Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Rachell Ramalho Correia Thimóteo

Estudo da relação estrutura-atividade antineoplásica *in vitro* de análogos cíclicos da terpenila-nitrona LQB-278

Rio de Janeiro

2017

Rachell Ramalho Correia Thimóteo

Estudo da relação estrutra-atividade antineoplásica *in vitro* de análogos cíclicos da terpenila-nitrona LQB-278

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dra. Kátia Costa de Carvalho Sabino

Coorientadora: Prof.ª Dra. Maria da Graça Justo Araújo

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

T443 Thimóteo, Rachell Ramalho Correia.
Estudo da relação estrutura-atividade antineoplásica *in vitro* de análogos cíclicos da terpenila-nitrona LQB-278/ Rachell Ramalho Correia Thimóteo. – 2017.
102 f.

Orientadora: Kátia Costa de Carvalho Sabino.
Coorientadora: Maria da Graça Justo Araújo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Agentes antineoplásicos – Teses. 2. Ciclo celular – Teses. 3. Apoptose – Teses. 4. Aldeídos – Teses. 5. Nitronas – Mecanismos de formação – Teses. 6. Leucemia - Teses. I. Sabino, Kátia Costa de Carvalho. II. Justo, Maria da Graça. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 615.277.3

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB7/4780

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Rachell Ramalho Correia Thimóteo

Estudo da relação estrutra-atividade antineoplásica *in vitro* de análogos cíclicos da terpenila-nitrona LQB-278

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 01 de fevereiro de 2017.

Orientadora: Prof.ª Dra. Kátia Costa de Carvalho Sabino
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientadora: Prof.ª Dra. Maria da Graça Justo Araújo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. Andre Luiz Mencalha
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Prof. Dr. Ayres Guimarães Dias
Instituto de Química – UERJ

_____

Prof.ª Dra. Maria da Fonte de Amorim
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro
2017

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação de mestrado ao meu marido, que sempre esteve ao meu lado, me oferecendo apoio e estímulo em todos os momentos. Sem sua força, compreensão, amor e motivação, muitas das minhas realizações acadêmicas não seriam possíveis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela capacitação e por todas as oportunidades que pude desfrutar durante esse percurso, as quais me renderam muito aprendizado e alegrias.

Aos meus pais Fátima e Francisco, meu irmão Raphael, minha cunhada Maiara, meus primos, tios, enfim, todos os meus familiares, que me ofereceram suporte, força, carinho e motivação.

A minha nova família Thimóteo, qual fui recebida de coração e braços abertos. O carinho, amor e apoio de todos meus novos primos, tios e cunhado foram fundamentais por toda essa caminhada. Minha sogra Vera, meus tios Mauro, Ane e Luzia sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e motivando em todos os momentos.

Aos amigos, da faculdade, do laboratório e da vida, pelo companheirismo, apoio e pelos momentos de descontração ao longo do desenvolvimento da tese. Um agradecimento especial à minhas irmãs de coração Alessandra e Karen.

Ao meu primo Fabrício, pela amizade, carinho e força que se mostraram presentes em todos aos momentos.

Às minhas orientadoras Dra. Katia Costa de Carvalho Sabino e Dra. Graça Justo, por todo aprendizado, dedicação e paciência, e que pela quais possuo grande admiração e servem de inspiração para o meu desenvolvimento acadêmico.

Aos professores Dr. Ayres Guimarães Dias, do Instituto de Química da UERJ, e Dr. Paulo Roberto Ribeiro Costa, do Intituto de Pesquisa em Produtos Naturais, da UFRJ, pela síntese e doação dos análogos cíclicos da terpenila-nitrona LQB-278 e discussões sempre oportunas e importantes durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores, funcionários e amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais (LIA-BPPN), onde desenvolvi o presente trabalho, por toda a ajuda e agradável convivência.

Aos diversos professores do curso da pós-graduação, por serem excelentes profissionaise pessoas maravilhosas, fontes inspiradoras e motivadoras dos meus estudos.

E por fim, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro e ao Coordenaçãode Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.

Isaac Newton

RESUMO

THIMÓTEO, Rachell Ramalho Correia. **Estudo da relação estrutra-atividade antineoplásica *in vitro* de análogos cíclicos da terpenila-nitrona LQB-278**. 2017. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

O câncer representa atualmente um grave problema de saúde pública, e diversas pesquisas buscam desenvolver novas moléculas que possuam propriedades farmacológicas duplas, assegurando melhor eficácia terapêutica e menor efeito colateral. O estudo da relação estrutura-atividade de diferentes protótipos tem revelado importantes moléculas com ação antitumoral. O LQB-278, por exemplo, foi sintetizado a partir da inserção do fragmento terpênico geranila no anel aromático do N-Fenil-t-butilnitrona, e apresentou importante ação antileucêmica *in vitro*. Este trabalho estudou a interferência de modificações estruturais no terpenila nitrona LQB-278 com relação à ação antineoplásica *in vitro*, avaliando também o ciclo celular, a morte celular por apoptose e a expressão de p21. A citotoxicidade foi avaliada pela técnica do MTT, sobre linhagens celulares leucêmicas (Jurkat e K562) e tumores sólidos (PC3, A549 e MCF-7); além de células não tumorais (fibroblastos NIH-3T3 e células mononucleares de sangue periférico humano). As células foram cultivadas e tratadas ou não com as substâncias em estudo por 72h. A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio de exclusão com azul de Tripan, e o ciclo celular, a morte celular por apoptose e a expressão de p21 foram realizadas por citometria de fluxo em células Jurkat. A leucemia linfocítica Jurkat foi a linhagem celular tumoral que se mostrou mais sensível às moléculas em estudo, com IC50 de 2,6 ± 0,6 µM, 1,4 ± 0,4 µM e 2,8 ± 0,3 µM, para LQB-292, LQB-287 e LQB-461, respectivamente. Tais moléculas mostraram baixa ação citotóxica sobre células não tumorais. Estes LQBs reduziram ($p<0,05$) a produção *in vitro* de NO, mas também induziram morte de macrófagos RAW 264.7. Os três LQBs mais ativos reduziram significativamente a proliferação de células Jurkat em todas as concentrações testadas. O LQB-287 aumentou a expressão de p21, sem alterar o ciclo celular ou induzir morte. O LQB-461, nas concentrações de 2 µM e 3 µM, e o LQB-292, na concentração de 1 µM, também não alteraram o ciclo celular ou induziram morte celular. O LQB-461 também mostrou aumento na expressão de p21 nestas concentrações. Por outro lado, o LQB-461 a 5 µM aumentou ($p<0.05$) o percentual de células na fase sub-G1, sugerindo morte celular, diminuindo G1 e G2/M (9,0± 3,3 %), sem alterar a fase S. O LQB-292 a 3 µM e 5 µM também mostrou aumento ($p<0,05$) da fase sub-G1, com diminuição nas fases G1, S e G2/M. O ensaio de anexina-V confirmou a indução de apoptose, tanto inicial como tardia, para o LQB-461 a 5 µM e LQB-292 a 3 µM e 5 µM. Podemos concluir que: 1) A ciclização do radical terpenila aumentou a atividade antitumoral, sendo a posição orto e os grupamentos aldeído e nitrona essenciais para sua função. 2) A linhagem Jurkat foi a mais sensível ao tratamento, com baixa toxicidade para células não tumorais. 3) A inibição da produção *in vitro* de NO, pelos LQBs, não foi muito importante, já que tais moléculas também induziram morte celular; 4) O LQB-287 parece possuir ação citostática, aumentando a expressão de p21; 5) O LQB-461 e o LQB-292 induzem efeitos diferentes em função da concentração, possuindo uma aparente ação citostática, nas menores concentrações, e ação citotóxica, em concentrações maiores, com aumento na expressão de p21 e morte celular por apoptose.

Palavras chave: Antitumoral. Ciclo celular. Apoptose. Aldeído. Nitrona. Leucemia.

ABSTRACT

THIMÓTEO, Rachell Ramalho Correia**. Study of the *in vitro* antineoplastic structure-activity relationship of cyclic analogues of terpenyl-nitronase LQB-278**. 2017. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Cancer currently represents a serious public health problem, and several studies are searchinh develop new molecules that have double pharmacological properties, ensuring therapeutics efficacy and lower collateral effects. The study of the structure-activity relationship of different molecules has revealed important prototypes with antitumor action. LQB-278, for example, was synthesized from the insertion of the geranyl terpene fragment into the aromatic ring of N-Phenyl-t-butylnitrone, and showed an important *in vitro* antileukemic action. This work studied the interference in the structural modifications of terpenyl nitrona LQB-278 concerning antineoplastic action *in vitro*, also evaluating the cell cycle, cell death by apoptosis and expression of p21. Cytotoxicity was measured by MTT assay with leukemic cell lines (Jurkat and K562) and solid tumors (PC3, A549 and MCF-7); In addition to non-tumor cells (NIH-3T3 fibroblasts and human peripheral blood mononuclear cells). The cells were cultured and treated or not with the test substances for 72h. Cell proliferation was assessed by the Tripan blue dye exclusion assay, and the cell cycle, apoptosis and p21 expression were performed by flow cytometry in Jurkat cells. The Jurkat lymphocytic leukemia was the most sensitive tumor cell line to the molecules under study, showing IC_{50} of 2.6 ± 0,6 μM, 1.4 ± 0,4 μM and 2.8 ± 0,3 μM for LQB-292, LQB-287 and LQB-461, respectively. Such molecules showed low cytotoxic action on non-tumor cells. These LQBs reduced ($p < 0.05$) *in vitro* NO production, but also induced RAW 264.7 macrophage death. The three most active LQBs significantly reduced the proliferation of Jurkat cells at all concentrations tested. LQB-287 increased p21 expression, without altering the cell cycle or inducing death. LQB-461 at 2 μM and 3 μM, and LQB-292 at 1 μM concentration, also did not alter the cell cycle or induced cell death. LQB-461 also showed increased p21 expression at these concentrations. On the other hand, LQB-461 at 5 μM increased ($p < 0.05$) the percentage of cells in the sub-G1 phase, suggesting cell death, decreasing G1 and G2/M, without altering S phase. The LQB-292 at 3 μM and 5 μM also showed an increase ($p < 0.05$) in the sub-G1 phase, with a decrease in G1, S and G2/M phases. The annexin-V assay confirmed the induction of apoptosis, both early and late, for LQB-461 at 5 μM and LQB-292 at 3 μM and 5 μM. We can conclude that: 1) The cyclization of the terpenyl radical increased the antitumor activity, with the ortho position and the aldehyde and nitrone groups being essential for its function. 2) The Jurkat cell line was the most sensitive to treatment, with low toxicity to non-tumor cells. 3) Inhibition of *in vitro* NO production by LQBs was not a lot important, since such molecules also induced cell death; 4) LQB-287 seems to have cytostatic action, increasing p21 expression; 5) LQB-461 and LQB-292 induce different effects as a function of their concentration, having an apparent cytostatic action, at lower concentrations, and cytotoxic action, at higher concentrations, promoting of p21 expression and apoptosis cell death.

Keywords: Antitumoral. Cell cycle. Apoptosis. Aldehyde. Nitrone. Leukemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do PBN, geraniol e LQB-278. 31
Figura 2 – Estrutura química da terpenila-nitrona LQB-278 e dos seus análogos cíclicos. 33
Figura 3 – Regulação do ciclo celular de mamíferos por complexos CDCs/ciclina e CDCIs. ... 37
Figura 4 – Visão geral das vias extrínseca e intrínseca de ativação da apoptose..... 41
Figura 6 – Estrutura química dos análogos mais ativos em células leucêmicas Jurkat. 57
Figura 7 – Efeito do LQB-292, LQB-287, LQB-461 e Etoposídeo sobre a viabilidade celular em Jurkat..... 58
Figura 8 – Efeito do LQB-287, LQB-292 e LQB-461 sobre a viabilidade da linhagem NIH-3T3. 60
Figura 9 – Toxicidade dos análogos LQB-287, LQB-292 e LQB-461 em CMNSP. 61
Figura 10 – Efeito do LQB-287, LQB-292 e LQB-461 na produção de NO e viabilidade de células RAW-264-7. 63
Figura 11 – Histogramas representativos da análise do ciclo celular de células Jurkat. 65
Figura 12 – Efeito do LQB-287, LQB-292 e LQB-461 na proliferação e no ciclo celular de células Jurkat. 66
Figura 13 – Efeito do LQB-287, LQB-292 e LQB-461 na apoptose de células Jurkat. 69
Figura 14 – Efeitos do LQB-287, LQB-292 e LQB-461 na indução de apoptose em células Jurkat..... 71
Figura 15 – Efeitos do LQB-287, LQB-292 e LQB-461 na expressão de p21 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Inflamação crônica e predisposição ao desenvolvimento de câncer 19
Tabela 2 – Taxas de mortalidade por todas as neoplasias. 21
Tabela 3 – Taxas de mortalidade por leucemia por 100.000 homens e mulheres, Brasil, entre 2010 e 2013..... 23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	Fator de Indução de Apoptose
ALL	Leucemia Linfocítica Aguda
APAF-1	Fator de Ativação de Apoptose 1
ARM	Atividade Redutora Mitocondrial
CDC	Cinases Dependentes de Ciclinas
CDCI	Inibidores de Cinases Dependentes de Ciclinas
CMNSP	Célula Mononuclear de Sangue Periférico Humano
COX 2	Ciclo-oxigenase 2
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
INCA	Instituto Nacional do Câncer
i-NOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
IPPN	Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LPS	Lipopolissacarídeo de *E. Coli*
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5difenil-tetrazol brometo
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
PBN	*N*-Fenil-*t*-Butilnitrona
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Nuclear
PE	Anticorpo p21 marcado com Ficoeritrina
PHA	Fitohemaglutinina
PI	Iodeto de Propídeo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
TGF-β	Fator de Transformação do Crescimento β
TNFR	Receptores do Fator de Necrose Tumoral
TRAIL	Ligante Indutor de Apoptose Relacionado ao TNF
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 13

1 **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** 17

1.1 **O câncer** 17

1.1.1 Definição de câncer e o seu desenvolvimento 17

1.1.2 Incidência do câncer 20

1.2 **Leucemias** 22

1.3 **O tratamento do câncer** 24

1.3.1 Principais tipos de tratamento 24

1.3.2 Tratamento das leucemias 25

1.4 **Hibridização molecular e síntese de agentes antitumorais** 27

1.4.1 Terpenila-nitrona LQB-278 28

1.4.2 Análogos cíclicos da terpenila nitrona LQB-278 32

1.5 **Estudos *in vitro* – Ação antitumoral** 34

1.5.1 Ciclo celular 35

1.5.2 Apoptose 39

2 **OBJETIVO GERAL** 43

2.1 **Objetivos específicos** 43

3 **MATERIAL** 44

3.1 **Análogos cíclicos da terpenila nitrona LQB-278** 44

3.2 **Linhagens celulares** 44

3.3 **Reagentes** 45

3.4 **Equipamentos e softwares** 45

3.5 **Material descartável e vidrarias especiais**. 46

4 **METODOLOGIA** 47

4.1 **Manutenção das linhagens celulares** 47

4.2 **Isolamento e cultura de células mononucleares de sangue periférico** 47

4.3 **Efeitos estudados dos análogos da terpenila nitrona LQB-278** 48

4.3.1 Ensaio de citotoxidade 48

4.3.2 Produção e dosagem de óxido nítrico 49

4.3.3 Análise do ciclo celular 51

4.3.4 Análise de apoptose por marcação com anexina-V 51

4.3.5 Expressão da proteína p21 53

4.3.6 Análise estatística 54
5 **RESULTADOS** 55
5.1 **Ratreamento da atividade citotóxica *in vitro* das moléculas análogas ao LQB-278** . 55
5.2 **Citotoxidade do LQB-287, LQB-292 e LQB-461 em células não tumorais** 59
5.3 **Avaliação do potencial anti-inflamatório *in vitro* do efeito dos tratamentos com as drogas LQB-287, LQB-292 e LQB-461** 62
5.4 **Efeito dos tratamentos com LQB-287, LQB-292 e LQB-461 no crescimento e ciclo celular** 64
5.5 **Efeito dos tratamentos com LQB-287, LQB-292 E LQB-461 na apoptose de células Jurkat** 67
5.6 **Efeito dos tratamentos com LQB-287, LQB-292 E LQB-461 na expressão de p21** . 72
6 **DISCUSSÃO** 74
CONCLUSÕES 83
REFERÊNCIAS 84

INTRODUÇÃO

O câncer pode ser caracterizado como uma doença que, através da desregulação de múltiplas vias de sinalização, promove um aumento descontrolado e anormal de células (Patel et al., 2016; Hjelmeland e Zhang, 2016). No Brasil, esta patologia ocupa a segunda posição em causas de morte, com 190 mil óbitos anuais e uma estimativa de aproximadamente 596 mil novos casos para 2016/2017 (INCA, 2016a). A Agência de Pesquisa do Câncer estima um aumento de 75% no número de novos casos da doença no mundo durante as próximas duas décadas, caracterizando um problema de saúde pública global (Carlson, 2016). Dentre os diferentes tipos de câncer, as leucemias podem ser definidas como um tipo de câncer que acomete as células da medula óssea prejudicando a formação normal de células do sangue (Amitay e Keinan-Boke, 2015). Representam o principal tipo de câncer infantil no Brasil e no mundo, e a principal causa de morte de crianças em países em desenvolvimento (Randhawa e Ferrajoli, 2015; Amitay e Keinan-Boke, 2015; Reis et al., 2016; Barrington-Trimis, 2016; INCA, 2016a).

O tratamento do câncer depende do desenvolvimento e malignidade do tumor, consistindo de modo geral, em cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia (Almeida *et al.,* 2005; Morgan, 2003). Para o tratamento das leucemias, é recomendada a associação de diversos medicamentos, conhecido como poliquimoterapia (Randhawa e Ferrajoli, 2015; Jabbour *et al.*, 2016; INCA, 2016b; Cancer Research UK, 2016), o que acarreta fortes efeitos colaterais, podendo levar à morte do paciente (De Angelo *et al.*, 2016; Deol *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2016; Cancer Research UK, 2016). Nesse contexto, a busca por novas substâncias para o tratamento do câncer e das leucemias continuam representando uma vertente importante das pesquisas científicas atuais (Hayakawa *et al.*, 2016), e a química farmacêutica medicinal tem trago importantes colaborações com os processos de hibridização e modificação molecular na criação de novos fármacos para o tratamento do câncer (Kuduk et al, 1999; Zask et al, 2005; Wermuth, 2004, 2008; Viegas-Junior et al., 2007, 2009; Barreiro & Fraga, 2008; Yu et al, 2016, Nagarsenkar et al, 2016).

Pesquisas nesta área têm associado a ação antitumoral a substâncias derivadas dos terpenos (Burke *et al.*, 1997, Yu *et al*, 1995; Haug *et al.*,, 1994; Bhalla *et al*., 2015; Kuttan *et al*., 2011; Li *et al*, 2016) e do *N*-Fenil-t-butilnitrona (PBN) (Ramadan *et al.*, 2006, Inoue *et al.*, 2007; Asanuma *et al.*,, 2008; Doblas *et al.*, 2008; Floyd *et al.*, 2008, 2010, 2011; Floyd *et*

al., 2010, 2011; Townwe *et al.*, 2013). Neste contexto, diferentes moléculas híbridas de terpenila-nitronas foram sintetizadas pelo Dr. Ayres Guimarães Dias do Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e Dr. Paulo Roberto Ribeiro Costa do Laboratório de Química Bioorgânica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, com quem colaboramos, e a relação estrutura-atividade desses compostos foi avaliada. Foi demonstrado, então, que a inserção do fragmento geranila na posição orto do PBN gerou uma nova molécula, o LQB-278, com importante atividade antileucêmica (Costa *et al.*, 2015).

Tendo verificado os resultados promissores do LQB-278 (Costa *et al.*, 2015), decidiu-se, no presente trabalho, dar continuidade aos estudos desta molécula, visando analisar a relação estrutura-atividade de um outro grupo de moléculas, análogas ao LQB-278, sintetizadas através de modificações estruturais como a ciclização do fragmento terpenila, com o objetivo de otimizar este protótipo quanto ao aumento do efeito antiproliferativo e seletividade para células tumorais.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 O câncer

1.1.1 Definição de câncer e o seu desenvolvimento

Quase três milhões de trabalhos publicados até o momento definem o câncer como uma doença caracterizada pelo aumento descontrolado e anormal de células que surge da desregulação de múltiplas vias de sinalização. (Patel *et al.*, 2016; Hjelmeland e Zhang, 2016). As células cancerígenas possuem algumas características similares, entre elas a proliferação desregulada, a resistência à morte celular, a capacidade de invasão e metástase. A alteração em vias responsáveis pelo controle do metabolismo celular é considerada como uma das forças motrizes para a iniciação e progressão tumoral (Hu *et al.*, 2016; Hjelmeland e Zhang, 2016).

O acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas promovem a iniciação e progressão do câncer (Hjelmeland e Zhang, 2016). Durante o seu desenvolvimento, um grande número de genes, moléculas e vias contribuem para a transformação de células saudáveis em células alteradas, que em seguida, entram no estágio de promoção, onde há o aumento efetivo da proliferação celular. Mutações de genes levando ao aumento de expressão (oncogenes) e/ou diminuição (supressores tumorais) de intermediários das vias de sinalização, conduzem a um aumento da proliferação e desregulação do processo de apoptose (Tafani *et al.*, 2016).

