOSHINO, A.; HOFFMAN, C.; BADAL, K.; GARCIA, B.A.; CALLAHAN, M.K.; YUAN, J.; MARTINS, V.R.; SKOG, J.; KAPLAN, R.N.; BRADY, M.S.; WOLCHOK, J.D.; CHAPMAN, P.B.; KANG, Y.; BROMBERG, J.; LYDEN, D. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. **Nature Medicine**, v.18, n.6, p. 883-891, 2012.

PEJOVIC, T.; SCHWARTZ, P.E. Leukemias. **Clinical Obstetrics and Gynecology**. v.45, p.866-878, 2002.

PERES, C.M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005, 283p.

PETROS, A.M.; OLEJNICZAK, E.T.; FESIK, S.W.; Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochimica at Biophysica Acta**, v.1644, p.83– 94, 2004.

POSTOVIT, L.M.; SEFTOR, E.A.; SEFTOR, R.E.; HENDRIX, M.J. Influence of the microenvironment on melanoma cell fate determination and phenotype. **Cancer Research**, v.66, n.16, p.7833-7836, 2006.

PUI, C.H. Acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Clinics of North America**, v.44, n.4, 1997.

PUI, C. H.; EVANS, W. E. Acute lymphoblastic leukemia. **The New England Journal of Medicine: Research and Review Articles**. v.339, n.9, p.605-615, 1998.

PUI, C.H.; SANDLUND, J.T.; PEI, D; CAMPANA, D.; RIVERA, G.K; RIBEIRO, R.C.; RUBNITZ, J.E.; RAZZOUK, B.I.; HOWARD, S.C.; HUDSON, M.M.; CHENG, C.; KUN, L.E.; RAIMONDI, S.C.; BEHM, F.G.; DOWNING, J.R.; RELING, M.V.; EVANS, W. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of total therapy study XIII B at St Jude Children's Research Hospital. **Blood**. v.104, p. 2690-2696, 2004.

PUI, C.H.; ROBISON, L.L.; LOOK, A.T. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**. v.371, n.9617, p.1030-1043, 2008.

PUI, C.H. Acute lymphoblastic leukemia: introduction. **Seminars in Hematology**, v.46, n.1, p.1-2, 2009

QUAQUEBEKE, E.V.; MAHIEU, T.; DUMONT, P.; DEWELLE, J.; RIBAUCOUR, F.; SIMON, G.; SAUVAGE, S.; GAUSSIN, J.F.; TUTI, J.; YAZIDI, M.E.; VYNCKT, F.V.; MIJATOVIC, T.; LEFRANC, F.; DARRO, F.; KISS, R.J. 2,2,2-Trichloro-N-({2-[2-(dimethylamino)ethyl]-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinolin-5-yl} carbamoyl)acetamide (UNBS3157), a novel nonhematotoxic naphthalimide derivative with potent antitumor activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.50, n.17, p.4122-4134, 2007.

RAAIJMAKERS, M.H.G.P. ATP-binding-cassette transporters in hematopoietic stem cells and their utility as therapeutic targets in acute and chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v.21, p.2094–2102, 2007.

RASS, K.; HASSEL, J.C. Chemotherapeutics, chemoresistance and the management of melanoma. **Giornale Italiano di Dermatologia and Venereologia**, v.144, n.1, p.61-78, 2009.

RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P. Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. **Organization**, v.8, p.155-181, 2009.

RATAIN, M.J.; MICK, R.; BEREZIN, F.; JANISCH, L.; SCHILSKY, R.L.; WILLIAMS, S.F.; SMIDDY, J. Paradoxical relationship between acetylator phenotype and amonafide toxicity. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.50, p. 573-579, 1991.

RATAIN, M J.; ROSNER, G.; ALLEN, S L.; COSTANZA, M.; VAN ECHO, D.A.; HENDERSON, I.C.; SCHILSKY, R.L. Population pharmacodynamic study of amonafide: a Cancer and Leukemia Group B study. **Journal of Clinical Oncology**, n.13, p. 741-747, 1995.

RATAJCZAK, J.; WYSOCZYNSKI, M.; HAYEK, F.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.; RATAJCZAK, M.Z. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. **Leukemia**, v.20, p.1487-1495, 2006.

REED, J. C. Drug insight: cancer therapy strategies based on restoration of endogenous cell death mechanisms. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v.3, p.388-398, 2006.

REED, J.C. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. **Blood**, v.111, p.3322-3330, 2008.

RENVOIZÉ, C.; BIOLA, A.; PALLARDY, M.; BRÉARD, J. Apoptosis: identification of dying cells. **Cell Biology and Toxicology**, v.14, n.2, p.111-120, 1998.

RIEDL, S.J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.5, n.11, p.897-907, 2004.

RING, J.; SOMMER, C.; CARMONA-GUTIERREZ, D.; RUCKENSTUHL, C.; EISENBERG, T.; MADEO, F. The metabolism beyond programmed cell death in yeast. **Experimental Cell Research**, v.318, n.11, p.1193-1200, 2012.



ROBAK, T.; WIERZBOWSKA, A. Current and Emerging Therapies for Acute Myeloid Leukemia. **Clinical Therapeutics**, v.31, p.2349-2370, 2009.

ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

RODRIGUES, A.R.; DINIS, J.; GROMICHO, M.; MARTINS, C.; LAIRES, A.; RUEFF, J. Genomics and Cancer Drug Resistance. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.13, p.651-673, 2012.

ROLLAND, S.G.; CONRADT, B. New role of the bcl-2 family of proteins in the regulation of mitochondrial dynamics. **Current Opinion in Cell Biology**, v.22, n.6, p.852-858, 2010.

ROME, L.; KEDERSHA, N.; CHUGANO, D. Unlocking vaults: organelles in search of a function. **Trends in Cell Biology**, v.1, n.2-3, p.47-50, 1991.

ROSA, J.; SYDOR, A.; JURCZYSZYN, A.; ZABAWA-HOŁYŚ, S.; NOWAK, J.; CZAPKOWICZ-GRYSZKIEWICZ, L.; SUŁOWICZ, W. Withdrawal of maintenance dialysis in a patient with diagnosed multiple myeloma and renal failure as a consequence of effective anti-tumor treatment. **Przegl Lek**, v.67, n.7, p.547-50, 2010

RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. **Base Clinicopatológicas da Medicina**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

RUBNITZ, J.E. Childhood acute myeloid leukemia. **Current Treatment Options in Oncology**, v.9, n.1, p.95-105, 2008.

RUVOLO, P.P.; DENG, X.; MAY, W.S. Phosphorylation of bcl-2 and regulation of apoptosis. **Leukemia**, v.15, n.4, p.515-522, 2001.

SÁNCHEZ-SUÁREZ, P.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; GALLEGOS-HERMÁNDEZ, F.; PEÑARROJA-FLORES, R. TOLEDP-GARCIA, J.; BRAVO, J.L.; DEL CASSTILLO, E.R.; BENÍTEZ-BRIBIESCA, L. DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer. **Mutation Research**, v.640, p.8-15, 2008.

SANDLER, D.P.; ROSS, J.A. Epidemiology of acute leukemia en children and adults. **Seminars in Oncology**, v.24, p.3-16, 1997.

SANTOS-SILVA, M.C. **Efeito Citotóxico do Óxido Nítrico e do Taxol sobre células linfoblásticas leucêmicas: envolvimento do fator de transcrição nF- κB e papel da Glutathione**. Florianópolis: UFSC, 2002

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Research**, v.45, p.528-537, 2000.

SATAYAMOORTHY, K.; HERLYN, M. Cellualr and molecular biology of human melanoma. **Cancer Biology and Therapy**, v.1, n.1, p.14-17, 2002.

SAX, J.K.; FEI, P.; MURPHY, M.E. BERNHARD, E.; KORSMEYER, S.J, EL-DEIRY, W.S. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. **Nature Cell Biology**, v.4, n.11, p.842-849, 2002.

SCHAFER, K.A. The Cell Cycle: A Review. **Veterinary Pathology**, v.35, n.6, p.461-478, 1998.

SCHAICH, M.; SOUCEK, S.; THIEDE, C.; EHNINGER, G.; ILLMER, T. MDR1 and MDR2 gene expression are independent predictors for treatment outcome in adult acute myeloid leukemia. **British Journal of Haematology**, v.128, n.3, p.324-332, 2005.

SCHEFFER, G.L.; WIJNGAARD, P.L.; FLENS, M.J.; IZQUIERDO, M.A.; SLOVAK, M.L.; PINEDO, H.M. The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. **Nature Medicine**, v.1, p.578-582, 1995.

SCHEPER, R.J.; BROXTERMAN, H.J.; SCHEFFER, G.L.; KAAIJK, P.; DALTON, W.S.; VAN HEIJNINGEN, T.H.; VAN KALKEN, C.K.; SLOVAK, M.L.; DE VRIES, E.G.; VAN DER VALK, P.; ET AL Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. **Cancer Research**, v.53, n.7, p.1475-1479, 1993.