Alterações dos mecanismos de reparo do DNA facilitam o acúmulo de mutações cruciais que levam ao crescimento do tecido, formando a massa tumoral (Tafani *et al.*, 2016). Mudanças na regulação do estresse oxidativo, danos a moléculas e organelas induzidos por espécies reativas, plasticidade metabólica e autofagia também desempenham papéis importantes no desenvolvimento do câncer. No entanto, o impacto destes processos pode variar de acordo com as vias de sinalização alteradas, tipo de tumor, estágio e/ou seu estado de diferenciação (Hjelmeland e Zhang, 2016).

Vários fatores também contribuem para a carcinogênese, tais como erros estocásticos de replicação de DNA, interações entre as células e microambiente tecidual, exposições

ambientais como à radiação, fumo e dieta. Portanto, uma compreensão do desenvolvimento e progressão do câncer requer a elucidação de um conjunto de propriedades da célula dentro de um tecido e sua interação com o microambiente (Altrock *et al.,* 2015).

Neste contexto, é importante ressaltar a íntima relação de causa e efeito entre a inflamação crônica e o desenvolvimento do câncer. Na inflamação crônica ocorre a produção de diversos agentes pró-inflamatórios, que irão promover uma cascata de eventos, podendo resultar em danos no DNA, alterações estruturais e funcionais de proteínas, e alterações na expressão gênica e produção de micro-RNAs. Esses eventos podem disparar um processo carcinogênico, levando à perda da homeostasia e formação do tumor (Medzhitov, 2008; Lonkar e Dedon, 2011; Hjelmeland e Zhang, 2016). Na literatura, diversos trabalhos mostram a relação entre diversas quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias com a progressão tumoral, correlacionando diversos genes, estimulados pela resposta inflamatória, com a supressão de morte celular por apoptose e com o aumento de proliferação, angiogênese, invasão e metástase (Aggarwal *et al*., 2006; Mumm e Oft, 2008; Hjelmeland e Zhang, 2016; Tafani *et al.*, 2016).

O descontrole na síntese de óxido nítrico (NO), importante mediador na inflamação, está também implicado na patogênese do câncer (Costa *et al.*, 2003; Aggarwal *et al.*, 2006; Méndez-Armenta *et al.*, 2014; Hjelmeland e Zhang, 2016; Tafani *et al.*, 2016). Em alguns tumores humanos, como adenocarcinomas de esôfago, subtipos de carcinomas de próstata e em tumores mamários humanos de maior malignidade, foram encontrados níveis elevados de RNAm para a óxido nítrico sintase (i-NOS); e o aumento da síntese de NO atua no crescimento e progressão do mesotelioma maligno e adenocarcinoma metastático de pleura (Costa *et al.*, 2003). Desta forma, agentes anti-inflamatórios apresentam papel importante na prevenção e/ou tratamento do câncer (Costa *et al.,* 2003; Aggarwal *et al.*, 2006; Méndez-Armenta *et al..*, 2014; Hjelmeland e Zhang, 2016; Tafani *et al.,* 2016). A tabela 1 relaciona a inflamação crônica como fator de risco para o desenvolvimento de câncer em diversos órgãos.

Tabela 1- **I**nflamação crônica e predisposição ao desenvolvimento de câncer

CÂNCER ASSOCIADO COM AGENTE INFECCIOSO	
Gastrite	Adenocarcinoma gástrico, linfoma MALT (tecido linfóide associado à mucosa)
Esquistossomose	Carcinoma de bexiga, fígado e reto
Colangite	Colangiocarcinoma; carcinoma de colon
Colicistite	Câncer de vesícula biliar
Hepatite	Carcinoma hepatocelular
Doença inflamatória pélvica (DIP); Cervicite crônica	Carcinoma de ovário; carcinoma cervical
Osteomielite	Carcinoma de pele em drenagem de seio

CÂNCER ASSOCIADO COM OUTRAS ETIOLOGIAS	
Doenças inflamatórias do intestino	Carninoma colorretal
Refluxo esofágico; esôfago de Barret	Carcinoma esofágico
Inflamação de bexiga (cistite)	Câncer de bexiga
Asbestose; silicose	Mesotelioma; câncer de pulmão
Líquen plano; gengivite	Carcinoma oral de células escamosas
Pancreatite; mutações de protease	Carcinoma pancreático
Líquen escleroso;	Carcinoma vulvar de células escamosas
Sialadenite	Carcinoma glândula salivar
Bronquite	Câncer de pulmão
Síndrome de Sjögren; Tiroidite de Hashimoto	Linfoma MALT (tecido linfóide associado à mucosa)

Legenda: Shacter e Weitzman, 2002. Modificado em novembro de 2016

1.1.2 Incidência do câncer

O câncer aparece como principal causa de morte em países desenvolvidos e em segundo lugar nos países em desenvolvimento. De acordo com o aumento de expectativa de vida e envelhecimento da população mundial, levando em consideração hábitos relacionados com o estilo de vida (uso do tabaco, sedentarismo, má alimentação, etc.), estima-se que o câncer continue a manter posição dominante nas taxas de incidência e causas de morte no mundo (Roshandel *et al*., 2014; Muz *et al.,* 2015).

Estudos de incidência mostraram que em 2012 surgiram 14,1 milhões de novos casos de câncer no mundo, com 8,2 milhões de mortes, e 32,6 milhões de indivíduos com a doença. Dessas estatísticas, as regiões menos desenvolvidas representam 57% de novos casos (8 milhões), 65% de mortes por câncer (5,3 milhões) e 48% de indivíduos que prevalecem com a doença (15,6 milhões). Esses dados mostram como as regiões subdesenvolvidas sofrem mais com o maior número de incidência de câncer, representando mais da metade dos valores mundiais (Roshandel *et al.*,2014; Carlson, 2016).

A Agência de Pesquisa do Câncer estima um aumento de 75% nos números de novos casos da doença nas próximas duas décadas, caracterizando um problema de saúde pública mundial (Carlson, 2016). Atualmente no Brasil, o câncer é a segunda principal causa de morte, com um número de 190 mil óbitos por ano e uma estimativa para 2016/2017 de surgimento de aproximadamente 596 mil novos casos da doença (INCA, 2016a).

Essas estimativas representam um grande problema de saúde pública, e grande preocupação para as indústrias farmacêuticas e institutos de pesquisa, que vêm buscando novas estratégias preventivas ou terapêuticas para o tratamento da doença. Na tabela 2 observamos as taxas de mortalidade por neoplasias, relacionadas ao sexo e faixa etária no Brasil, mas também encontramos a taxa padrão mundial de mortalidade comparada à taxa padrão brasileira. Os dados corroboram que o câncer, atualmente, é um grave problema de saúde pública, não apenas no Brasil, ou em países em desenvolvimento, mas em escala mundial.

Tabela 2 – Taxas de mortalidade por todas as neoplasias.

	HOMENS		**MULHERES**	
Faixa etária	N° de óbito	Taxa específica	N° de óbito	Taxa específica
00 a 04	12.860	4,8	10.878	4,19
05 a 09	11.102	4,1	8.168	3,11
10 a 14	10.057	3,7	7.974	2,99
15 a 19	14.222	5,53	10.007	3,88
20 a 29	31.526	7,21	30.301	6,77
30 a 39	56.320	16,4	82.949	23,05
40 a 49	160.305	63,08	183.808	68,92
50 a 59	335.061	197,88	282.083	155,29
60 a 69	465.169	435,39	339.096	280,49
70 a 79	440.613	821,01	326.466	497,35
80 ou mais	236.978	1.282,89	217.580	794,26
Idade ignorada	3.818	224,83	3.106	179,25
TOTAL	**1.778.031**	**---**	**1.502.416**	**---**
TAXA BRUTA	**---**	**72,51**	**---**	**59,67**
TAXA PADRÃO MUNDIAL	**---**	**98,25**	**---**	**70,03**
TAXA PADRÃO BRASIL	**---**	**105,45**	**---**	**75,28**

As taxas representam valores brutos e ajustados por idade, pelas populações mundial e brasileira de 2010, por 100.000 homens e mulheres. A taxa específica refere-se ao risco de ocorrência de um evento (óbitos) devido a um determinado atributo (idade, sexo, estado conjugal, nível sócio-econômico etc) e se traduz pelo quociente entre o total de eventos por determinado atributo e a população sob risco. A taxa bruta refere-se ao risco de ocorrência de um evento (óbitos) e se traduz pelo quociente entre o total de eventos e a população sob risco. Para o cálculo da taxa padrão de mortalidade, adota-se como padrão a população do Brasil em 2000. A população padrão mundial utilizada foi a proposta por Segi (1960), modificada por Doll *et al*. (1966). Fontes: MS/SVS/DASIS/CGIAE/Sistema de Informação sobre Mortalidade – SIM MP/Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE MS/INCA/Conprev/Divisão de Vigilância. Retirado de: ttps://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/

1.2 Leucemias

A Leucemia pode ser definida como câncer da medula óssea que prejudica a formação normal de células do sangue (Amitay e Keinan-Boke, 2015). São diferenciadas de acordo com os tipos de glóbulos brancos que afetam, podendo ser do tipo mieloblástica ou linfocítica (linfoblástica), e pelo seu desenvolvimento, podendo ser aguda ou crônica (Dobbin, 2014). Algumas consequências do quadro leucêmico são hipogamaglobulinemia, depleção e disfunção de células T, comprometimento do sistema imune, suscetibilidade a infecções, e neutropenia, a partir de comprometimento da medula óssea (Randhawa e Ferrajoli, 2015).

Apesar da incidência das leucemias aumentarem a cada ano, e serem a principal causa de morte em crianças em países em desenvolvimento, muito pouco se sabe de sua etiologia. Alguns fatores como a síndrome de Down, a exposição à radiação ionizante e exposição a vírus, tais como o vírus de Epstein-Barr, estão correlacionados com o aumento de risco de leucemia em crianças (Randhawa e Ferrajoli, 2015). Estudos epidemiológicos e clínicos indicam que as leucemias infantis apresentam alterações genéticas somáticas iniciadas durante a vida fetal, possivelmente devido há algum dano ao DNA durante a gravidez, considerando que os fatores ambientais foram altamente associados com casos de leucemia em idade precoce no Brasil (Reis *et al.*, 2016). No entanto, na maioria dos diagnósticos da doença, nenhuns destes fatores de risco encontram-se correlacionados com o aparecimento da leucemia (Randhawa e Ferrajoli, 2015).

A leucemia apresenta grande relevância e preocupação na área clínica, devido ao seu breve período de latência e sua rápida progressão, principalmente em infanto-juvenis (Couto *et al.*, 2010; Cipolat *et al.*, 2011; Pui e Evans, 2006; Diller, 2011). Na tabela 3, podemos observar que, apesar de representar uma neoplasia de alta incidência na infância (Randhawa e Ferrajoli, 2015; Amitay e Keinan-Boke, 2015), segundo dados do INCA, a faixa etária com maior índice de mortalidade da doença é de pacientes com mais de 50 anos.

Tabela 3 – Taxas de mortalidade por leucemia por 100.000 homens e mulheres, Brasil, entre 2010 e 2013

	HOMENS		**MULHERES**	
Faixa etária	N° de óbito	Taxa específica	N° de óbito	Taxa específica
00 a 04	470	1,66	425	1,55
05 a 09	566	1,84	334	1,12
10 a 14	541	1,53	414	1,21
15 a 19	646	1,87	412	1,21
20 a 29	983	1,42	715	1,02
30 a 39	928	1,58	823	1,34
40 a 49	1.054	2,17	1.031	1,99
50 a 59	1.528	4,33	1.399	3,58
60 a 69	2.065	9,71	1.780	7,25
70 a 79	2.487	22,34	2.094	14,63
80 ou mais	2.045	44,74	2.044	28,11
Idade ignorada	1	0	0	0
TOTAL	**13.314**	**---**	**11.471**	**---**
TAXA BRUTA	**---**	**3,53**	**---**	**2,92**
TAXA PADRÃO MUNDIAL	**---**	**3,55**	**---**	**2,63**
TAXA PADRÃO BRASIL	**---**	**3,78**	**---**	**2,76**

As taxas representam um estudo de 100.000 homens e mulheres entre 2010 e 2013. A taxa específica refere-se ao risco de ocorrência de um evento (óbito) devido a um determinado atributo (idade, sexo, estado conjugal, nível sócio-econômico, etc), e se traduz pelo quociente entre o total de eventos por determinado atributo e a população sob risco. A taxa bruta refere-se ao risco de ocorrência de um evento (óbito) e se traduz pelo quociente entre o total de eventos e a população sob risco. Para o cálculo da taxa padrão de mortalidade, adota-se como padrão a população do Brasil em 2000. A população padrão mundial utilizada foi a proposta por Segi (1960), modificada por Doll *et al*. (1966). Fontes: MS/SVS/DASIS/CGIAE/Sistema de Informação sobre Mortalidade – SIM MP/Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE MS/INCA/Conprev/Divisão de Vigilância e DATASUS. Retirado de: https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/.gov.br

Anualmente, são diagnosticados cerca de 175 000 casos de câncer infanto-juvenil em todo o mundo; com um aumento na taxa de incidência anual de cerca de 0,9% nos países desenvolvidos (Amitay e Keinan-Boke, 2015). As leucemias se destacam por ser o principal tipo de câncer infantil no mundo, representando cerca de 30% de casos de câncer em crianças e adolescentes, e o tipo de câncer mais comum entre crianças de 0 a 5 anos (Amitay e Keinan-Boke, 2015; Reis *et al.*, 2016; Barrington-Trimis, 2016).

A taxa de sobrevivência de pacientes com leucemia aumentou, significativamente, em países desenvolvidos, devido ao avanço nas tecnologias e novas estratégias de tratamento do câncer. Contudo, este tipo de câncer ainda representa uma das principais causas de morte entre crianças e adolescentes de 1 a 14 anos. Nos Estados Unidos, as leucemias ocupam segundo lugar nas principais causas de morte em infanto-juvenis, enquanto na Ásia, America central, América do Sul, noroeste da África e oriente médio são responsáveis pelo primeiro lugar no índice de mortalidade desta faixa etária (Amitay e Keinan-Boke, 2015).

No Brasil, o número de casos novos de leucemia estimado para o ano de 2016 é de 5.540 casos em homens e de 4.530 em mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, a leucemia em homens é a sexta mais frequente na região Norte, a nona mais frequente em homens e décima primeira em mulheres, nos dados totais de incidência da doença no país, além de ser o principal tipo de tumor infantil (INCA, 2016a).

1.3 O tratamento do câncer

1.3.1 Principais tipos de tratamento

O tratamento do câncer dependerá do grau de malignidade do tumor, consistindo de modo geral, em cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia. Nos estágios iniciais, a cirurgia e radioterapia costumam ser indicadas. Nos estágios mais avançados, uma atuação mais sistêmica, através da quimioterapia, mostra-se necessária. Contudo, essas estratégias têm sido utilizadas de forma concomitante, buscando maior eficácia do tratamento (Almeida *et al.*, 2005; Morgan, 2003). A quimioterapia consiste na utilização de compostos químicos com ação citotóxica ou antiproliferativa, buscando a remissão ou regressão do tumor. Podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação e quanto à sua ação no ciclo celular,

podendo atuar de forma ciclo específica ou ciclo inespecífica (Almeida *et al.*, 2005; Morgan, 2003, Randhawa e Ferrajoli, 2016; Jabbour *et al.*, 2016).

A história do desenvolvimento de fármacos quimioterápicos está intimamente relacionada com o progresso das pesquisas e maior compreensão biológica do câncer. Considerando que as células tumorais possuem alta capacidade de proliferação, substâncias que inibem a replicação de DNA ou a divisão celular têm sido utilizadas como medicamentos para o tratamento do câncer desde a década de 1950 (Hayakawa *et al.*, 2016). Apesar do conceito de fármacos com ação antiproliferativa ser atual, a descoberta de novas vias metabólicas, algumas específicas de células tumorais, levou ao desenvolvimento de novas técnicas e estratégias para o tratamento do câncer. Começou a ser desenvolvido um conceito de drogas terapêuticas dirigidas a mecanismos moleculares e celulares específicos da célula tumoral, as chamadas drogas-alvo (Hayakawa *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2016). Posteriormente, estudos mostraram que a relação célula-célula e o microambiente tumoral são essenciais para o crescimento do tumor. Assim, novas estratégias de tratamento foram desenvolvidas, buscando alterar a função das células hospedeiras e suas interações com as células tumorais (Hayakawa *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, surgiram na clínica médica avanços eficazes para o tratamento do câncer, como a fotorradiação e imunoterapia, que são usados, atualmente, de forma adjuvante às terapias tradicionais (Morgan, 2003; Almeida *et al.*, 2005; Jiang e Yan, 2016). A procura de um antitumoral que atue de forma agressiva nas células tumorais, e opere de forma menos danosa possível nas células normais, ainda é alvo de muita pesquisa e estudos no meio científico (Hayakawa *et al.*, 2016).

1.3.2 Tratamento das leucemias

As manifestações clínicas da leucemia são consequências da proliferação excessiva de células anormais da medula óssea, podendo levar à uma ineficiência do sistema imune, neutropenia, defeitos da fagocitose celular, disfunção do sistema complemento e hipogamaglobulinemia. Devido à redução do número de leucócitos normais na corrente sanguínea na leucemia, diversos são os relatos de óbitos devido a infecções por microrganismos oportunistas (Randhawa e Ferrajoli, 2015). O progresso no tratamento da leucemia depende da associação de medicamentos - poliquimoterapia, além de medidas no

controle das complicações infecciosas e hemorrágicas (Randhawa e Ferrajoli, 2015; Jabbour *et al.*, 2016; INCA, 2016b; Cancer Research UK, 2016).

A poliquimioterapia envolve a aplicação simultânea de um determinado conjunto de fármacos com atividade anticâncer, empiricamente selecionados em ensaios clínicos, com o objetivo de potencializar o tratamento do câncer (Ehrhardt *et al.*, 2012). Na leucemia, o tratamento poliquimioterápico inicial visa promover remissão do quadro patológico, regredindo ou extinguindo os sinais clínicos da doença. Contudo, diversos trabalhos comprovam a permanência de células leucêmicas no organismo após o tratamento inicial (doença residual), necessitando a continuação do tratamento. Nos tipos linfoides, o tratamento é mais prolongado, podendo durar mais de dois anos, com efeitos colaterais extremamente agressivos, podendo levar a complicações do quadro clínico (Kato *et al.*, 2016; INCA, 2016b; Cancer Research UK, 2016).

Uma poliquimioterapia agressiva também pode levar a queda dos leucócitos e consequente infecção. As infecções representam 50 a 60% de todas as mortes em leucemia linfocítica crônica (LLC). Na fase inicial, os pacientes recebem, quase diariamente, transfusões de hemácias e de plaquetas, enquanto a medula óssea não recupera a hematopoiese normal (Randhawa e Ferrajoli, 2015; Kato *et al.*, 2016; INCA, 2016b; Cancer Research UK, 2016).

Como exemplos de fármacos utilizados no tratamento das leucemias, podemos citar os análogos de purina, como a fludarabina, a cladribina e a pentostatina, contudo, essas drogas são conhecidas por serem indutoras de neutropenias e anomalias das células T. A fludarabina leva à uma expressiva diminuição nas contagens de células T CD4 e CD8. A terapia com rituximab, um anticorpo monoclonal CD20 quimérico, também usado no tratamento das leucemias, leva à diminuição de células B, aumentando o risco de infecções virais. Alemtuzumab, um anticorpo monoclonal humanizado do antígeno CD52, expresso na superfície dos linfócitos em todos os estágios de maturação, tem sido utilizado no tratamento de leucemias linfoides e está associado a um risco significativamente maior de infecção em pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC). O uso de alemtuzumab causa neutropenia e defeitos graves na imunidade celular, com declínio significativo nos linfócitos B, T e Natural Killer, ocorrendo logo após o início da terapia e persistindo por vários meses após o tratamento (Randhawa e Ferrajoli, 2015).

Devido à agressividade do tratamento das leucemias, também pode ser realizado o transplante de medula óssea após a poliquimioterapia (De Angelo *et al.*, 2016; Deol *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2016). As células da medula óssea de um doador são transplantadas no

paciente após o tratamento; ou mesmo células do próprio paciente podem ser replantadas, caso tenham sido previamente congeladas quando ainda saudáveis. Também são realizados transplantes de células tronco do sangue periférico, de forma até mais comum do que transplantes de medula óssea, devido à maior facilidade, obtenção de um volume maior de células e os pacientes tendem a recuperar as contagens de células sanguíneas mais rapidamente do que quando comparadas a um transplante de medula óssea (De Angelo *et al.*, 2016; Deol *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2016; Cancer Research UK, 2016).

Visto que os atuais tratamentos antitumorais se mostram agressivos e ainda é possível haver resistência do tumor a fármacos utilizados na quimioterapia, a busca por novas substâncias para o tratamento do câncer continua representando uma vertente importante das pesquisas científicas atuais (Hayakawa *et al.*, 2016).