SCHMITZ, I.; KIRCHHOFF, S.; KRAMMER, P.H. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.32, p.1123-1136, 2001.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v.182, p.311-322, 2000.

SCHWARTZ, G.K.; SHAH, M. Targeting the Cell Cycle: A new approach to cancer therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v.23, n.36, p.9408-9421, 2005.

SEKERES, M. A.; ELSON, P.; KALAYCIO, M. E.; ADYANI, A. S.; COPELAN, E. A.; FADERL, S.; KANTARJIAN, H. M.; ESTEY, E. Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. **Blood**, v. 113, p. 28-36, 2009.

SENDEROWICZ, A.M. Novel direct and indirect cyclin-dependent kinase modulators for the prevention and treatment of human neoplasms. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.52 p. 61-73, 2003.

SEVRIOUKOVA, I.F. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.14, n.12, p.2545-2579, 2011.

SHAFFER, B. C.; GILLET, J. P.; PATEL, C.; BAER, M. R.; BATES, S. E.; GOTTESMAN, M. M. Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML. **Drug Resistance Updates**, v. 15, n. 1-2, p. 62-9, 2012.

SHAH, M.; AGARWAL, B. Recent advances in management of acute myeloid leukemia (AML). **Indian Journal of Pediatrics**, v.75, n.8, p.831-837, 2008.

SHEARWIN-WHYATT, L.M.; KUMAR, S. Caspases in Developmental Cell Death. **Life**, v.48, p.143–150, 1999

SHERIDAN, C.; DELIVANI, P.; CULLEN, S.P.; MARTIN, S.J. Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. **Molecular cell**, v.31, n.4, p. 570-585, 2008.

SHIPLEY, J.L.; BUTERA, J.N. Acute myelogenous leukemia.

**Experimental Hematology**, v.37, n.6, p.649-58, 2009.

SINGHAL, S.; MEHTA, J.; DESIKAN, R.; AYERS, D.; ROBERSON, P.; EDDLEMON, P.; MUNSHI, N.; ANAISSIE, E.; WILSON, C.; DHODAPKAR, M.; ZEDDIS, J.; BARLOGIE, B. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. **The New England Journal of Medicine**, v.341, n.1, p.565-571, 1999.

SKOG, J.; WÜRDINGER, T.; VAN RIJN, S.; MEIJER, D.H.; GAINCHE, L.; SENA-ESTEVEZ, M.; CURRY, W.T.JR.; CARTER, B.S.; KRICHEVSKY, A.M.; BREAKFIELD, X.O. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nature Cell Biology**, v.10, p.1470–1476, 2008.

SORTINO, M.; CECHINEL-FILHO, V.; CORREIA, R.; ZACCHINO. N-Phenyl and N-phenylalkyl-maleimides acting against *Candida* spp.: Time-to-kill, stability, interaction with maleamic acids. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.16, p.560-568, 2008.

SPEIRS, C.K.; HWANG, M.; KIM, S.; LI, W.; CHANG, S.; VARKI, V.; MITCHELL, L.; SCHLEICHER, S.; LU, B. Harnessing the cell death pathway for targeted cancer treatment. **American Journal of Cancer Research**, v.1, n.1, p.43-61, 2011.

SPIERINGS, D.; MCSTAY, G.; SALEH, M.; BENDER, C.; CHIPUK, J.; MAURER, U.; GREEN, D.R. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. **Science**, v.310, n. 5745, p.66-67, 2005

STEINBACH, D.; LEGRAND, O. ABC transporters and drug resistance in leukemia: was P-gp nothing but the first head of the Hydra? **Leukemia**, v.21, p.1172-11, 2007.

STRATIGOS, A.J.; KATSAMBAS, A.D. The value of screening in melanoma. **Clinics in Dermatology**, v.27, p.10–25, 2009.

SUAREZ, L.; VIDRIALES, B.; GARCIA-LARANA, J.; LOPEZ, A.; MARTINEZ, R.; MARTIN-REINA, V.; TORMO, M.; GONZALES-SAN MIGUEL, L.D.; LAVILLA, E.; GARCIA-BOYERO, R.; ORFAO,

A.; SAN MIGUEL, J.F. Multiparametric analysis of apoptotic and multidrug resistance phenotypes according to the blast cell maturation stage in elderly patients with acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v.86, n.12, p.1287-1295, 2001.

SWERDLOW, S.H.; CAMPO, E.; HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; PILERI, S.A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J.W. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4 ed. Geneva: WHO Press, 2008.

SWERTES, K.; DE MOERLOOSE, B.; DHOOGHE, C.; LAUREYS, G.; BENOIT, Y.; PHILIPPE, J. Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukemia. **European Journal of Cancer**, v.42, n.3, p.295-309, 2008.