1.4 Hibridização molecular e síntese de agentes antitumorais

O processo de descoberta de novos fármacos caracteriza-se pela multiplicidade de fatores a serem considerados no planejamento molecular, como biodisponibilidade, segurança, toxicidade e metabolismo (Barreiro e Fraga, 2008). Devido à complexidade de algumas patologias, estas requerem o desenho de bioligantes ou protótipos de medicamentos que incluam, na mesma molécula, propriedades farmacológicas duplas, o que caracteriza os fármacos duais, de forma a assegurar uma melhor eficácia terapêutica. Estes fármacos exercem sua ação em dois alvos biológicos diferentes e apresentam vantagens farmacocinéticas sobre a administração concomitante de dois fármacos distintos. Estes alvos podem ser receptores, enzimas ou uma combinação de ambos (Barreiro e Fraga, 2008; Yu et al, 2016, Nagarsenkar et al, 2016).

A modificação molecular consiste na otimização de um protótipo com estrutura e ação biológica conhecidas, obtendo um composto mais potente e seletivo (Wermuth; 2004, 2008; Yu et al, 2016, Nagarsenkar et al, 2016). Entre as estratégias mais utilizadas em química farmacêutica medicinal podemos citar a hibridização molecular, que é baseada na reunião de duas ou mais subunidades farmacofóricas ou substâncias bioativas distintas, levando à uma nova substância híbrida. Esta nova estrutura poderá conjugar ambas as atividades farmacocinéticas em uma única molécula, ou mesmo apresentar maior ação farmacológica

que seus precursores, de forma sinérgica (Wermuth, 2004, 2008; Viegas-Junior *et al.*, 2007, 2009; Barreiro & Fraga, 2008; Yu et al, 2016, Nagarsenkar et al, 2016).

Na literatura, diversos trabalhos mostram efeitos antitumorais de fármacos híbridos no tratamento do câncer. Em 1999, Kuduk e colaboradores propuseram a síntese de híbridos do geldanamicina com o estradiol, com o objetivo de obter moléculas capazes de provocar a degradação específica de proteínas, tais como ligantes de receptores estradióis (ER) e de transaminases de membrana HER2, que são altamente expressos em vários tipos de câncer da mama, conseguindo resultados promissores com estes fármacos. A intervenção apropriada nestas proteínas pode levar ao atraso do crescimento e/ou indução de apoptose, características importantes no desenvolvimento de um novo fármaco antitumoral (Viegas-Junior *et al.*, 2007). Zask e colaboradores (2005), em seu trabalho, elaboraram agentes híbridos que atuam no mesmo caminho bioquímico que os taxanos (paclitaxel, docetaxel) e os vinca alcaloides (vincristina, vinblastina, vinorelbina) na segmentação dos microtúbulos, sendo um mecanismo importante para o tratamento de vários tipos câncer e de grande utilidade na clínica. Desta forma, a hibridização molecular vem mostrando-se uma ferramenta importante na elaboração e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças, entre elas o câncer (Wermuth, 2004, 2008; Viegas-Junior *et al.*, 2007, 2009; Barreiro & Fraga, 2008; Yu *et al*, 2016, Nagarsenkar et al, 2016).

1.4.1 Terpenila-nitrona LQB-278

Neste contexto, foram sintetizadas pelo grupo de pesquisa do Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, com quem colaboramos, diferentes moléculas híbridas de terpenila-nitronas, nas quais foram associadas à ação antitumoral dos terpenos (Burke *et al.*, 1997, Yu *et al*, 1995; Haug *et al.*,, 1994; Bhalla *et al*., 2015; Kuttan *et al*., 2011; Li *et al*, 2016) com a ação anti-inflamatória e antiproliferativa em modelos animais de câncer, do *N*-Fenil-t-butilnitrona (PBN) (Asanuma *et al.*,, 2008; Doblas *et al.*, 2008; Floyd *et al.*, 2008, 2010).

Os terpenos são formados a partir de unidades de isopreno (C_5H_8), de cinco carbonos, e também são chamados de isoprenóides. Com base no número de unidades de cinco carbonos (isopreno) que os constituem, os terpenos são classificados como monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20) ou triterpenos (C30) (Kuttan *et al.*, 2013). Os terpenos

exibem uma larga escala de atividades biológicas, com ação antioxidante, anti-inflamatória, quimioprotetora, antiproliferativa e antitumoral em diversos tipos de tumores (Kuttan *et al.*, 2011; Afzal *et al.*, 2015; Bhalla *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2016, Naumann *et al.*, 2016). O carvacrol, por exemplo, é um monoterpeno com efeito antiproliferativo em células de câncer de mama metastático (MDA-MB231), induzindo apoptose, liberação de citocromo c, diminuição da razão Bcl-2/Bax, aumento da atividade de caspase e fragmentação do DNA (Bhalla *et al.*, 2015). A Vernolida-A ($C_{21}H_{28}O_7$) é um sesquiterpeno, presente na planta *Vernonia cinerea L.* (Asteraceae), cuja avaliação biológica mostrou potente citotoxicidade contra as linhagens celulares tumorais humanas KB, DLD-1, NCI-661 e Hela. Além disto, diversos trabalhos mostram a capacidade antitumoral dos sesquiterpenos através da inibição de respostas inflamatórias, prevenção de metástases e indução de apoptose (Kuttan *et al*., 2011). Por outro lado, diterpenos, como os encontrados no gênero *Caesalpinia*, inibem a proliferação de diferentes tipos de células tumorais, sendo demostrada capacidade de indução de apoptose em células de adenoma pituitário (Li *et al*, 2016). Quanto aos triterpenos, diversos trabalhos mostraram indução de apoptose, ativando caspases, diminuindo Bcl-2, inibindo a expressão de TNF-α, IL-1β, IL-6 e GM-CSF em tumores. O ácido ursólico e seus derivados, por exemplo, induzem apoptose em carcinoma da mama, melanoma, hepatoma, carcinoma prostático e leucemia mielóide aguda (Kuttan *et al.*, 2011).

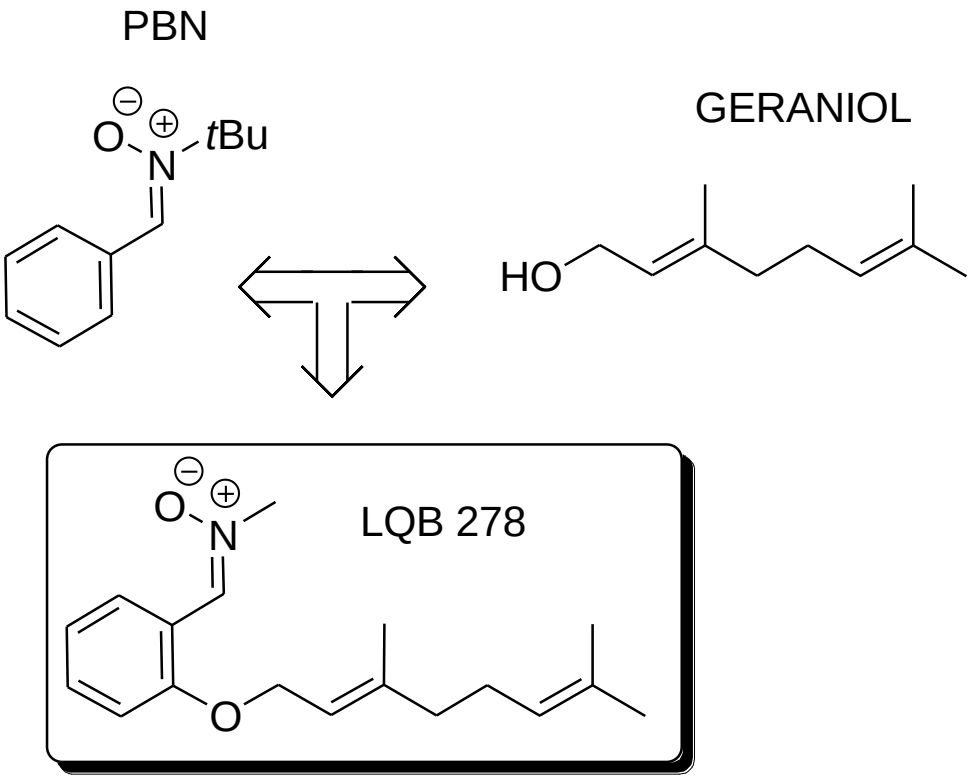
A propriedade lipofílica dos terpenos também representa uma característica importante do papel de alguns isoprenoides, o que permite o ancoramento na membrana plasmática de proteínas associadas a eles, e participação destas proteínas em diversos processos celulares como adesão e sinalização (Paulick e Bertozzi, 2008; Selden *et al.*, 2012; Naumann *et al.*, 2013). Como terpenos importantes no processo de ancoramento na membrana, e que possuem ação antitumoral e antiproliferativa descrita na literatura, podemos citar o geraniol e o farnesol (Farooqui e Horrocks, 2006; Joo *et al.*, 2015; Cho *et al.*, 2016). O monoterpeno acíclico geraniol, com 10 carbonos, apresenta ação antitumoral em diferentes tipos de câncer, como mama, câncer de pulmão, cólon, próstata, pancreático, hepático e leucemias. O geraniol também é utilizado com outros fármacos, para sensibilização de células tumorais a estes agentes quimioterápicos, além de interferir em várias vias moleculares de sinalização características de células cancerosas (Cho *et al.*, 2016). O farnesol, um terpeno acíclico com 15 carbonos, mostrou, em estudos recentes, capacidade inibitória do crescimento tumoral e melhorou os efeitos do fármaco bortezomib em xenoenxertos de mieloma múltiplo em ratos. A sensibilização e indução de apoptose pelo farnesol variam amplamente entre as células tumorais, sendo as células de leucemia e de linfoma particularmente sensíveis à indução de

morte por este composto (Joo *et al.*, 2015). O farnesol mostrou ação anti-leucêmica em linhagem CEM-C1, apresentando ação inibidora do crescimento celular e indução de fragmentação de DNA, com efeito mais pronunciado em células neoplásicas do que em células normais (Melnykovych *et al.*, 1992; Adany *et al.*, 1994; Haug *et al.*, 1994; Burke *et al.*, 1997; Carnesecchi *et al.*, 2004; Cardozo, 2007).

Por outro lado, a ação antitumoral do - PBN foi descrita na literatura pela primeira vez por Floyd e Soong (1977) e desde então, vários estudos relataram suas propriedades anti-proliferativas, como por exemplo, a ação dos derivados 4-OH-PBN e NXY-059, em células tumorais e em modelos animais de câncer, como carcinoma hepatocelular colina deficiente, glioma, cólon, próstata e câncer de mama (Ramadan *et al.*, 2006; Inoue *et al.*, 2007; Floyd *et al.*, 2010, 2011; Townwe *et al.*, 2013). Contudo, diversos trabalhos têm indicado que os efeitos farmacológicos do PBN seriam mais direcionados à ação anti-inflamatória, promovendo a inibição de enzimas como a ciclooxigenase-2 (COX-2) e citocinas como o TNF-α e o NF-kB (Boetkjaer *et al.*, 2007; Miyajima e Kotake, 1997). Esta característica é promissora não apenas pela atividade anti-inflamatória em si, mas também pela relação da inflamação crônica com a tumorigênese (Grimm *et al.*, 2013; Choudhari *et al.*, 2013).

Um estudo do nosso grupo, da relação estrutura-atividade desses compostos híbridos de terpenos e derivados PBN, revelou que dentre as várias estruturas das moléculas estudadas, a ação antileucêmica se apresentou de forma decrescente com a inserção do radical geranila, farnesila e prenila, ao PBN. Além disso, com relação às diferentes posições (orto, meta e para) de inserção dos radicais terpênicos no derivado PBN, a inserção na posição orto foi a única que permitiu a ação anti-leucêmica, gerando a molécula LQB-278, que apresentou maior atividade citotóxica em linhagem humana de leucemia linfocítica aguda Jurkat (Costa *et al.*, 2015). A figura 1 mostra as estruturas químicas do híbrido LQB-278 e seus precursores geraniol e PBN. O LQB-278 apresentou ação antileucêmica em linhagem Jurkat (IC50 de 6,7 µM) maior do que os seus precursores geraniol (IC50 > 50 µM) ou PBN (IC50 > 50 µM) isoladamente, além de induzir morte celular por apoptose e aumento de expressão de p21, não mostrando citotoxicidade expressiva em células saudáveis tratadas sob as mesmas condições.

Figura 1 – Estrutura química do PBN, geraniol e LQB-278.



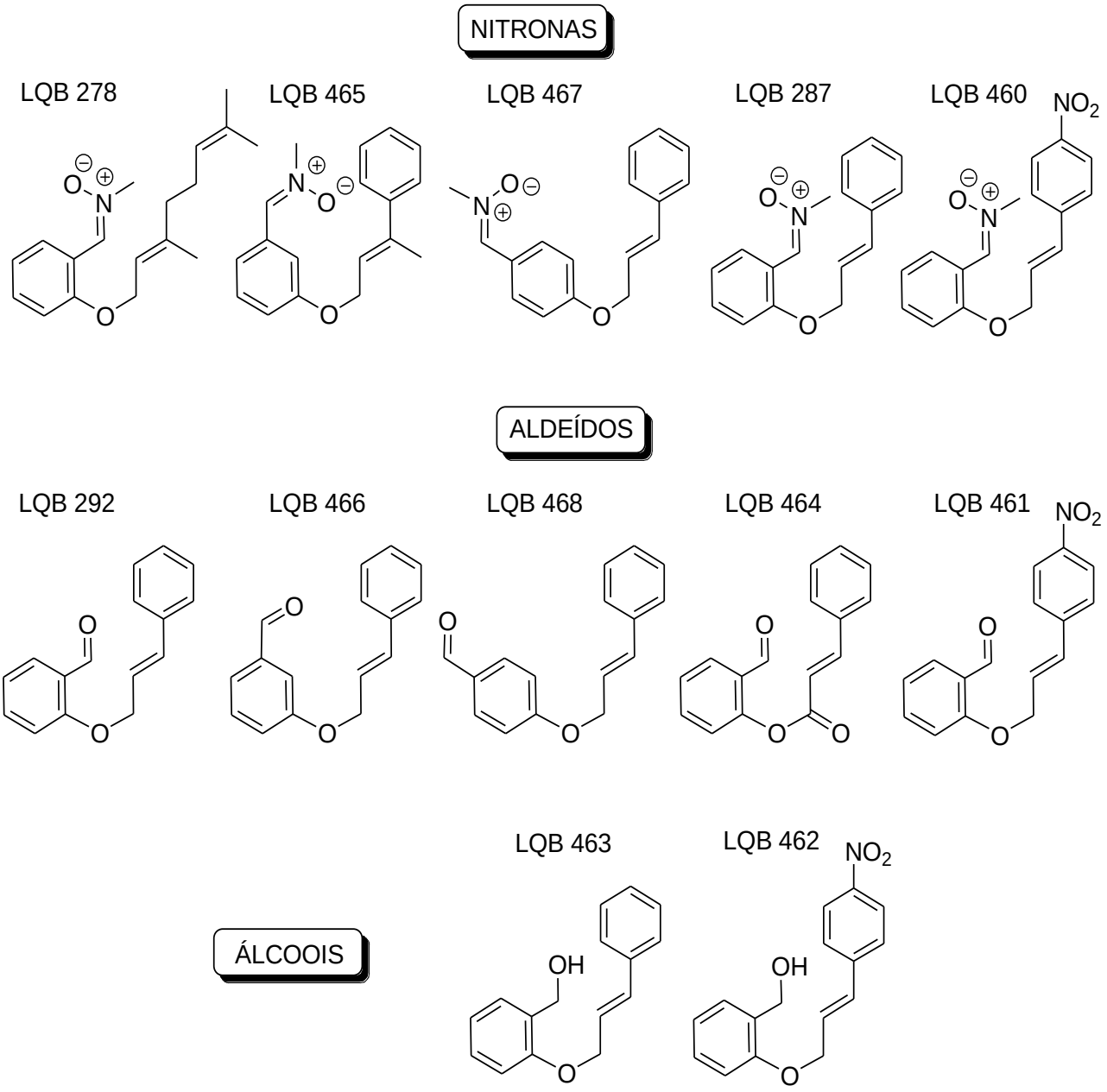
1.4.2 Análogos cíclicos da terpenila nitrona LQB-278

Tendo verificado que o LQB-278, um híbrido do terpeno linear geraniol e PBN, apresentou resultados promissores relativos à ação anti-leucêmica *in vitro* (Costa *et al.*, 2015), decidiu-se continuar os estudos da relação estrutura-atividade do LQB-278, com o objetivo de gerar moléculas atóxicas para células normais, e cada vez mais ativas sobre células leucêmicas. Neste sentido, foram sintetizados análogos derivados da ciclização do fragmento terpenila e com outras modificações do LQB-278.

Outra estratégia de modificação molecular muito utilizada em química farmacêutica medicinal, além da hibridação molecular, é o isosterismo. O conceito de isosterismo é baseado na substituição, em uma determinada molécula bioativa, de átomos ou grupo de átomos por outros que apresentam propriedades físico-químicas similares (Wermuth,; 2004, 2008; Barreiro e Fraga, 2008; Viegas jr. *et al*, 2007, 2009; Barreiro e Fraga, 2008).

Desta forma, os análogos cíclicos do LQB-278 podem ser vistos como um protótipo oriundo da modificação estrutural de *N*-metilaril nitronas *O*-Geraniladas, pelo aumento das restrições conformacionais na cadeia lateral insaturada, através de sua anelação. Este tipo de modificação conformacional na cadeia lateral das *N*-metilaril nitronas permite investigar sua contribuição farmacofórica na atividade biológica. Análogos contendo variações na porção nitrona complementam a avaliação das porções farmacofóricas da molécula. Cabe ressaltar que todas as moléculas aqui descritas são inéditas, e foram preparadas em escalas de multigramas. A figura 2 mostra as estruturas químicas dos diferentes análogos sintetizados e também do LQB-278, para comparação.

Figura 2 – Estrutura química da terpenila-nitrona LQB-278 e dos seus análogos cíclicos.



1.5 Estudos *in vitro* – Ação antitumoral

Embora os estudos *in vitro* não espelhem de forma plena as interações fisiológicas de um medicamento no organismo como um todo, eles representam uma etapa inicial importante da fase pré-clínica dos estudos farmacológicos. Nas últimas décadas, o cultivo de células *in vitro* deixou de ser um simples instrumento de pesquisa para se tornar uma poderosa ferramenta no desenvolvimento da biotecnologia. A utilização da cultura de células permite o estudo dos diversos mecanismos bioquímicos, moleculares e celulares de ação de diferentes fármacos, e fenômenos referentes à carcinogênese, resistência a drogas e citotoxicidade (Kepp *et al.*, 2011; Hayakawa *et al.*, 2016). No entanto, os estudos *in vitro* devem ser sempre seguidos por ensaios *in vivo*, com o objetivo de avaliar os efeitos farmacocinéticos e farmacológicos da substância em estudo, incluindo possíveis efeitos toxicológicos (Pereira, 2007).

Na busca de novos medicamentos no campo da oncologia, os estudos *in vitro* mostram-se essenciais em cada fase de desenvolvimento. Foi através dos estudos *in vitro* que alguns mecanismos característicos da célula tumoral e a importância do microambiente tecidual e do sistema imunológico, no desenvolvimento e progressão do câncer, se tornaram mais elucidados (Hayakawa *et al.*, 2016). Também através destas pesquisas, novos medicamentos e estratégias para o tratamento oncológico foram desenvolvidos, aumentando a eficiência na clínica e a expectativa de remissão e cura dos pacientes. Muitos estudos com o uso de metodologias *in vitro* conseguem avaliar e prever a capacidade de diversas substâncias quimioterápicas, sejam estas sintéticas ou naturais, na inibição da proliferação da célula tumoral, assim como seus mecanismos citotóxicos, ressaltando que grande parte dos compostos que interrompem a proliferação do tumor, *in vivo* ou *in vitro*, são indutores de morte celular (Kepp *et al.*, 2011; Hayakawa *et al.*, 2016).

Adicionalmente, os estudos *in vitro* vêm sendo utilizados com mais frequência, devido ao grande rigor ético no controle de estudos utilizando animais de laboratório (Moura *et al*., 2012). Os estudos *in vitro* permitem estudar o potencial farmacológico de grande número de substâncias, através de testes denominados "*screening"* ou "rastreamento" farmacológico. Neste trabalho, realizamos um rastreamento de substâncias quanto à ação antitumoral, utilizando o ensaio de MTT, como teste de citotoxicidade, em diferentes linhagens celulares tumorais, o que deve sempre preceder o estudo da ação antitumoral em animais de experimentação (Moura *et al*., 2012; Riss *et al*, 2013). O ensaio de MTT é descrito na

literatura como uma ferramenta adequada para o cálculo da concentração do fármaco que induz metade do efeito inibitório máximo (IC50), estudo de associação de fármacos e de múltipla resistência a fármacos (Van Meerloo *et al*, 2011).

De certo, os ensaios *in vitro* limitam as interpretações quanto à extrapolação para os efeitos *in vivo*, como mencionado anteriormente, mas, por outro lado, possuem grande valor pois sua execução é mais simples e mais rápida que a dos testes *in vivo*, e são importantes no estudo de potenciais agentes antitumorais em diferentes processos celulares, como proliferação, ciclo celular, morte celular, assim como mecanismos de ação envolvidos (Moura *et al.*, 2012).

1.5.1 Ciclo celular

O ciclo celular é caracterizado por uma série de eventos que ocorrem em uma célula, levando a sua duplicação (Velez e Howard, 2015). É rigidamente controlado por mecanismos que asseguram que a divisão celular seja realizada de forma eficiente, sendo um processo vital, através do qual um ovo unicelular fertilizado se desenvolve em um organismo maduro, bem como o processo pelo qual todas as células dos tecidos que formam o organismo são continuamente renovadas (Palmisano *et al.*, 2017). Podemos destacar duas fases da divisão celular: a interfase, onde ocorre a duplicação do DNA e o crescimento celular, com o acúmulo de fatores necessários para a divisão; e a mitose, fase onde ocorre a divisão celular propriamente dita, formando duas "células filhas" a partir de uma célula precursora (Velez e Howard, 2015; Palmisano *et al.*, 2017).

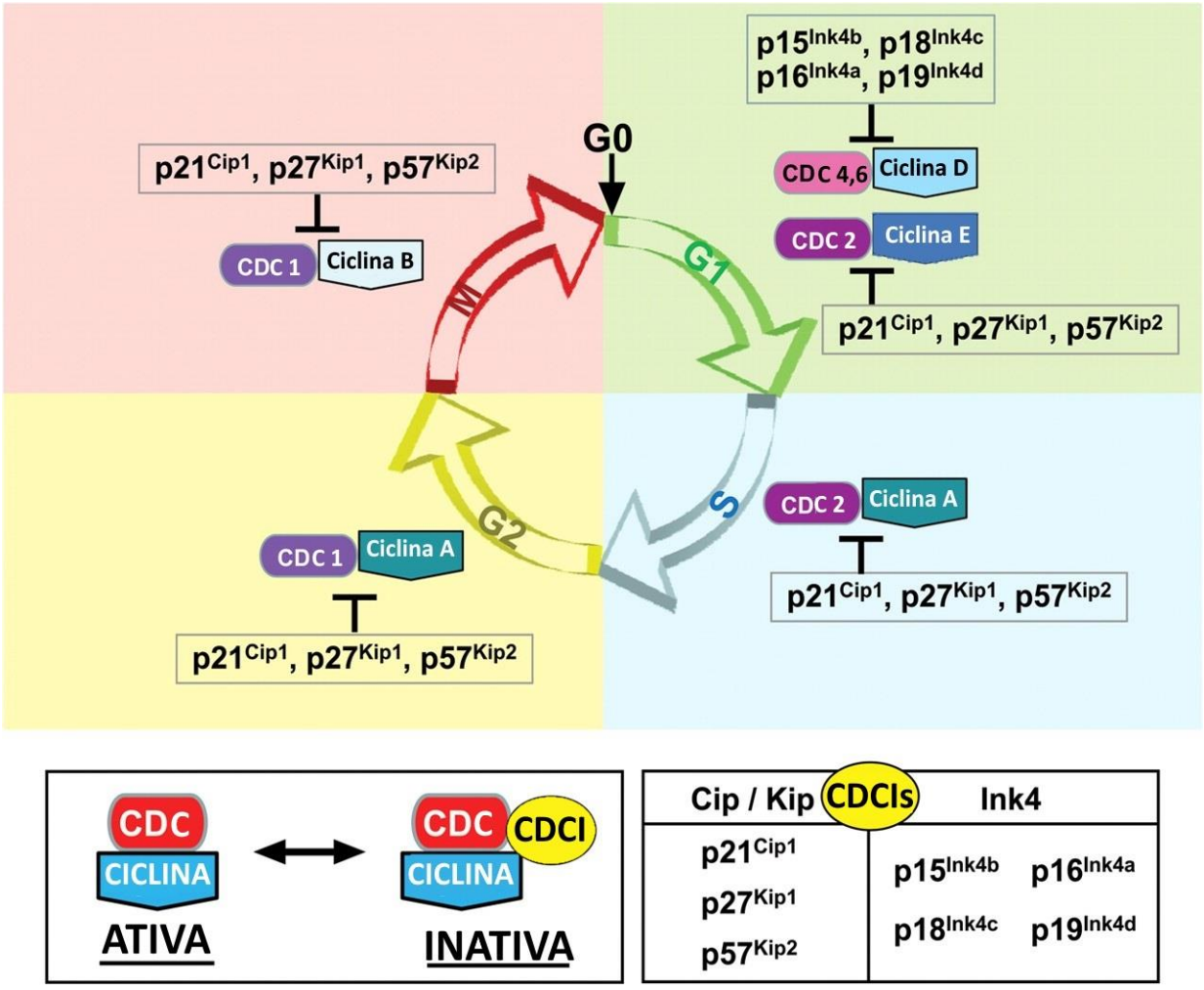
A interfase possui duas subfases, G1 e G2, nas quais ocorrem alterações da expressão de diversas proteínas e fatores de transcrição, e a fase S onde ocorre, a replicação do DNA como evento principal (Vermeulen *et al.*, 2003; Williams e Stoeber, 2012; Palmisano *et al.*, 2017). A transição de uma fase do ciclo celular para outra ocorre de forma ordenada e é regulada por diferentes proteínas, como as cinases dependentes de ciclinas (CDC), uma família de proteínas cinases que são ativadas em pontos específicos do ciclo celular. Nove CDCs já foram identificados e, destas, cinco participam da regulação do ciclo, sendo ativadas por proteínas específicas, as ciclinas, com as quais formam complexos que ativam diversos

fatores de transcrição e proteínas (Vermeulen *et al.*, 2003; Velez e Howard, 2015; Palmisano *et al.*, 2017).

A progressão apropriada através do ciclo celular é acompanhada por pontos de verificação, os *checkpoints*, que detectam possíveis defeitos durante a síntese de DNA e a segregação de cromossomos. As ativações destes pontos de verificação induzem a paradas do ciclo celular através da modulação das atividades das CDCs, permitindo que as células reparem adequadamente possíveis danos no DNA. Se o reparo não ocorrer, em função de um dano excessivo ao material genético ou defeitos em qualquer ponto de verificação e/ou na maquinaria de reparo, as células podem entrar em senescência ou apoptose (Vermeulen *et al.*, 2003; Malumbres e Barbacid, 2009; Williams e Stoeber, 2012).

O ciclo celular pode ser interrompido de diversas formas por reguladores de CDCs, incluindo eventos de fosforilação, inibição e estabilização. A fosforilação de substratos de CDCs irá resultar em alterações na expressão de genes, formação de complexos pré-replicativos e desagregação do envelope nuclear (Velez e Howard, 2015). Inibidores de CDC (CDCI) se ligam às CDCs sozinhas ou ao complexo ciclina-CDC de forma específica. Duas famílias de inibidores de CDC foram descobertas, a família de proteínas INK4 e proteínas Cip/Kip. A família INK4 inclui p15, p16, p18 e p19, e a família de inibidores Cip/Kip inclui p21, p27 e p57 (Williams e Stoeber, 2012). Vale destacar a atuação da proteína p21 que, além de inibir o ciclo celular, se ligando aos complexos ciclina-CDCs, também inibe a síntese de DNA, por ligação ao antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA); e ainda pode atuar ligando-se diretamente ao fator de transcrição E2F, interrompendo a passagem de G1 para S. A expressão de p21 pode ser regulada através de p53, codificada pelo gene supressor de tumor *TP53*, já a expressão e a ativação p15 e p27 aumentam em resposta ao fator de transformação do crescimento β (TGF- β), interrompendo o crescimento celular (Vermeulen *et al.*, 2003; Malumbres e Barbacid, 2009; Piccolo e Crispi, 2012). A figura 3 mostra uma imagem ilustrativa do ciclo celular com os complexos ciclina/CDC específicos que regulam cada fase, além de seus respectivos inibidores (CDCIs).

Figura 3 – Regulação do ciclo celular de mamíferos por complexos CDCs/ciclina e CDCIs.



Legenda: O ciclo celular consiste em quatro fases distintas: G1, S (replicação do DNA), G2 e M (mitose). A ativação de complexos específicos de ciclina dependente de cinase (CDC)/ciclina impulsiona a progressão através destas fases do ciclo celular. Inibidores de CDC (CDCI) das famílias Cip/kip e INK4 interagem com e inativam os complexos CDC/ciclina, bloqueando assim a progressão do ciclo celular e a proliferação celular. Fonte: Fuster *et al.*, 2010, modificado em dezembro de 2016.

A desregulação do ciclo celular é uma característica comum de células tumorais, as quais exibem proliferação descontrolada, instabilidade genômica e cromossômica. Esta regulação alterada do ciclo está muitas vezes relacionada com a ativação das CDCs, de forma constitutiva, e com a ineficiência dos *checkpoints* (Morgan, 2003; Malumbres e Barbacid,

2009). Em células tronco, a desregulação das CDCs é capaz de induzir a tumorigênese. A amplificação ou superexpressão das CDC4 e CDC6 têm sido demonstrada numa grande variedade de tumores (incluindo sarcoma, glioma, tumores de mama, leucemias e melanoma). A CDC4 está alterada em pacientes com melanoma, por uma mutação que bloqueia a ligação de inibidores INK4. A desregulação de ciclinas do tipo D e inibidores de INK4 é uma característica comum da maioria dos tipos de tumores (Malumbres e Barbacid, 2009). Ciclinas de tipo E são frequentemente superexpressas em tumores humanos, assim como o silenciamento de inibidores de CDCs, como p21 e p27 (Malumbres e Barbacid, 2009; Williams e Stoeber, 2012). Em estudos *in vivo*, a ablação de p21 ou p27 na linha germinal de ratos resultou no desenvolvimento de tumores (Malumbres e Barbacid, 2009). Como p21 e p27 também inibem CDC1, é possível que a desregulação dessa cinase possa estar relacionada com o desenvolvimento de tumores malignos, onde os genes de p21 ou p27 encontram-se silenciados (Malumbres e Barbacid, 2009; Williams e Stoeber, 2012).

Quanto ao efeito de fármacos no ciclo celular, eles podem atuar de forma ciclo celular específico ou ciclo celular não específico (Morgan, 2003). Fármacos ciclo-específicas funcionam de forma mais efetiva sobre as células em divisão, sendo mais eficazes contra tumores que crescem ativamente. Como exemplo de fármacos ciclo específicas, podemos citar os anti-metabólitos, o alcalóide da vinca, e agentes diversos, tais como asparaginase e decarbazina (Almeida *et al.*, 2005; Morgan, 2003). Também são alvos do desenvolvimento de novos fármacos, moléculas que atuem inibindo CDCs que estejam ativadas de forma constitutiva, interrompendo o ciclo e dificultando a proliferação e o desenvolvimento do tumor (Malumbres e Barbacid, 2009). Por outro lado, fármacos ciclo celular não específico são ativos nas células em divisão ou em estado de repouso, e incluem agentes alquilantes, antibióticos anti-tumorais, nitrosureias, agentes não citotóxicos, tais como hormônios e fármacos esteroides, e outros agentes, tais como a procarbazina (Morgan, 2003).

Por outro lado, diversos estudos mostram uma relação intrínseca do crescimento e progressão do tumor com a desregulação do processo apoptótico nas células tumorais (Elmore, 2007; Cotter, 2009; Ouyang *et al*., 2012; Ashkenazi, 2015), o que torna o estudo dos mecanismos de regulação da apoptose um outro alvo terapêutico, além do ciclo celular, de grande interesse da ciência. O estudo dos mecanismos alterados na indução de apoptose tem importância não só para o processo de tumorigênese, como para a busca de novos agentes antitumorais.

1.5.2 Apoptose

A morte celular por apoptose é um mecanismo geneticamente programado, criticamente importante para a sobrevivência e homeostase do organismo, responsável por remover células danificadas ou infectadas que podem interferir com a função normal de um determinado tecido (Portt *et al.*, 2011; Ashkenazi, 2015). A apoptose pode ser ativada por duas vias: extrínseca e intrínseca. A via extrínseca é mediada por um subgrupo de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), uma superfamília que inclui TNFR, Fas e TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF). A ativação destes receptores de morte desencadeia a formação e ativação de complexos, tais como o complexo de sinalização indutor de morte (DISCO), ao recrutamento e a ativação de caspases iniciadoras (enzimas proteases com resíduo de cisteína). Estas conduzem à ativação de caspases efetoras, responsáveis pela clivagem dos chamados substratos de morte, que levam às características conhecidas de uma célula apoptótica. Tais características incluem a fragmentação do DNA e do núcleo, perda de permeabilidade da membrana e outras alterações morfológicas e bioquímicas (Portt *etal*, 2011; Ashkenazi, 2015). Evidências mais recentes sugerem ainda maior complexidade e diversidade na via extrínseca, envolvendo, também, a ativação cruzada de outras vias, como a via intrínseca de apoptose e sub-vias de necrose (Portt *et al.*, 2011; Hongmei, 2012; Ashkenazi, 2015).

A via intrínseca de apoptose é iniciada quando há danos ao DNA ou interrupção de fatores de crescimento, levando ao aumento de p53 e consequente liberação de citocromo C mediada por stress intracelular, que resulta na formação do apoptossomo, um complexo formado entre a caspase 9, APAF-1 (fator de ativação de apoptose 1) e citocromo C, o qual irá ativar a caspase 3, uma caspase efetora. Este processo leva ao mesmo tipo de resposta apoptótica observada na via extrínseca (Portt et al., 2011; Hongmei, 2012; Ashkenazi, 2015).

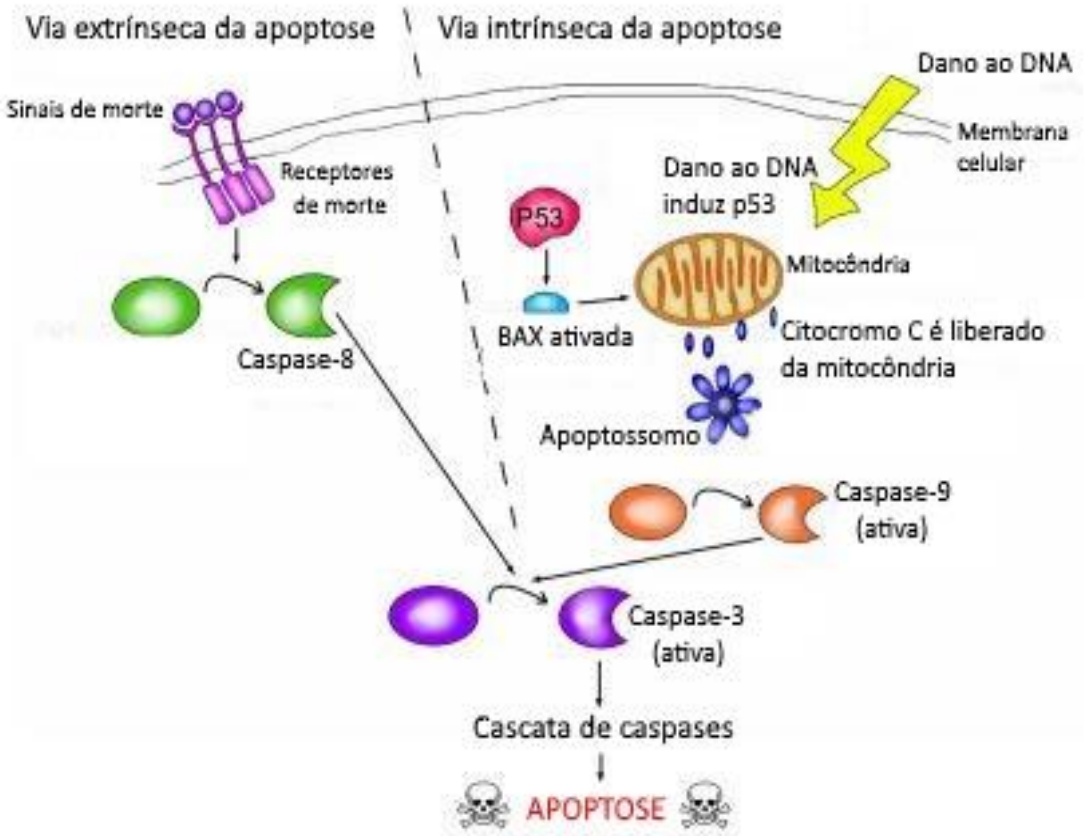
Em resposta a estímulos apoptóticos, os membros pró-apoptóticos da família de proteínas Bcl-2 (Bad, Bax e Bak) podem tornar-se ativados e atuarem sobre as mitocôndrias para induzir a liberação de citocromo C (Portt *et al.*, 2011; Hongmei, 2012; Ashkenazi, 2015). Foram identificadas mais de duas dúzias de proteínas da família Bcl-2, que podem ser divididas, baseando-se na função e similaridade de sequência de aminoácidos, em três subfamílias: as subfamílias pró-apoptose representadas pela Bax/Bak e Bid/Bim, e pela subfamília anti-apoptose representada pelo Bcl2/Bcl-xL, que inibe a morte celular programada por distintos mecanismos, como prevenção da liberação de proteínas

mitocondriais (Cescato, 2010). Outras proteínas pró-apoptóticas também podem ser liberadas pelas mitocôndrias, incluindo Smac/Diablo (Segundo ativador mitocondrial de caspase / Proteína de Ligação-IAP Direta com baixo pI), a serina-protease Omi/HtrA2, endonuclease G (EndoG) e fator de indução de apoptose (AIF) (Portt *et al.*, 2011; Hongmei, 2012; Ashkenazi, 2015).

A ativação da via mitocondrial pode também ocorrer após a ativação da via extrínseca, através da clivagem, via caspase 8, de Bid (membro da família Bcl-2) à sua forma ativada tBid. Este exemplo mostra um *cross-talk* entre as vias de ativação de apoptose, aparentemente distintas, ilustrando a complexidade das inter-relações nos diferentes processos envolvidos na regulação da morte celular (Portt *et al.*, 2011; Hongmei, 2012). A figura 4 mostra, de forma resumida, as vias intrínseca e extrínseca de ativação da apoptose, assim como moléculas chave, importantes para uma resolução eficiente desse mecanismo de morte celular programada.

Sendo a apoptose o principal tipo de morte celular programada induzida quando o dano ao DNA é irreparável, sua desregulação pode conduzir ao acúmulo de células com erros e/ou instabilidade em seu material genético e contribuir para o desenvolvimento tumoral (Elmore, 2007; Cotter, 2009; Ouyang *et al.*, 2012; Ashkenazi, 2015). Diversos trabalhos mostram a expressão anormal, no câncer e em muitos tipos de linhagens celulares tumorais, de alguns fatores fundamentais na regulação de apoptose, como super-expressão de c-myc, regulação negativa da proteína pró-apoptótica Bax e super-expressão de Bcl-2, uma proteína com ação anti-apoptótica. Enquanto a diminuição da expressão de Bcl-2 possa promover respostas apoptóticas por drogas antitumorais, o aumento da expressão de Bcl-2 conduz a resistência a drogas quimioterapêuticas e à terapia por radiação (Elmore, 2007; Cotter, 2009; Ouyang *et al.*, 2012; Ashkenazi, 2015).

Figura 4 – Visão geral das vias extrínseca e intrínseca de ativação da apoptose.



Legenda: Na via extrínseca, os sinais de morte se ligam aos receptores de morte na superfície da membrana celular, clivando pro-caspase 8 em caspase 8, sua forma ativa, que cliva a pro-caspase 3 em caspase 3. Na via intrínseca, danos ao DNA induzem a expressão de p53, ativando a proteína Bax, que induz a liberação de citocromo c da mitocôndria. APAF-1 e o citocromo c liberado combinam-se para formar um complexo Apoptossomo, que converte pro-caspase 9 em caspase 9 ativa. Esta caspase ligada ao apoptossomo converte pro-caspase 3 em caspase 3 ativa, conhecida como caspase efetora, que conduz a várias alterações na célula, resultando em apoptose. Fonte: Samarasinghe, B; Hallmarks of Cancer 3: Evading Apoptosis, Scientific American Blog Network, 2013. Retirado de: https://blogs.scientificamerican.com/guest-blog/hallmarks-of-cancer-3-evading-apoptosis/ em novembro de 2016. Modificado em novembro de 2016.

É importante destacar que, diferente do processo de morte por necrose, que pode induzir inflamação, a apoptose apresenta efeitos colaterais pequenos, sem liberação do conteúdo intracelular ao final do processo, e sem indução de inflamação, não estabelecendo lesão local durante a eliminação celular (Hongmei, 2012). Desta forma, a indução de apoptose é o processo de morte celular que pode ser induzido mais indicado como alvo terapêutico, para o tratamento de algumas doenças, tais como o câncer (Hongmei, 2012; Ashkenazi,

2015). A identificação das vias de sinalização de apoptose, juntamente com o aumento do conhecimento sobre seus mecanismos, geraram grandes evidências para a descoberta de novos medicamentos com esse alvo (Hongmei, 2012; Ashkenazi, 2015).

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito de modificações estruturais da terpenila nitrona LQB-278 na ação antineoplásica *in vitro*.

2.1Objetivos específicos

1) Avaliar o efeito da restrição conformacional do radical terpenila nos análogos do protótipo LQB-278, e outras modificações estruturais, como variações da demanda eletrônica do anel aromático, natureza da ligação dos radicais e produtos de biotransformação na atividade antineoplásica *in vitro.*

2) Realizar um rastreamento da ação antineoplásica *in vitro* dos diferentes análogos do LQB-278 em leucemias Jurkat e K562, e linhagens tumorais mamária MCF-7, prostática PC3 e pulmonar A549);

3) Avaliar a citotoxicidade das moléculas mais ativas sobre células não tumorais;

4) Estudar a ação anti-inflamatória *in vitro* das moléculas mais ativas, através da inibição da produção de NO por linhagem celular macrofágica RAW-264.7;

5) Estudar os efeitos das moléculas mais ativas no crescimento e ciclo celular da linhagem tumoral mais sensível;

6) Avaliar a citotoxicidade das moléculas mais ativas, através do tipo de morte celular induzido na linhagem tumoral mais sensível;

7) Analisar o efeito das moléculas mais ativas na expressão do inibidor do ciclo celular p21, como um dos seus possíveis mecanismos moleculares de ação.