TAIT, S.W.G.; GREEN, D.R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.11, n.9, p.621-32, 2010.

TARN, W.Y.; LAI, M.C. Translational control of cyclins. **Cell Division**, v.6, n.1, p.1-9, 2011.

THOMAS, X. Chemotherapy of acute leukemia in adults. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v.10, n.2, p.221-37, 2009.

TJALMA, W.; DE CUYPER, E.; WEYLER, J.; VAN MARCK, E.; DE POOTE ALBERTYN, G.; VAN DAM, P. Expression of bcl-2 in invasive and in situ car of the uterine cervix. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.178, n.1, p.113-117, 1998.

TOMATIS, L. Cancer: Causes, occurrence and control. **International Journal of Cancer**, v.48, n.2, p.318, 1991.

TUMIATTI, V.; MILELLI, A.; MINARINI, A.; MICCO, M.; CAMPANI, A.G.; RONCUZZI, L.; BAIOCCHI, D.; MARINELLO, J.; CAPRANICO, G.; ZINI, M.; STEFANELLI, C.; MELCHIORRE, C. Design, synthesis, and biological evaluation of substituted naphthalene imides and diimides as anticancer agent. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.52, p.7873-7877, 2009.

URŠIČA, D.; BERGINCB, K.; ŽAKELJB, S.; KRISTLB, A. Influence of luminal monosaccharides on secretion of glutathione conjugates from rat small intestine in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, v.382, n.2, v.199-204, 2009.

VALERA, E. T.; SCRIDELI, C.A.; QUEIROZ, R.G.P.; MORI, B.M.O.; TONE, L.G. Multiple drug resistance protein (MDR-1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. **São Paulo Medicinal Journal**, v.122, n.4, 2004.

VAN DE LOOSDRECHT, A.A.; NENE, E.; OSSENKOPPELE, G.J.; BEELEN, R.H.J.; LANGENHUIJSE, M.M.A.C. Cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified molorimetric MTT assay. **Journal of Immunological Methods**, v.141, p.15-22, 1991.

VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M.; VAN DER HOLT, B.; BURNETT, A. K.; KNAUF, W. U.; FEY, M. F.; VERHOEF, G. E.; VELLENGA, E.; OSSENKOPPELE, G. J.; LOWENBERG, B.; SONNEVELD, P. CD34-related coexpression of MDR1 and BCRP indicates a clinically resistant phenotype in patients with acute myeloid leukemia (AML) of older age. **Ann Hematol**, v. 86, n. 5, p. 329-37, 2007.

VAN DER DEEN, M.; DE VRIES, E.G.; TIMENS, W.; SCHEPER, R.J.; TIMMER-BOSSCHA, H.; POSTMA, D.S. ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal nad pathological lung. **Respiratory Research**, v.6, p.59, 2005.

VARDIMAN, J.W.; THIELE, J.; ARBER, D.A.; BRUNNING, R.D.; BOROWITZ, M.J.; PORWIT, A.; HARRIS, N.L.; LE BEAU, M.M.; HELLSTRÖM-LINDBERG, E.; TEFFERI, A.; BLOOMFIELD, C.D. 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, 2009.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D.R.; BERNEMAN, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v.36, n.3, p.131-149, 2003.

VINCENZO T. V.; MILELLI, A.; MINARINI, A.; MICCO, M.; CAMPANI, A. G.; RONCUZZI, L.; BAIOCCHI, D.; MARINELLO, J.; CAPRANICO, G.; ZINI, M.; STEFANELLI, C.; MELCHIORRE, C. Design, synthesis, and biological evaluation of substituted naphthalene imides and diimides as anticancer agent. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.52, p.7873–7877, 2009.

WAINSTEIN, A.J.A.; BELFORT, F.A. Conduta para melanoma cutâneo. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v.31, n.3, p.204-214, 2004.

WANG, Z.Y.; CHEN, Z. Differentiation and apoptosis induction therapy in acute promyelocytic leukaemia. **The Lancet Oncology**, v.1, p.101-6, 2000.

WARGO, J.A.; TANABE, K. Surgical management of melanoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v.23, n.3, p.565-581, 2009.

WARR, M.R.; SHORE, G.C. Small-molecule Bcl-2 antagonists as targeted therapy in oncology. **Current Oncology**, v.15, p.256-261, 2008.

WATERHOUSE, J. Cancer incidence in five continents. **Lyon: IARC**, 1987.