3 MATERIAL

3.1 Análogos cíclicos da terpenila nitrona LQB-278

Os análogos cíclicos da terpenila nitrona LQB-278 (LQB-287, LQB-292, LQB-460, LQB-461, LQB-462, LQB-463, LQB-464, LQB-465, LQB-466, LQB-467 e LQB-468) foram sintetizados no Laboratório de Química Orgânica, do Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), sob a responsabilidade do Professor Dr. Ayres Guimarães Dias, em parceria com o Laboratório de Química Bioorgânica (LQB), no Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais (IPPN), no Centro de Ciências da Saúde, na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob a responsabilidade do Professor Dr. Paulo Roberto Ribeiro Costa. Tais amostras foram então fornecidas por estes pesquisadores para os ensaios farmacológicos na UERJ, após verificação de sua pureza por cromatografia e ressonância magnética nuclear (RMN). As amostras liofilizadas eram solubilizadas em DMSO, aliquotadas e mantidas a -20°C, ao abrigo da luz. As estruturas químicas dos diferentes análogos encontram-se na figura 2.

3.2 Linhagens celulares

Para o estudo da ação citotóxica *in vitro* dos análogos cíclicos da nitrona LQB-278 foram utilizadas as linhagens leucêmicas humanas Jurkat (Leucemia linfocítica T aguda) e K562 (Leucemia mielóide crônica), linhagens tumorais humanas PC3 (prostática não responsiva a hormônio), MCF7 (linhagem tumoral mamária responsiva a hormônio), A549 (linhagem tumoral pulmonar) e linhagem não tumoral de fibroblastos NIH-3T3. Para a investigação da ação das diferentes moléculas sobre a produção de NO foi utilizada a linhagem macrofágica murina RAW264.7. Estas linhagens celulares foram compradas do Banco de Células do Rio de Janeiro e encontram-se criopreservadas em nitrogênio líquido no Departamento de Bioquímica da UERJ, Rio de Janeiro.

3.3 Reagentes

Meio RPMI 1640, Meio DMEM e sulfato de estreptomicina, Invitrogen, EUA. Penicilina G potássica, Fontoura-Wyerth, Brasil. Soro Fetal Bovino (SFB), Vitrocell, Brasil. Anexina V-FITC, Tampão de ligação para Anexina (Ebioscience, EUA). Anticorpo anti-p21 marcado com ficoeritrina (PE) (Santa Cruz Biotechnology, EUA). Permeabilizante de membrana Facs lising (BD Biosciences, EUA). Azul de tripan, Iodeto de propídio (PI), Tripsina (0,25% de tripsina adicionada de 0,53 mM EDTA), Ribonuclease A, 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5difenil-tetrazol brometo (MTT), Dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido sulfanílico, dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina, Lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS), Fitohemaglutinina, Glutamina e Ficoll-Hipaque foram todos comprados da Sigma Chemical Co, EUA. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.4 Equipamentos e softwares

Balança analítica, modelo B200, Micronal, Brasil. Banho-maria De Leo & Cia, Ltda, Brasil. Câmaras de fluxo laminar, modelo FLV, série 301, Trox do Brasil, Ltda e modelo VLFS, série FL4761, Veco, Brasil. Centrifuga clínica Universal II, Hettich, Brasil. Espectrofotômetro de microplacas universal, modelo µQuant, Bio-Tek Instruments Inc., EUA. Estufa com incubadora de CO2, Sanyo, EUA.. Microcentrífuga Eppendorf, modelo 5418, Eppendorf, Brasil. Microcentrífuga refrigerada, modelo 5417 R, Eppendorf, Brasil. Microscópio invertido, com contraste de fase, modelo CK2: Olympus, Japão. Centrifuga, modelo 5702R, Eppendorf, Brasil. Citômetro Gallios, Beckman Coulter, Brasil. Software GraphPad 5.0. Software Summit 4.3v.

3.5 Material descartável e vidrarias especiais.

Câmara de Neubauer, BOECO, Alemanha. Lamínulas (13 mm), Perfecta, Brasil. Garrafas para cultura de células de 25 cm^3 e 75 cm^3, Corning, EUA. Tubo Falcon 15 e 50 mL, Corning, EUA. Placas de cultura de fundo chato com tampa, de 96 poços estéreis, Corning, EUA. Membranas esterilizantes tipo GSW 02500 e 04700 de 0,22 µm, Millipore Corporation, EUA. Tubos tipo eppendorf, Axygen, EUA**.**

4 METODOLOGIA

4.1 Manutenção das linhagens celulares

Após o descongelamento, as células Jurkat, K562, PC3, MCF-7, A549 e NIH-3T3 eram cultivadas em meio RPMI 1640, enquanto as células macrofágicas murinas RAW264.7 eram cultivadas em meio DMEM, ambas contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 70 mg/L de penicilina G potássica e 100 mg/L de estreptomicina, o que chamamos de meio completo, e mantidas a 37º C e atmosfera úmida com 5% de CO_2, com duas ou três passagens por semana. As células aderentes eram destacadas das garrafas por tratamento com 0,25% de tripsina + 0,53 mM EDTA, seguido de neutralização com meio contendo 10% soro fetal bovino, centrifugação (400 x g, 5 min) e suspensão em meio completo. As células RAW 264.7, excepcionalmente, eram destacadas da garrafa por meio mecânico, utilizando um dispositivo de borracha. As células eram mantidas em cultura até a vigésima passagem, quando uma nova alíquota de células era descongelada.

4.2 Isolamento e cultura de células mononucleares de sangue periférico

As células mononucleares de sangue periférico (CMNSP) consistem nos monócitos e linfócitos do sangue periférico. Estas células sanguíneas fazem parte do sistema imune e foram isoladas de sangue humano por centrifugação em gradiente de densidade utilizando solução de Ficoll-Hipaque de densidade (densidade de 1.077 g/mL). O sangue foi coletado de voluntários saudáveis, com seringas contendo heparina, e centrifugado por 20 minutos a 400 x g, em temperatura entre 18-20^{0}C. Após descarte do plasma, encontramos na região superior das hemácias sedimentadas uma camada rica em leucócitos, conhecida como *buffy coat*, sendo esta transferida para um tubo falcon. O volume de células do *buffy coat* coletado foi homogeneizado, porem vagarosamente, e diluído quatro vezes em meio RPMI 1640 duas vezes diluído com NaCl 0,9% contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 2 mM. Em outro tubo de centrífuga, colocou-se 3 ml de solução de Ficoll-Hipaque e adicionou-se,

lentamente, pela parede do tubo, 5 mL desta solução celular rica em leucócitos sobre o Ficoll-Hipaque, de forma a formar duas fases, e centrifugou-se a 400 x g, entre 18-20°C, por 30 minutos. Após centrifugação, cinco camadas foram observadas, consistindo, de cima para baixo: diluente do *buffy coat* (RPMI-EDTA), camada de CMNSP (interface entre o diluente e o Ficoll-Hipaque), reagente Ficoll-Hipaque, camada rica em neutrófilos (fina camada de células brancas sobre as hemácias), e a última camada que consiste nas hemácias sedimentadas. O diluente foi descartado e a camada de CMNSP transferida para outro tubo. Uma alíquota da solução celular foi diluída para contagem das células viáveis em câmara de Neubauer. As células foram lavadas (ressuspensas em RPMI-EDTA e centrifugadas a 400 x g por 3 minutos), o sobrenadante retirado e o precipitado suspenso em RPMI completo suplementado com glutamina 2 x 10^{-3} M e 2-OH-mercaptoethanol 5 x 10^{-5} M.

As CMNSP (1 x 10^{6}/mL) foram utilizadas para estudo da citotoxicidade sobre células não tumorais das moléculas mais ativas encontradas neste estudo. Para isto, as CMNSP foram cultivadas por 72 h a 37^{o}C, em atmosfera úmida e com 5% de CO_2, em RPMI suplementado, com e sem Fitohemaglutinina (PHA) 2,5 µg/mL, na presença e ausência de diferentes concentrações das moléculas que apresentaram maior ação citotóxica na linhagem tumoral mais sensível (volume final de 200 µl/poço, placa de 96 poços).

4.3 Efeitos estudados dos análogos da terpenila nitrona LQB-278

4.3.1 Ensaio de citotoxidade

Para o screening inicial de citotoxicidade das diferentes moléculas, utilizamos o ensaio de MTT, que consiste na avaliação da atividade redutora mitocondrial, determinada pela redução do sal de tetrazol MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenilltetrazolium) em cristais de formazan, por desidrogenases mitocondriais de células vivas (Prado, 2012). Deste modo, um aumento ou diminuição no número de células vivas está linearmente relacionado com a atividade mitocondrial e capacidade de redução do MTT (Van Meerloo et al, 2011; Riss et al, 2013).

As células em cultura eram contadas em câmara de newbauer, centrifugadas a 400 x g, 3 min, ressuspensas em meio de cultura completo, distribuídas em placas de 96 poços para

concentração final de 1 x 10^5/mL (volume final de 100 µL) e tratadas com as diferentes moléculas na concentração de 10 µM por 72 h a 37^{o}C e 5% de CO_2. Ensaios controle foram realizados para investigação da ação citotóxica do solvente DMSO nas mesmas condições de incubação (1 x 10^5 céls/mL e 72 h), assim como teste da interferência das moléculas sobre o ensaio do MTT, como ação redutora das moléculas testadas na ausência de células e absorção de luz no mesmo comprimento de onda do ensaio. A concentração máxima de DMSO na cultura foi de 0,01%, e todas as amostras, inclusive o branco, receberam essa concentração de DMSO.

Após a incubação por 72h com as amostras, as células foram submetidas à ação do MTT (5 mg/mL em PBS), 10 µL/poço, sendo incubadas por 4 h com este reagente, a 37^{o}C e 5% CO_2. Após esta incubação com o reagente MTT, os cristais de formazan eram solubilizados em 100 µL de SDS 10% com HCl 0,01 N (v/v), por incubação overnight a 37^{o}C, e a absorvância era determinada em espectrofotômetro de microplaca a 570 nm. Neste tipo de ensaio, o branco consiste na incubação do meio de cultura com o MTT. A média da absorvância (Abs) das triplicatas dos brancos era descontada dos valores de absorvância dos ensaios com as amostras. A absorvância obtida com as células que não eram submetidas aos tratamentos era considerada como 100% de viabilidade. Os resultados eram expressos na forma de percentual de viabilidade, em relação ao controle.

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Abs}_{570nm} \text{ da amostra}}{\text{Média da Abs}_{570nm} \text{ do controle}} \times (100)$$

4.3.2 Produção e dosagem de óxido nítrico

A atividade anti-inflamatória *in vitro* foi avaliada pela capacidade de inibição da produção de óxido nítrico (NO), um importante mediador da resposta inflamatória, por macrófagos da linhagem celular RAW 264.7. Para isso, as células (1 x 10^5/poço) foram incubadas overnight a 37^{o}C e 5% CO_2, em placa de 96 poços (volume de 50 µL). No dia seguinte adicionava-se 25 µL das diferentes diluições das moléculas mais ativas e 25 µL de LPS (1 µg/mL final), e incubava-se a placa (5 x 10^5/mL, 100 µL/poço) por 24 h a 37^{o}C e atmosfera úmida com 5% CO_2. O LPS é um lipopolissacarídeo de membrana de bactérias, que

estimula os macrófagos a produzirem óxido nítrico, que pode ser determinado nos sobrenadantes de cultura.

A determinação da concentração de NO em tais amostras foi realizada de forma indireta, pois o NO produzido pelos macrófagos em cultura é transformado espontaneamente em nitrito, e este, então, pode ser dosado pela reação de Griess (Green *et al*., 1982). Neste teste forma-se um composto de coloração rosada pela reação do nitrito com os reagentes ácido sulfanílico e dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina. Desta forma, após a incubação dos macrófagos com o LPS por 24 h, 100 µL do sobrenadante foram transferidos para outra microplaca, aos quais foram adicionados 50 µL/poço de Ácido Sulfanílico a 10 mg/mL, seguido de incubação a temperatura ambiente por 10 min, no escuro. O Ácido Sulfanílico reage com o nitrito do sobrenadante formando um sal de diazônio. Em seguida, adicionava-se 50 µL/poço de dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina 1mg/mL, e incubava-se por mais 10 minutos a temperatura ambiente, quando esta substância, então, reagia com o sal de diazônio da reação anterior, formando um produto rosado que pode ser lido em espectrofotômetro de microplaca a 550 nm (Ramos *et al*., 2006).

Os efeitos das moléculas mais ativas sobre a produção de nitrito foram expressos em percentuais, em relação às células estimuladas com LPS na ausência de amostras, considerado com 100%. A produção de nitrito pelas amostras, em percentual, foi determinada pela fórmula abaixo (Am-amostra, Ct- controle):

$$\text{Produção de NO (\%)} = \frac{\text{Absorvância}_{550\ nm}\ \text{Am}}{\text{Média da absorvância}_{550\ nm}\ \text{Ct}} \times 100$$

Para verificar se o efeito sobre a produção de NO estaria ocorrendo por ação imunoreguladora ou citotóxica das moléculas, realizou-se simultaneamente o ensaio de MTT, conforme descrito anteriormente, com os macrófagos utilizados na produção de NO. Para tal, foram adicionados 50 µL de meio à cada poço, totalizando um volume final por poço de 100 µL de sobrenadante na placa do ensaio de produção do NO, juntamente com as células. Posteriormente, foram adicionados 10 µL da solução de MTT. Os resultados de viabilidade estão apresentados em percentuais, sendo considerado como 100% de viabilidade a absorvância obtida com as células estimuladas com LPS na ausência dos tratamentos.

4.3.3 Análise do ciclo celular

Para análise da proliferação celular e ciclo celular as células ($1x10^5$/mL) foram incubadas (em garrafas de cultura de 75 cm^2) na presença do LQB-287 (1, 2 e 3 µM), LQB-292 (1, 3 e 5 µM) e LQB-461 (2, 3 e 5 µM) ou 0,01% de DMSO, que foi a maior concentração de DMSO encontrada nas culturas e, portanto padronizada em todas as garrafas, por 72 h a 37^{o}C e 5% de CO2 e atmosfera úmida. Cultura controle sem DMSO e cultura com etoposídeo 0,1 µM também foram realizadas sob as mesmas condições de incubação dos LQBs.. O etoposídeo é um fármaco utilizado atualmente no tratamento de diversos tipos de câncer (Baldwin e Osheroff, 2005).

Após o tempo de incubação, a contagem celular de cada ponto experimental foi determinada em câmara de Neubauer, com azul de tripan, para determinação da viabilidade celular. O equivalente a $1x10^6$ células de cada condição experimental estudada era separado em um tubo falcon de 15 mL. Após centrifugação (400 x g, 3 min), as células eram suspensas em 500 µL de tampão citrato (43mM, pH 8,2) contendo PI (50 µg/mL) e triton X-100 (0,3%), o que permite a permeabilização das células, facilitando a marcação dos ácidos nucleicos pelo PI. As células eram incubadas por 15 min no escuro e em temperatura ambiente. Após a incubação, eram adicionados 500 µL de solução de enzima RNAse A (100 µg/mL, em tampão citrato 43 mM e pH de 8,2) para que o RNA em suspensão fosse hidrolisado, garantindo assim a marcação exclusiva de DNA. As amostras foram incubadas por mais 15 min a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorrido este tempo, as amostras tiveram a fluorescência do PI, proporcional ao conteúdo de DNA, detectadas no Citômetro de fluxo Gallios (Beckman Coulter), pelo canal FL2, tendo sido adquiridos 50.000 eventos por amostra. Os resultados estão expressos em percentual de células em cada fase do ciclo celular, obtidos a partir da análise do histograma de cada condição de cultura, pelo software Summit 4.3v.

4.3.4 Análise de apoptose por marcação com anexina-V

As anexinas constituem uma família de proteínas cálcio-dependentes fosfolipídio-ligantes, abundantes em organismos eucarióticos e intrinsicamente envolvidas na transdução

de sinal. A anexina-V tem afinidade preferencial por fosfatidilserina (PS), que é externalizada em células que estão entrando em apoptose.

As células ($1x10^5$/mL) eram incubadas (em garrafas de cultura de 75 cm^2) na presença do LQB-287 (1, 2 e 3 µM), LQB-292 (1, 3 e 5 µM), LQB-461 (2, 3 e 5 µM) ou 0,01% de DMSO, que foi a maior concentração de DMSO testada nas amostras e, portanto padronizada em todos os poços, por 72 h a 5% de CO_2 e atmosfera úmida. Cultura controle sem DMSO e com etoposídeo 0,1 µM também foram realizadas sob as mesmas condições de incubação dos LQBs.. O etoposídeo é um fármaco utilizado atualmente no tratamento de diversos tipos de câncer (Baldwin e Osheroff, 2005).

Após o tempo de incubação, a contagem celular de cada ponto experimental era determinada em câmara de Neubauer, com azul de tripan, para determinação da viabilidade celular. O equivalente a $1x10^6$ células de cada condição experimental estudada era separado em um tubo falcon de 15 mL. Após centrifugação (400 x g, 3 min), eram adicionados 500 µL de PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 e 1,5 mM KH_2PO_4) para lavagem das células e era feita nova centrifugação (400 x g, por 3 min). Após a lavagem e descarte do sobrenadante, eram adicionados 500 µL de tampão de ligação para ressuspensão do precipitado celular (Hepes 10 mM NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM $CaCl_2$). Dos 500 µL preparados na etapa anterior, transferia-se 100 µL para o tubo de citometria, adicionava-se ao tubo 2,5 µL de Anexina V conjugada a FITC e incubava-se 15 minutos em temperatura ambiente na ausência de luz. Após esse tempo de incubação, eram adicionados 200 µL de tampão de ligação para lavagem das células. Centrifugava-se (400 x g, 3 min) e após descartar o sobrenadante adicionava-se 2,5 µL de iodeto de propídio (20 µg/mL), e mais 500 µL de tampão de ligação para a leitura poder ser realizada. As amostras eram analisadas no Citômetro de fluxo Gallios (Beckman Coulter) em até 1h após a marcação, deixando-se as células marcadas condicionadas a temperatura de 2 a 8 °C e no escuro, sendo adquiridos 50.000 eventos por amostra. A fluorescência da Anexina V-FITC foi detectada pelo canal FL1 e a do PI pelo canal FL-3. Os resultados estão expressos em percentual de células anexina-V^+PI^- (em apoptose inicial), e anexina-V^+PI^+ (em apoptose tardia), obtidos a partir da análise dos citogramas de cada condição de cultura, pelo software Summit 4.3v.

4.3.5 Expressão da proteína p21

O gene p21 codifica uma proteína inibidora de cinase dependente de ciclina (CDCI) que atua na regulação do ciclo celular, inibindo a atividade dos complexos ciclina-CDC2 ou –CDC4, funcionando como um regulador da progressão do ciclo celular, podendo levar à parada em G1 ou desempenhar papel regulatório na fase S do ciclo e no reparo do DNA (Gompel *et al.*, 2001; Abbas *et al.*, 2005).

As células ($1x10^5$/mL) foram incubadas (em garrafas de cultura de 75 cm^2) na presença do LQB-287 (1, 2 e 3 µM), LQB-292 (1, 3 e 5 µM), LQB-461 (2, 3 e 5 µM) ou 0,01% de DMSO, que foi a maior concentração de DMSO testada nas amostras e, portanto padronizada em todos os poços, por 72 h a 5% de CO_2 e atmosfera úmida. Cultura controle sem DMSO e com etoposídeo 0,1 µM também foram realizadas sob as mesmas condições de incubação dos LQBs. O etoposídeo é um fármaco utilizado atualmente no tratamento de diversos tipos de câncer (Baldwin e Osheroff, 2005).

Após o tempo de incubação com os LQBs, a contagem celular de cada condição experimental era determinada em câmara de Newbauer, com azul de tripan, para determinação da viabilidade celular. O equivalente a $1x10^6$ células de cada condição experimental estudada era separado em um tubo falcon de 15 mL. Após centrifugação (400 x g, 3 min), eram adicionados 500 µL de PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 e 1,5 mM KH_2PO_4) para lavagem das células e era feita nova centrifugação (400 x g, por 3 min). Após a lavagem e descarte do sobrenadante, eram adicionados 100 µL por tubo do permeabilizante facslising diluído 10 x em água MilliQ (o estoque está 10x concentrado), e deixava-se incubando por 10 min em temperatura ambiente. Após este período, lavava-se com 100 µL de PBS (com 5% de soro fetal bovino), centrifugando a 400 x g, 3 min. Após o descarte do sobrenadante, com os tubos no gelo, eram adicionados 2,5 µL de anticorpo anti-p21 humano conjugado a PE diretamente sobre o precipitado celular. Logo em seguida era feita a incubação por 30 min, no gelo e ao abrigo da luz. Após a incubação foram adicionados 500 µL de PBS para lavagem das células e foi feita nova centrifugação (400 x g, 3 min). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 500 µL de PBS. As amostras foram analisadas no Citômetro de fluxo Gallios (Beckman Coulter), sendo adquiridos 50.000 eventos por amostra. A fluorescência da ficoeritrina (PE), associada ao anticorpo anti-p21, foi detectada pelo canal FL2. Os resultados foram analisados utilizando-se o software Summit 4.3v, e estão expressos em porcentagem líquida de fluorescência do

anticorpo marcado, isto é, a fluorescência de cada condição de cultura, dada em porcentagem nos histogramas, foi descontada do percentual de fluorescência basal da célula não marcada.