WEINLICH, G.; BITTERLICH, V.; FRITSCH, P.O.; ZELGER, B. Metallothionein overexpression as a prognostic factor for progression and survival in melanoma. A prospective study on 520 patients. **British Journal of Dermatology**, v.149, n.3, p.535-541, 2003.

WELCH, D.R.; GOLDBERG, S.F. Molecular mechanisms controlling human melanoma progression and metastasis. **Pathobiology**, v.65, p.311-330, 1997.

WHO - World Health Organization. **The World Health Report 1998: Life in the 21st century a vision for all**. Geneva, p.61-111, 1998.

WHO. **World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer>>. Acesso em jan. 2012.

WILLIAMS, W. **Hematologic diseases**. 7 ed. Marshall A.: Lichtman, 2006.

WOOD, P.; BURGESS, R.; MACGREGOR, A.; YIN, J.A. P-glycoprotein expression on acute myeloid leukemia blast cells at diagnosis predicts response to chemotherapy and survival. **British Journal of Haematology**, v.87, n.3, p.509-514, 1994.

WRZESIEN-KUS, A.; SMOLEWSKI, P.; SOBCZAK-PLUTA, A.; WIERBOWSKA, A.; ROBAK, T. The inhibitor of apoptosis protein family and its antagonists in acute leukemia. **Apoptosis**, v.9, n.6, p.705-715, 2004.

WU, A.; XU, Y.; QIAN, X.; WANG, J.; LIU, J. Novel naphthalimide derivatives as potential apoptosis-inducing agents: design, synthesis and biological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.44, n.11, p.4674-4680, 2009.

WU, A.; MEI, P.; XU, Y.; QIAN, X. Novel naphthalimide–benzoic acid conjugates as potential apoptosis-inducing agents: design, synthesis, and biological activity. **Chemical Biology and Drug**, v.78, p.941–947, 2011.

XIE, L.; CUI, J.; QIAN, X., XU, Y.; LIU, J.; Xu, R. 5-Non-amino aromatic substituted naphthalimides as potential antitumor agents: Synthesis via Suzuki reaction, antiproliferative activity, and DNA-binding behavior. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.19 p.961–967, 2011a.

XIE, S.; LI, Q.; ZHANG, Y.; WANG J.; MEI, Z.; ZHAO, J. WANG, C. NPC-16, a novel naphthalimide–polyamine conjugate, induced apoptosis and autophagy in human hepatoma HepG2 cells and Bel-7402 cells. **Apoptosis**, v.16, p.27–34, 2011b.

XIE, S.; ZHANG, W.; LI, Q.; XU, F.; MIAO, J.; ZHAO, J.; WANG, C. 3-Nitro-naphthalimide and nitrogen mustard conjugate NNM-25 induces hepatocellular carcinoma apoptosis via PARP-1/p53 pathway. **Apoptosis**, v.17, p.725–734, 2012.

YIP, K.W.; REED, J.C. Bcl-2 family proteins and cancer. **Onco-gene**, v.27, p.6398-6406, 2008.



YIPP, B.G.; PETRI, B.; SALINA, D.; JENNE, C.N.; SCOTT, B.N.V.; ZBYTNUK, L.D.; PITTMAN, K.; ASADUZZAMAN, M.; WU, K.; MEIJNDERT, H.C.; MALAWISTA, S.E.; CHEVANCE, A.B.; ZHANG, K.; CONLY, J.; KUBES, P. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. **Nature Medicine**, v.8, n.9, p.1386-1393, 2012.

YOULE, R.J.; STRASSER, A. The bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, p.47-59, 2008.

YUNES, J.A.; CARDOSO, A.A.; YUNES, R.A.; CORRÊA, R.; CAMPOS-BUZZI, F.; CECHINEL FILHO, C. Antiproliferative effects of a series of cyclic imides on primary endothelial cells and a leukemia cell line. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.63, p.675-680, 2008.

ZAFFARONI, N.; PENNATI, M.; DAIDONE, M.G. Survivin as a target for new anticancer interventions. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.9, n.2, p.360-372, 2005.

ZAGO, M.; FALCÃO, R.; PASQUINI, R. **Hematologia Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2005.

ZAMAN, G.J.; LANKELMA, J.; VAN TELLINGEN, O.; BEIJNEN, J.; DEKKER, H.; PAULUSMA, C.; OUDE ELFERINK, R.P.; BADD, F.; BORTS, P. Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, v.92, n.17, p.7690-7694, 1995.

ZHU, H.; HUANG, M.; YANG, F. et al. R16, a novel amonafide analogue, induces apoptosis and G2-M arrest via poisoning topoisomerase II. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.6, p.484-495, 2007.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences**, v.19, p.124-28, 2004.