4.3.6 Análise estatística

A análise de variância dos resultados foi realizada pelo teste *One-way* ANOVA, seguido do pós teste de Tukey para análise de significância. As diferenças com $p<0,05$ foram consideradas significativas. A concentração que promove a inibição de 50% do crescimento celular (IC50) foi determinada por análise de regressão não-linear. Para as análises estatísticas e cálculo do IC50 foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0.

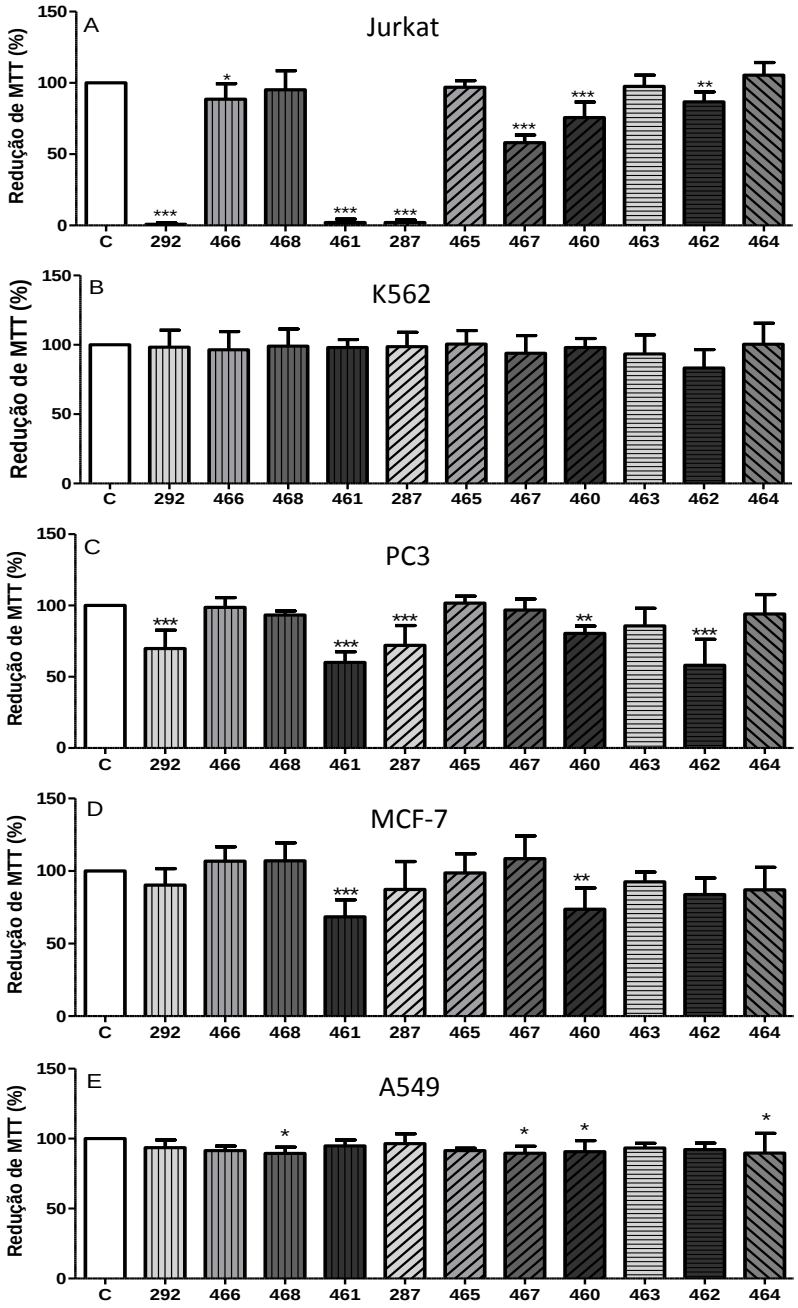
5 RESULTADOS

5.1 Ratreamento da atividade citotóxica *in vitro* das moléculas análogas ao LQB-278

Para avaliar a ação antitumoral das moléculas análogas do LQB-278, foram realizados ensaios de viabilidade celular pela técnica do MTT, no qual é aferida a capacidade redutora mitocondrial das células viáveis (Prado, 2012). Ensaios controle foram realizados para investigação da ação citotóxica do solvente Dimetil sulfóxido (DMSO) nas diversas linhagens utilizadas nos estudos (leucêmicas linfocítica aguda Jurkat e mielóide crônica K562, prostática PC3, mamária MCF-7 e pulmonar A549) na concentração de 0,01% (maior utilizada nos experimentos) nas mesmas condições de incubação dos ensaios de citotoxicidade (1×10^5 céls/mL e incubação de 72 h), visto que este solvente foi utilizado para suspensão da solução estoque das moléculas estudadas e o mesmo apresenta toxidade celular *in vitro* e *in vivo* já descritas na literatura (Sturion *et al.*, 99; Vondráček *et al*., 2006; Ribeiro *et al*., 2001; Koiri e Trigun, 2011). Os resultados do ensaio controle com o solvente DMSO mostraram que o mesmo não apresentou atividade citotóxica. Também foi realizado, como controle do teste de viabilidade celular pelo MTT, a determinação da capacidade das diferentes moléculas análogas ao LQB-278 de reduzir o MTT na ausência de células, e/ou interferir na absorção de luz a 570 nm, comprimento de onda de leitura do ensaio. As absorvâncias obtidas com as diferentes moléculas a 10 µM não apresentaram diferenças significativas, em relação ao meio de cultura com o MTT, indicando que todas as moléculas analisadas não apresentam potencial redutor sobre o MTT, nem absorveram luz no comprimento de onda utilizado no ensaio.

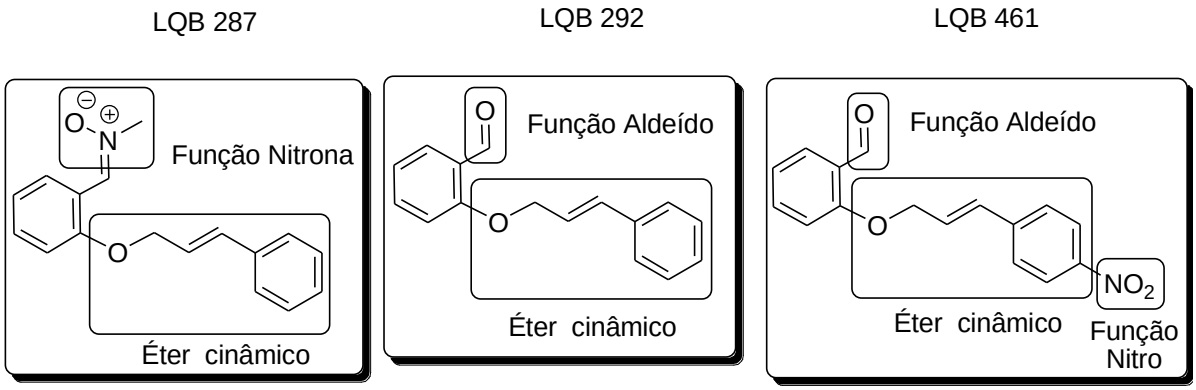
Com os ensaios controle realizados e validados, iniciou-se os testes de viabilidade com os análogos do LQB-278 em diferentes linhagens tumorais (PC3, MCF-7 e A549) e leucêmicas. Diversas moléculas apresentaram efeitos citotóxicos significativos nas várias linhagens avaliadas (Figura 5). Contudo, os análogos LQB-292, LQB-287 e LQB-461 (Figura 6) foram os que apresentaram efeito antitumoral mais expressivo na leucemia Jurkat, considerada a mais sensível dentre as células estudadas.

Figura 5 – Efeito dos análogos do LQB-278 sobre a viabilidade de linhagens tumorais e leucêmicas.



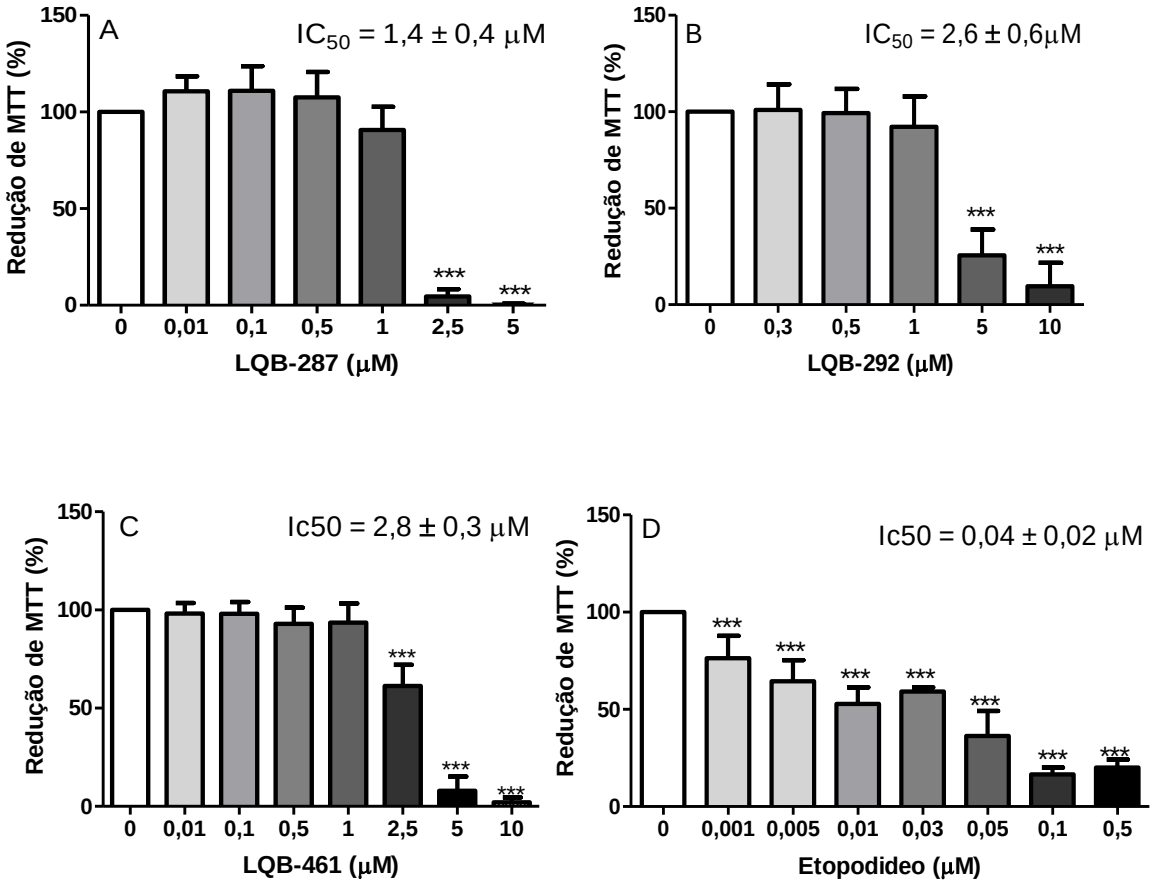
Legenda: A. Leucemia Jurkat, B. Leucemia K562, C. Linhagem tumoral prostática PC3, D. Linhagem tumoral de mama MCF-7, E. Linhagem tumoral pulmonar A549. As cé1ulas (1 x 10^5/mL) foram tratadas ou não por 72 h com as moléculas alvo (10 µM). Dados representam a média ± DP de três experimentos. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001, em relação ao controle (One-way ANOVA seguido de teste de Tukey).

Figura 6 – Estrutura química dos análogos mais ativos em células leucêmicas Jurkat.



Em vista dos resultados encontrados no rastreamento inicial (figura 5), realizou-se, então ensaios de MTT com linhagem celular mais sensível, a leucemia linfocítica aguda Jurkat, determinando curvas de concentrações dos três análogos mais ativos (LQB-292, LQB-287 e LQB-461) com o objetivo de obter a concentração que induz a morte de 50% das células em cultura (IC_{50}). Foi determinado, também, o IC50 do composto Etoposídeo para a mesma linhagem celular uma vez que este fármaco é utilizado no tratamento de câncer, sendo utilizado aqui como controle positivo. Os resultados obtidos estão representados na figura 7. Observa-se que o LQB-287 foi o que apresentou maior toxidade na linhagem Jurkat (IC_{50} = 1,4 ± 0,4 µM), seguido do LQB-292 (IC_{50}= 2,6 ± 0,6 µM) e LQB-461(IC_{50}=2,8 ± 0,3µM).

Figura 7 – Efeito do LQB-292, LQB-287, LQB-461 e Etoposídeo sobre a viabilidade celular em Jurkat.



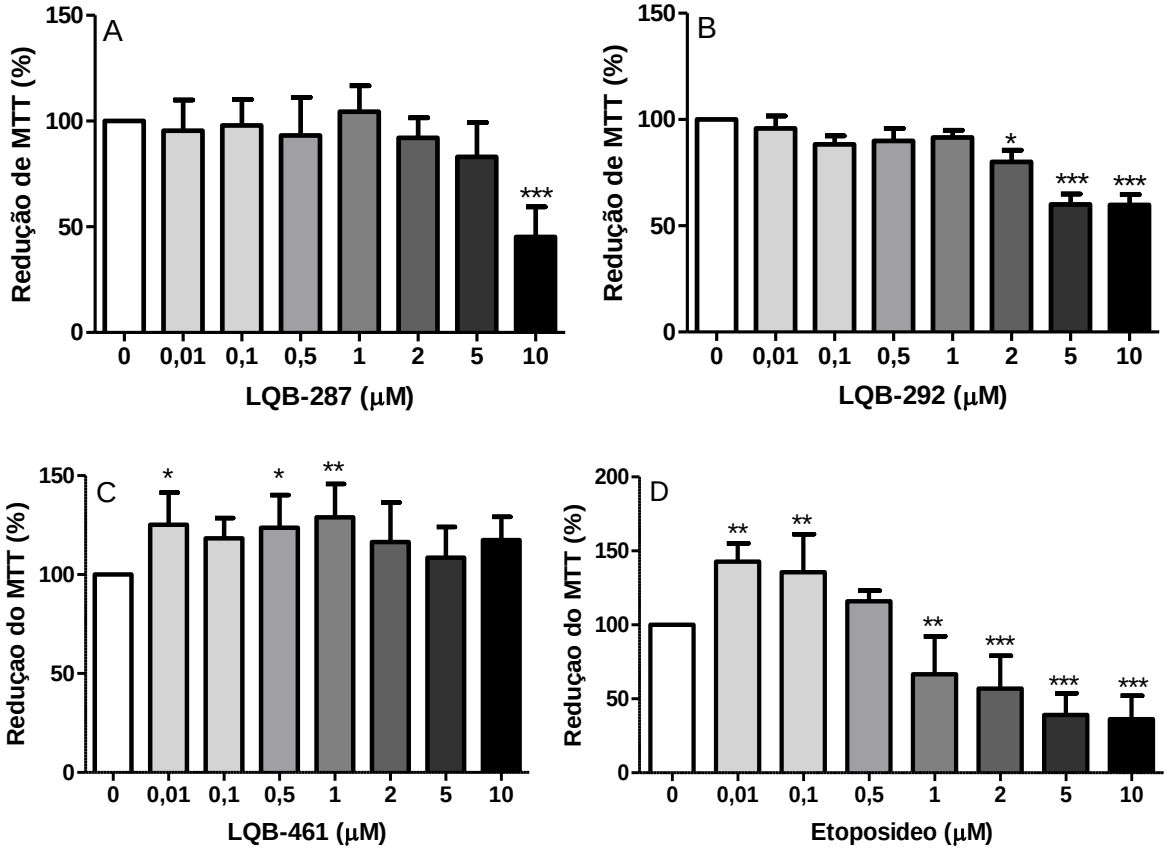
Legenda: Em A. LQB-2872, B. LQB-292, C. LQB-461, D. Etoposídeo. As células (1 x 105 /mL) foram tratadas ou não por 72 h a 37°C e 5% CO2 com as moléculas alvo. Dados representam a média ± DP de três experimentos independentes. ***p<0,001, em relação ao controle (One-way ANOVA seguido de teste de Tukey).

5.2 Citotoxidade do LQB-287, LQB-292 e LQB-461 em células não tumorais

Visto que os atuais tratamentos para leucemia continuam agressivos, e ainda com possibilidade das leucemias desenvolverem resistência ao tratamento, a busca por novas alternativas terapêuticas com maior especificidade para as células leucêmicas, maior eficácia e ou menor toxicidade para células não tumorais continua representando uma área fundamental da pesquisa científica. Tendo em vista a importante ação citotóxica dos análogos LQB-292, LQB-287 e LQB-461 sobre a linhagem leucêmica Jurkat, outro objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxidade dessas moléculas sobre células não tumorais. Neste sentido, incubamos tais moléculas com as células imortalizadas não tumorais de fibroblasto NIH-3T3. As condições de incubação foram as mesmas dos ensaios com as linhagens tumorais, e os resultados obtidos podem ser observados na figura 8.

Podemos observar que, embora o LQB-287 (figura 8.A.) e o LQB-292 (figura 8.B.) tenham apresentado certa citotoxicidade ($p<0,001$) sobre a linhagem NIH-3T3, seus IC50 (9,3 ± 4 e >10 µM, respectivamente) se mostraram bem maiores que os obtidos para células leucêmicas Jurkat (1,4 ± 0,4 µM e , 2,6 ± 0,6 µM, respectivamente), sugerindo certa especificidade de toxicidade destas moléculas para células leucêmicas, um resultado promissor no processo de desenvolvimento de agentes antitumorais. O LQB-461 (figura 8.C.) não apresentou toxidade para linhagem não tumoral em nenhuma das concentrações testadas. Pelo contrário, o LQB-461 mostrou efeito estimulador em algumas concentrações, não sendo um efeito concentração-dependente.

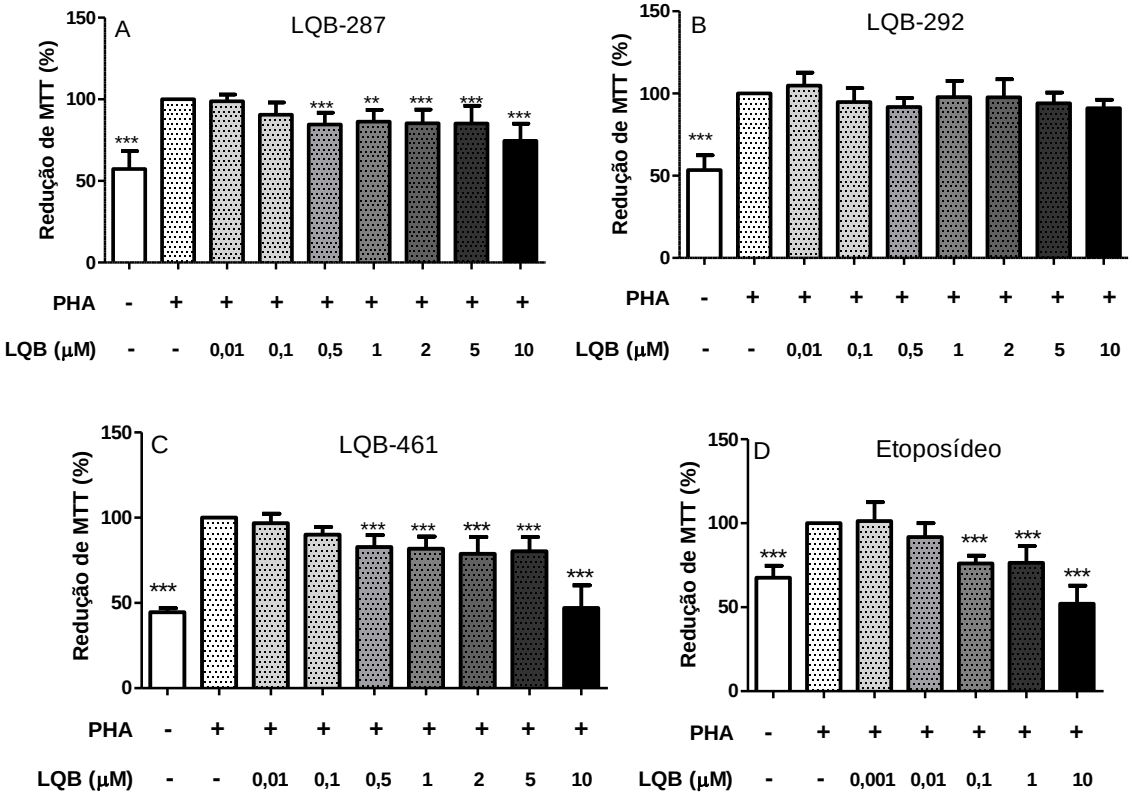
Figura 8 – Efeito do LQB-287, LQB-292 e LQB-461 sobre a viabilidade da linhagem NIH-3T3.



Legenda: A. LQB-287, B. LQB-292, C. LQB-461, D. Etoposídeo. As células (1 x 105/mL) foram tratadas ou não por 72 h a 37°C e 5% CO2, com as moléculas alvo. Dados representam a média ± DP de três experimentos independentes. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001, em relação ao controle (One-way ANOVA seguido de teste de Tukey).

Tendo obtido resultados promissores de baixa toxicidade dos LQB-287, LQB-292 e LQB-461 sobre fibroblastos não tumorais, o próximo passo foi avaliar a ação de tais moléculas em células mononucleares de sangue periférico humano (CMNSP). Podemos observar na figura 9 que apesar dos análogos LQB-287 (figura 9.A.) e LQB-461 (figura 9.C.) apresentarem efeito citotóxico em CMNSP nas maiores concentrações testadas, esse efeito é significativamente menor que o efeito observado em linhagem leucêmica Jurkat (figura 7). O LQB-292 mostrou resultados ainda mais interessantes, não apresentando atividade citotóxica significativa sobre CMNSP em nenhuma das concentrações testadas (figura 9.B.).

Figura 9 – Toxicidade dos análogos LQB-287, LQB-292 e LQB-461 em CMNSP.



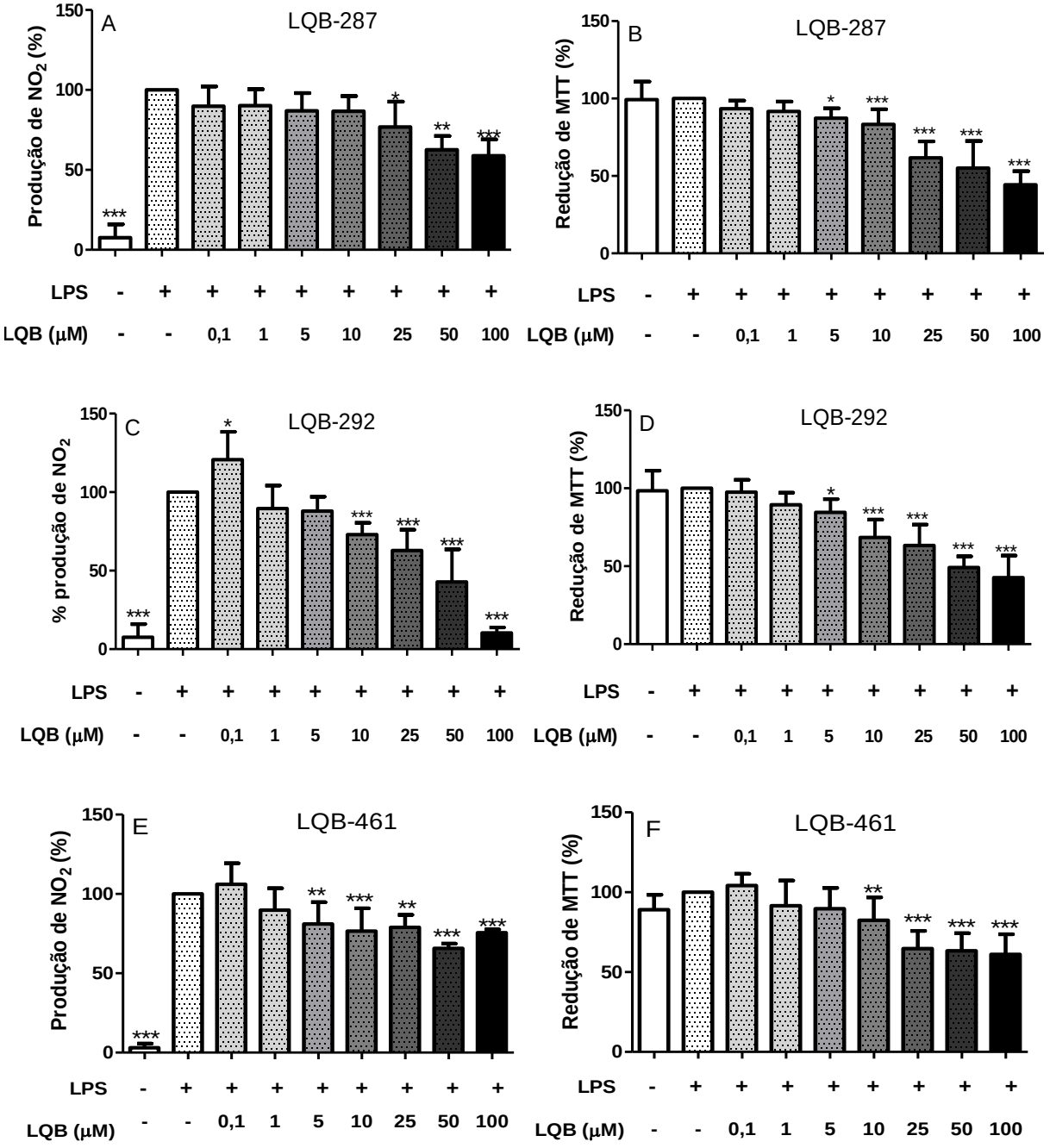
Legenda: Em A. LQB-287, B. LQB-292, C. LQB-461, D. Etoposídeo. As células (1 x 106 /mL foram tratadas ou não por 72 h a 37°C e 5% CO2, com as moléculas alvo em várias concentrações e 5 µg/mL fitohemaglutinina (PHA). Dados representam a média ± DP de três experimentos. **p<0,01 e ***p<0,001, em relação ao controle (One-way ANOVA seguido de teste de Tukey).

5.3 Avaliação do potencial anti-inflamatório *in vitro* do efeito dos tratamentos com as drogas LQB-287, LQB-292 e LQB-461

As moléculas estudadas neste trabalho foram sintetizadas a partir da ciclização de um fragmento terpenila associado ao PBN. Além do PBN ser conhecido na literatura por sua ação antitumoral e antiproliferativa em modelos animais de câncer (Doblas *et al*., 2008; Floyd *et al*., 2010), ele também possui ação anti-inflamatória bem demonstrada (Asanuma *et al.,* 2008; Doblas *et al*., 2008; Floyd *et al*., 2010). Sua atividade anti-inflamatória parece estar relacionada à supressão da expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Floyd *et al.*, 2008; 2010). Como existe uma íntima relação de causa e efeito entre a inflamação e o câncer (Medzhitov, 2008; Doblas *et al*., 2008; Lonkar e Dedon, 2011 Hjelmeland e Zhang, 2016), resolvemos investigar o potencial anti-inflamatório do LQB-292, LQB-287 e LQB-461, uma vez que estas moléculas apresentaram maior ação antileucêmica entre os análogos testados da terpenila-nitrona LQB-278.

A atividade anti-inflamatória *in vitro* das moléculas foi avaliada pela capacidade de inibição da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos da linhagem RAW 264.7 estimulados pelo lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli*. Nos resultados obtidos com o LQB-287, LQB-292 e LQB-461, apresentados na figura 10.A., 10.C. e 10.E., respectivamente, podemos observar que os LQBs apresentam ação inibitória significativa da produção *in vitro* de NO em diversas concentrações, em relação ao controle estimulado. Contudo, comparando com o ensaio de citotoxicidade pelo MTT sobre tais células, encontramos diminuição significativa da viabilidade celular (figura 10.B., 10.D. e 10.F., respectivamente). Embora, vale destacar, que em algumas concentrações (100 µM do LQB-292; 0,1 µM do LQB-287 e 5 µM do LQB-461) a inibição da viabilidade do macrófago não tenha sido de forma tão expressiva quanto foi na diminuição da produção NO.

Figura 10 – Efeito do LQB-287, LQB-292 e LQB-461 na produção de NO e viabilidade de células RAW-264-7.



Legenda: A. e B. LQB-287, C. e D. LQB-292, E. e F. LQB-461. Células (5 x 10^5 /mL) foram tratadas ou não por 24 h com as moléculas alvo e 1 µg/mL LPS, seguido de reação de Griess. Dados representam a média ± DP de três experimentos. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001, em relação ao controle com LPS (One-way ANOVA seguido de teste de Tukey).

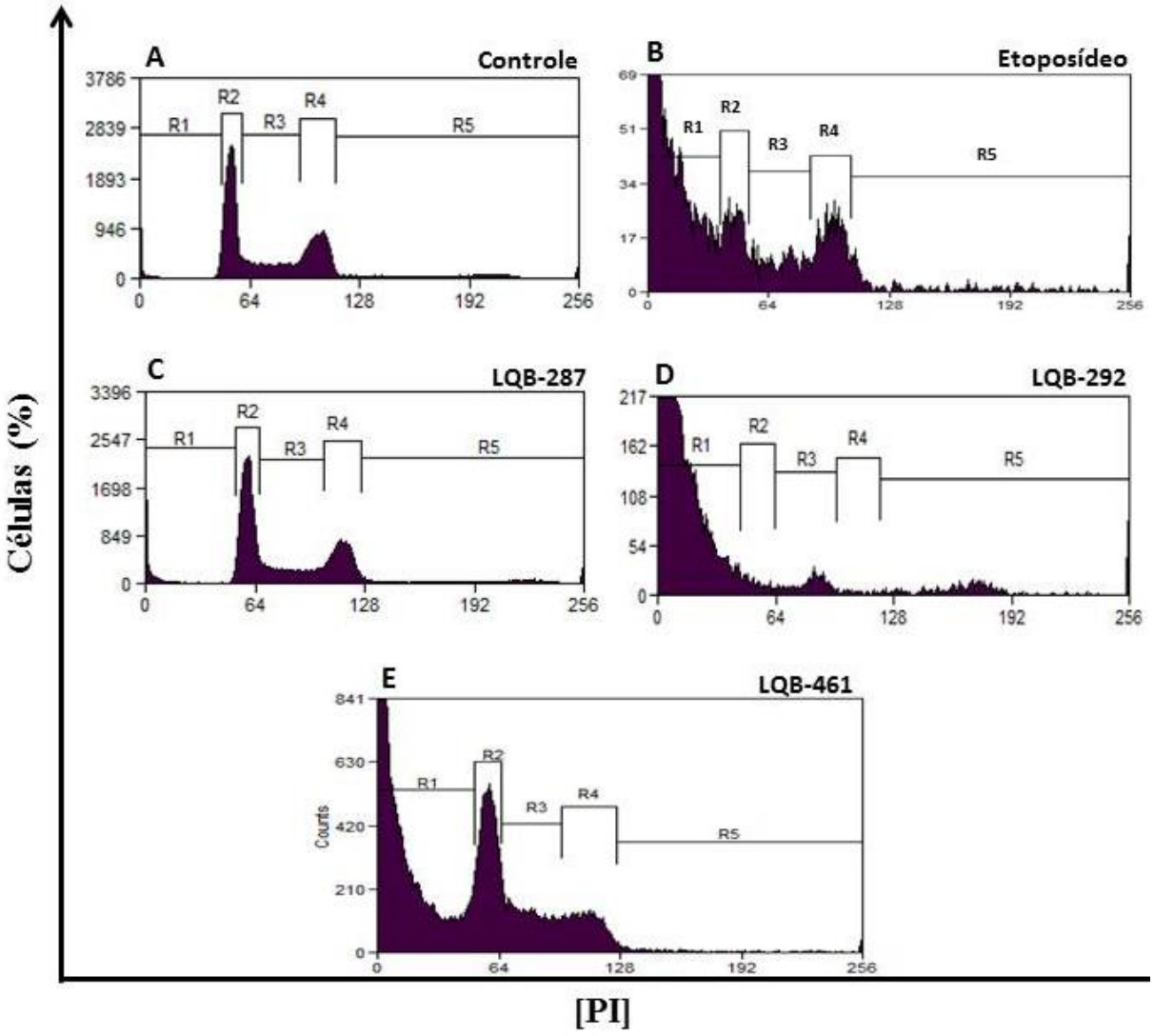
5.4 Efeito dos tratamentos com LQB-287, LQB-292 e LQB-461 no crescimento e ciclo celular

Tendo os análogos LQB-287, LQB-292 e LQB-461 apresentado resultados promissores de citotoxicidade em células de leucemia Jurkat, se tornou interessante investigar os efeitos destas moléculas no crescimento destas células e em relação às diferentes fases do ciclo celular. Para isso, as células Jurkat foram incubadas com as moléculas por 72 h e posteriormente contadas com azul de tripan e marcadas com iodeto de propídeo para análise do ciclo celular. Como controle positivo dos ensaios, tanto de proliferação, como do ciclo celular, utilizamos novamente o quimioterápico Etoposídeo.

A figura 11 mostra um experimento representativo de ciclo celular de células Jurkat mostrando o perfil dos histogramas com as fases sub-G1, G1, S e G2/M para controle e tratamentos. Observa-se um aumento evidente de sub-G1 nos tratamentos com etoposídeo (Figura 11.B.), LQB-292 e LQB-461 (Figura 11.B., 11.C. e 11.D, respectivamente) e perfil semelhante ao controle para o LQB-287, em todas as fases do ciclo (Figura 11.C.). Para avaliarmos as diferenças entre os grupos em todas as fases do ciclo avaliemos a Figura 12, que mostra as médias de vários experimentos.

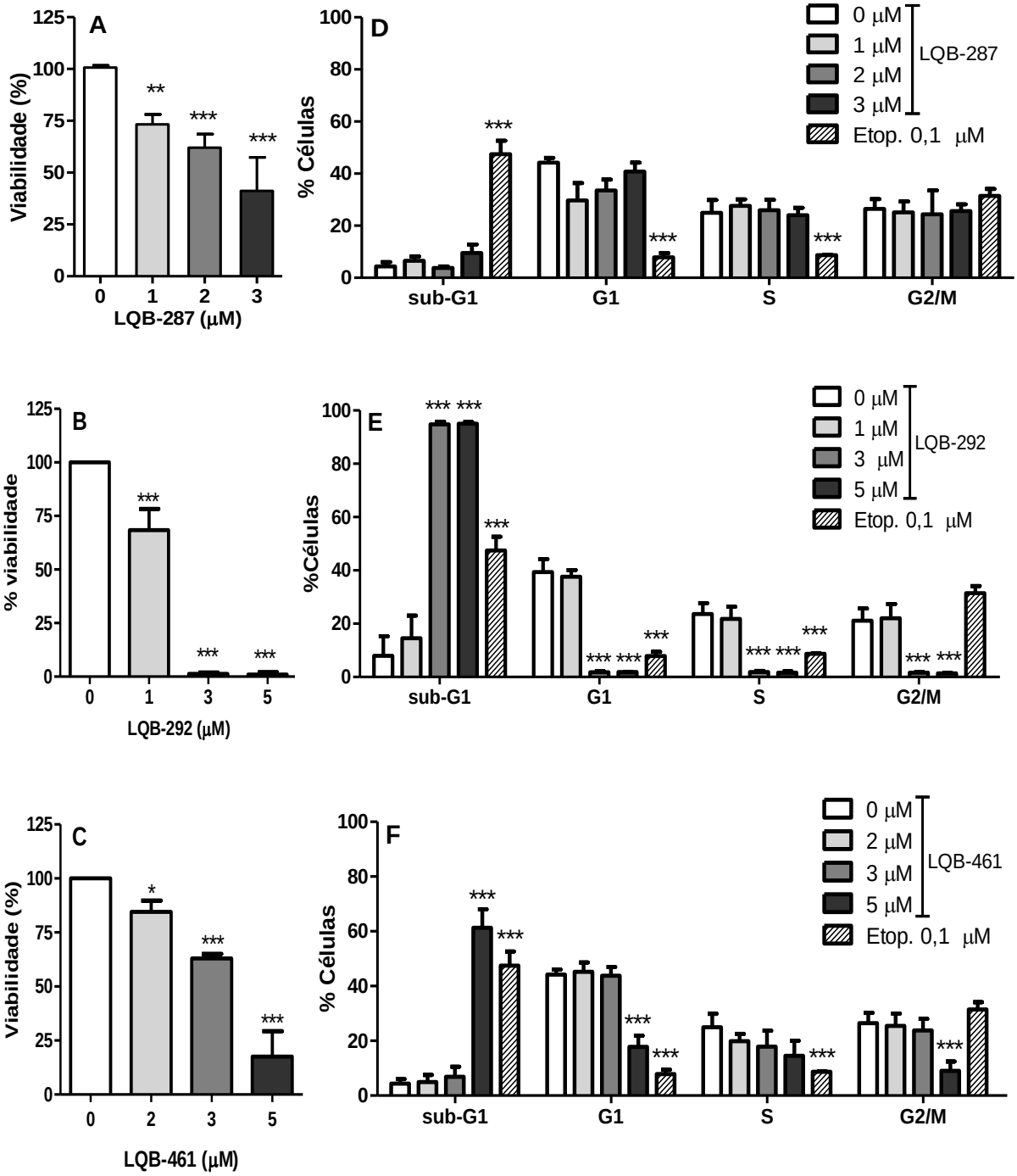
A figura 12.A. mostra a viabilidade das células Jurkat tratadas pelo LQB-287. Os tratamentos com 1, 2 e 3 µM induziram inibições de 26,8 ± 4,8%, 38 ± 6,5% e 58,8 ± 16,1% na proliferação destas células. Já a figura 12.B. mostra a viabilidade das células Jurkat tratadas pelo LQB-292. Os tratamentos com 1, 3 e 5 µM induziram inibições de 31,6 ± 9,8%, 96,6 ± 0,6% e 99 ± 1% na proliferação destas células, enquanto a figura 12.C. mostra a viabilidade das células tratadas pelo LQB-461 nas concentrações 2, 3 e 5 µM, as quais induziram inibições de 15,5 ± 5,2%, 34-± 6,2% e 82,4 ± 11,7% na proliferação das mesmas. Comparando os efeitos de tais moléculas na proliferação podemos concluir que o LQB- 287 foi o mais potente em inibir a proliferação das células Jurkat.

Figura 11 – Histogramas representativos da análise do ciclo celular de células Jurkat.



Legenda: Em A. Controle, B. Etoposídeo, C. LQB-287 (3 µM), D. LQB-292 (5 µM) e E. LQB-461 (5 µM). Células representam em R1- sub-G1, R2- G1, R3- S, R4- G2/M e R5- poliploidia. As células ($1x10^5$/ml) foram incubadas na ausência (controle com DMSO 0,01%) ou presença do LQB-287, LQB-292, LQB-461 ou Etoposídeo (Etop) por 72 h a 37°C e 5% CO_2

Figura 12 – Efeito do LQB-287, LQB-292 e LQB-461 na proliferação e no ciclo celular de células Jurkat.



Legenda: (A-C) Viabilidade (%), (D-F) Percentual de células nas fases do ciclo celular (%). As células ($1x10^5$/ml) foram incubadas na ausência (controle com DMSO 0,01%) ou presença do LQB-287, LQB-292, LQB-461 ou Etoposídeo (Etop) por 72 h a 37°C e 5% CO_2. A viabilidade celular foi determinada por exclusão de azul de tripan. A análise do ciclo celular foi baseada na marcação com iodeto de propídio conforme descrito na seção de métodos. Os dados representam a média ± DP de três experimentos independentes. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, em relação ao controle (One-way ANOVA seguido de teste de Tukey).

Com relação aos efeitos no ciclo celular em células Jurkat, observamos que o LQB-287 não exerce ação específica em nenhuma fase do ciclo celular (Figura 12D.). Por outro lado, o etoposídeo aumentou 8,2 vezes o percentual de células em sub-G1 (de 5,8 ± 4,7% no controle, para 47,5 ± 5,2%), e diminuiu em 81% as células na fase G1 (de 41,6 ± 4,4% no controle, para 7,9 ± 1,6%) e em 64,2% as células em S (de 24,3 ± 4,2% no controle, para 8,7 ± 1,4%), não apresentando alterações significativas na fase G2M. Os efeitos do LQB-292 e LQB-461 nas concentrações mais baixas (Figuras 12.E. e 12.F., respectivamente) se mostraram semelhantes aos do LQB-287, isto é, sem alteração significativa em nenhuma fase do ciclo celular. Contudo, as concentração de 5 µM do LQB-461 aumentou 10,6 vezes o número de células na fase sub-G1 (de 4,3 ± 1,7% no controle, para 61,3 ± 6,8%), diminuindo em 57,2% o número de células na fase G1 (de 44,2 ± 1,8% no controle, para 17,8 ± 4,0%) e 62,5% em G2/M (de 24 ± 4,7% no controle, para 9,0± 3,3%), não alterando significativamente a fase S. O LQB-292 aumentou significativamente em 16,4 vezes o número de células na fase sub-G1 nas concentrações de 3µM e 5µM (de 8 ± 7,3% no controle, para 94,8 ± 1,0% e 95,0 ± 0,6%, respectivamente), diminuindo o número de células na fase G1 em 95,7% e 95,4%, respectivamente (de 39,4 ± 4,8% no controle, para 1,8 ± 0,4% e 1,9 ± 0,1%), na fase S, com reduções de 92,2% e 93,0%, respectivamente (de 23,6 ± 4% no controle, para 1,9 ± 0,4% e 1,7 ± 0,5%) e em G2/M, com reduções de 93,3% e 94,2%, respectivamente (de21,2 ± 4,5% no controle, para 1,6 ± 0,3% e 1,4 ± 0,2%).

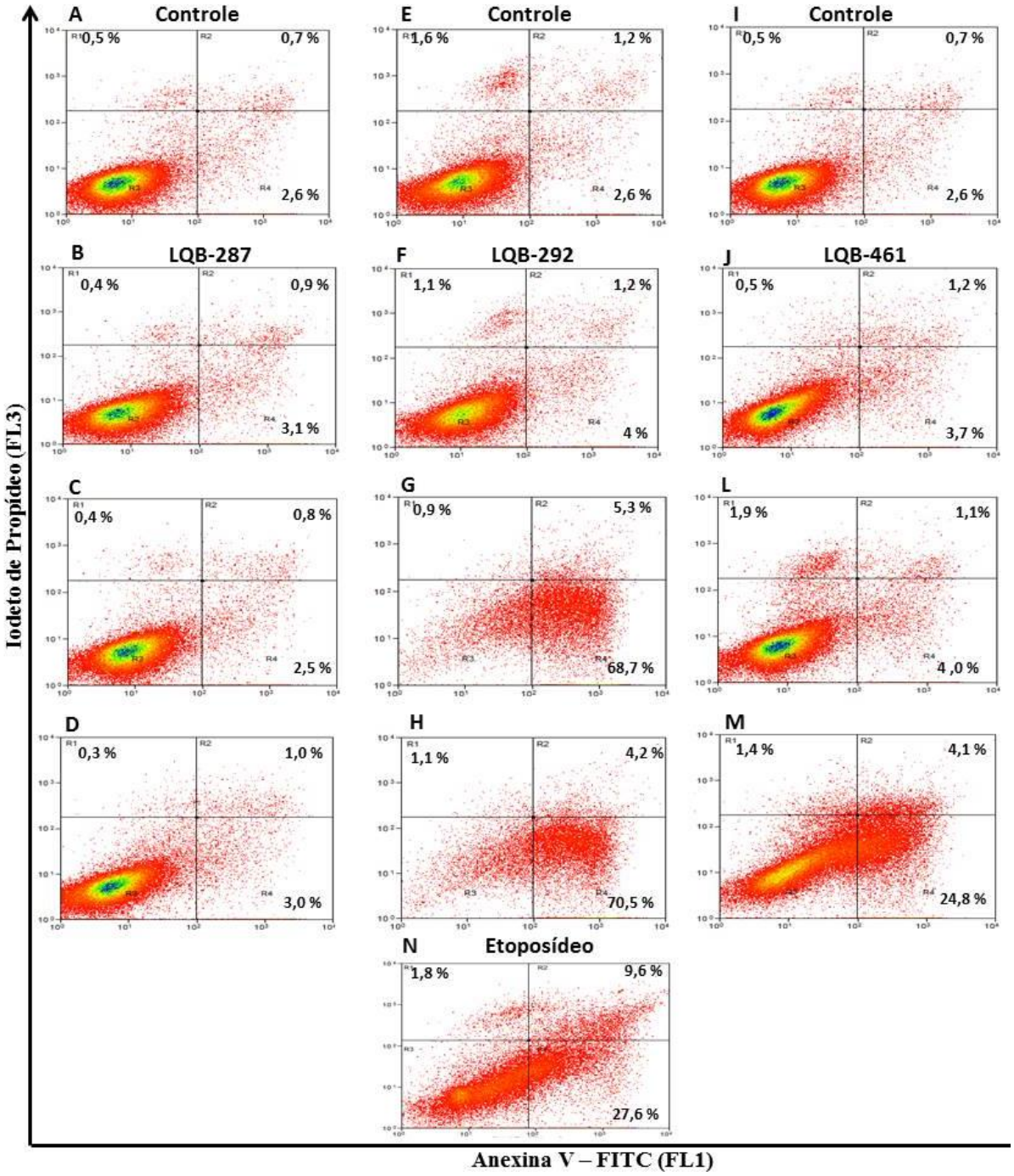
5.5 Efeito dos tratamentos com LQB-287, LQB-292 E LQB-461 na apoptose de células Jurkat

Diversos estudos mostram a forte ligação entre a ineficiência do processo apoptótico e a tumorigênese (Elmore, 2007; Cotter, 2009; Ouyang *et al.*, 2012). A melhor compreensão dos mecanismos que coordenam as vias de sinalização de apoptose, permitiu a elaboração de novas estratégias de tratamento e o desenvolvimento de fármacos com ação direcionada à indução de morte da célula tumoral por este mecanismo (Hongmei, 2012). Como neste trabalho os LQBs mais ativos inibiram significativamente a proliferação de células Jurkat, e o LQB-461 e o LQB-292 induziram aumento de células na fase sub-G1 do ciclo celular, decidimos aprofundar nossos estudos, avaliando a morte celular por apoptose.

Desta forma, incubamos as células leucêmicas Jurkat por 72 h na ausência (controle) ou presença do LQB-287, LQB-292, LQB-461 ou do controle positivo Etoposídeo, e submetemos à marcação com anexina-V-FITC e iodeto de propídio. Através de análise por citometria de fluxo, o aumento de fluorescência para anexina-V-FITC indica que a célula passou a expor o fosfolipídio fosfatidilserina na face externa da bicamada lipídica da membrana plasmática, o que sinaliza que a célula se encontra comprometida com a morte celular programada por processo apoptótico. Células com aumento de fluorescência para o PI caracterizam-se por perda da integridade da membrana plasmática, indicando morte celular por necrose. Aumento de fluorescência tanto para iodeto de propídio como para anexina-V-FITC indica que a célula se encontra em processo de apoptose tardia, onde há tanto a marcação de fosfatidilserina, quanto perda de integridade da membrana celular.

A figura 13 mostra resultados representativos. Podemos observar nos citogramas 13.B.-D. que o LQB-287 não induziu morte por apoptose nas concentrações de 1, 2 e 3 µM, respectivamente, assim como com o LQB-292 a 1 µM (citograma 13.F.) e o LQB-461 nas concentrações de 2 e 3 µM (citogramas 13.J. e 13.L., respectivamente). Por outro lado, o LQB-461 a 5 µM (citograma 13.M.) mostrou indução de apoptose inicial importante (24%), enquanto o LQB-292, nas concentrações de 3 µM (citograma 13.G.) e 5 µM (citograma 13.H.), induziu apoptose inicial acentuada (68,7% e 78,5%, respectivamente). O LQB-292 e o LQB-461 também aumentaram a apoptose tardia, de 0,7-1,2%, na cultura controle, para cerca de 4-5%, com tais LQBs. O controle positivo Etoposídeo (citograma 13.N.) induziu aumento tanto de apoptose inicial (27,6%) como tardia (9,6%).

Figura 13 – Efeito do LQB-287, LQB-292 e LQB-461 na apoptose de células Jurkat.

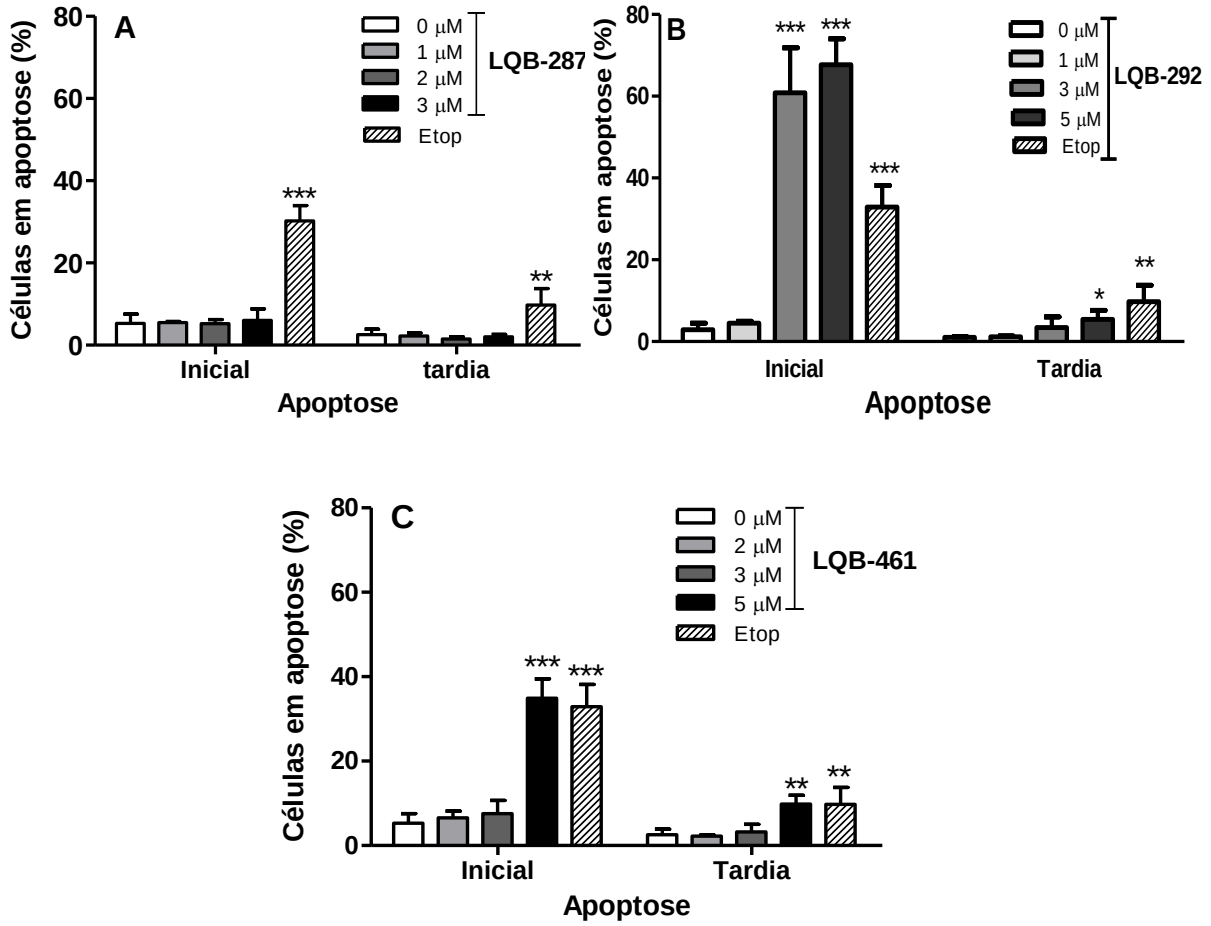


Legenda: Experimento representativo. Em A, E e I. Controle; B-D. LQB-287 a 1, 2 e 3 µM; F-H. LQB-292 a 1, 3 e 5 µM; J-M. LQB-461 a 2, 3 e 5 µM, e N. Etoposídeo. As células ($1x10^5$/ml) foram incubadas com 0,01% DMSO (controle) ou os análogos, por 72 h. A análise foi feita por citometria de fluxo, usando annexina-V-FITC e iodeto de propídio (PI). Os quadrantes representam células em: necrose ($Anexina^-PI^+$), superior esquerdo; células viáveis ($Anexina^-$ PI^-), inferior esquerdo; apoptose tardia ($Anexina^+$ PI^+), superior direito; e apoptose inicial ($Anexina^+PI^-$), inferior direito.

Já a figura 14 mostra os resultados em porcentagem de células em apoptose inicial e tardia, representando a média de quatro experimentos independentes, os quais confirmam as observações feitas no experimento representativo mostrado na figura 13. Os percentuais de morte por necrose não foram apresentados pois se mostraram irrisórios. O composto LQB-287 (figura 14.A.) não apresentou indução de morte por apoptose, inicial ou tardia. Entretanto, é importante ressaltar, como visto anteriormente, que este LQB diminuiu a proliferação celular, segundo a contagem pelo corante azul de tripan (figura 12.A.).

Em oposição ao análogo LQB-287, o LQB-292 (figura 14.B.) e o LQB-461 (figura 14.C.) mostraram aumento significativo de apoptose inicial e tardia nas maiores concentrações testadas. O LQB-461 a 5 µM apresentou 34,9 ± 4,6 % de células em apoptose inicial e 9,8 ± 2,1% em apoptose tardia, equivalendo a aumentos de 6,7 vezes e de 3,8 vezes, respectivamente, em relação ao controle. O LQB-292 a 3 µM apresentou 60,8 ± 11,0 % de células em apoptose inicial (aumento de 20,8 vezes em relação ao controle), enquanto com 5 µM apresentou 67,7 ± 6,3 % e 5,4 ± 2,2 % na apoptose inicial e tardia, respectivamente, correspondendo a aumentos de 23,7 vezes e 5,4 vezes, respectivamente, em relação ao controle. O controle positivo Etoposídeo apresentou 32,9 ± 5,3% de células em apoptose inicial e 9,8 ± 4% em apoptose tardia, semelhante aos percentuais do LQB-461.

Figura 14 – Efeitos do LQB-287, LQB-292 e LQB-461 na indução de apoptose em células Jurkat.



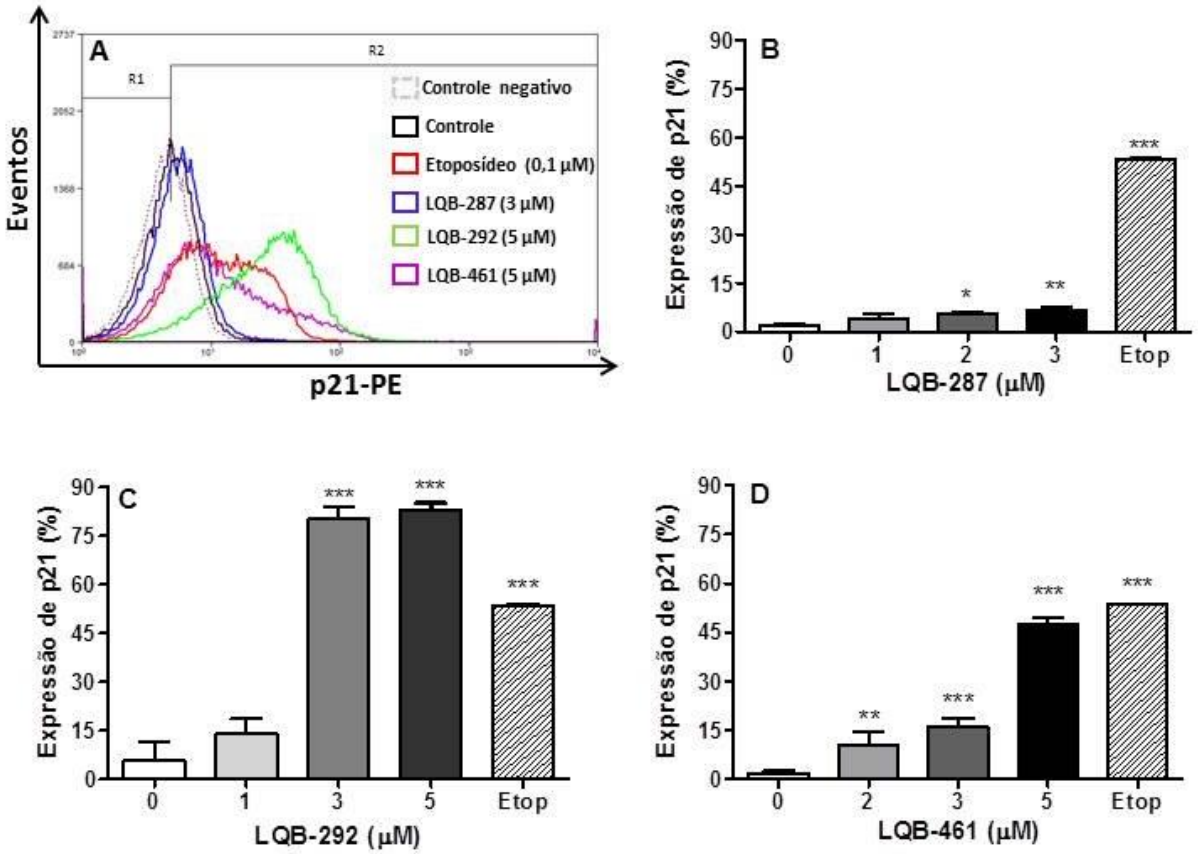
Legenda: Em A. LQB 287, B. LQB-292 e C. LQB 461. As células ($1x10^5$/ml) foram incubadas na presença ou ausência (controle com DMSO 0,01%) dos diferentes análogos por 72 h. A análise de apoptose foi feita por citometria de fluxo, usando o kit annexina-V-FITC e iodeto de propídio, como descrito na seção métodos. Etop refere-se ao composto Etoposídeo, utilizado como controle positivo, na concentração de 0,1 μM. As porcentagens de células anexina-V^+PI^- (apoptose inicial) e anexina-V^+PI^+ (apoptose tardia) estão em relação ao total de células de cada grupo. Os dados representam a média ± DP de quatro experimentos independentes. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, em relação ao controle (One-way ANOVA seguido de teste de Tukey).

5.6 Efeito dos tratamentos com LQB-287, LQB-292 E LQB-461 na expressão de p21

O p21 é uma proteína responsável por múltiplas funções biológicas, entre elas a mais elucidada na literatura é a sua capacidade de regulação do crescimento celular, podendo bloquear a ação de cinases dependentes de ciclinas (CDC) ou a atividade do antígeno núclear de proliferação celular (PCNA), influenciar na proliferação, na diferenciação celular e também no processo de indução de morte por apoptose (Navakauskienë *et al.*, 2002; Savickienea *et al.*, 2005).

Com base nos resultados obtidos anteriormente, mostrou-se interessante investigar a ação dos análogos LQB-287, LQB-292 e LQB-461 na indução de expressão de p21. Para tal, células de linhagem Jurkat foram tratadas por 72 h na ausência (controle) ou presença dos análogos ou controle positivo etoposídeo, e a expressão de p21 foi avaliada por citometria de fluxo (anticorpo anti-p21-PE). A figura 15.A. mostra os resultados de um experimento representativo da análise de expressão de p21. O LQB-287 (figura 15.B.) aumentou significativamente a expressão de p21 em 2,9 e 3,5 vezes, nas concentrações de 2 µM e 3 µM, respectivamente (de 1,9 ± 0,8% no controle, para 5,7 ± 0,6% e 6,6 ± 1,2%). O LQB-292 (figura 15.C.) mostrou aumentos apenas nas concentrações de 3 µM e 5 µM (13,6 e 14 vezes, respectivamente) alterando a expressão no controle (5,9 ± 5,6%) para 80,1 ± 3,7% e 82,8 ± 2,0%, respectivamente. Enquanto o LQB-461 (figura 15. D.) aumentou significativamente a expressão de p21 em todas as concentrações testadas (2, 3 e 5 µM), mostrando aumentos de 5,6 vezes (10,6 ± 3,7%), 8,5 vezes (16,2 ± 2,6%) e 25 vezes (47,7 ± 13,6%), respectivamente, em relação ao controle (1,9 ± 0,8%). O controle positivo estoposídeo mostrou aumento na expressão de p21 (11,7 vezes, em relação ao controle) com percentual de expressão de 53,40 ± 0,3 %.

Figura 15 – Efeitos do LQB-287, LQB-292 e LQB-461 na expressão de p21



Legenda: Em A. Histograma representativo da análise de expressão de p21. A expressão de p21 foi calculada através do percentual de células marcadas (R2), descontando os valores percentuais de autofluorescência da célula não marcada (R1). B. LQB 287, C. LQB-292 e D. LQB 461. As células (1 x 10^5/mL) foram incubadas na presença ou ausência (controle) dos análogos ativos do LQB-278, em diferentes concentrações, por 72 h. A análise de p21 foi feita por citometria de fluxo, como descrito em Materiais e métodos. Etop refere-se ao composto Etoposídeo, utilizado (0,1 µM) como controle positivo. Os dados representam a média + DP (n = 4). *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001, em relação ao controle (One-way ANOVA seguido de teste de Tukey).

6 DISCUSSÃO

Os primeiros estudos realizados pelo nosso grupo, em relação à estrutura-atividade de compostos terpênicos derivados do PBN, revelaram que dentre as várias moléculas estudadas, a molécula LQB-278, com inserção do radical geranila no derivado PBN na posição orto, foi a que mostrou maior ação antileucêmica (IC_{50} de 6,7 µM), inclusive em relação aos seus precursores geraniol (IC_{50} > 50 µM) ou PBN (IC_{50} > 50 µM) (Costa *et al.*, 2015). O presente trabalho deu continuidade a estes estudos de relação estrutura-atividade da terpenila nitrona LQB-278, avaliando a ação antitumoral *in vitro* com novas moléculas, análogas da LQB-278, derivadas da ciclização do fragmento terpenila, substituição da nitrona e outras modificações, objetivando encontrar moléculas mais ativas e menos tóxicas. Estes análogos cíclicos podem ser vistos como um protótipo oriundo da modificação estrutural de N-metilaril nitronas geraniladas, com aumento das restrições conformacionais na cadeia lateral insaturada, através de sua anelação. Este tipo de modificação conformacional na cadeia lateral das N-metilaril nitronas permite investigar também a sua contribuição farmacofórica. Análogos contendo variações onde inicialmente estava localizada a porção aldeído complementam a avaliação das porções farmacofóricas da molécula.

Inicialmente, foi analisado o efeito citotóxico dos análogos cíclicos da terpenila-nitrona LQB-278 sobre a viabilidade celular em diferentes linhagens tumorais, pela técnica do MTT. O ensaio de MTT é extensivamente aplicado para predizer a sensibilidade *in vivo* do fármaco, em células de pacientes com leucemia linfocítica aguda (ALL), em função da elevada correlação entre a sensibilidade *in vitro* e *in vivo* ao fármaco (Van Meerloo *et al*, 2011).. Foram feitas também pelo mesmo ensaio, curvas de concentrações com as moléculas mais ativas e o controle positivo (etoposídeo) na linhagem mais sensível com o objetivo de calcular o IC_{50}. Observamos a partir desses resultados (Figura 7) que a inserção do geranila ciclizado na posição orto mostra-se fundamental para o efeito citotóxico destas moléculas, visto que todas as estruturas com o geranila inserido na posição meta ou para apresentaram perda total ou parcial, significativamente, de sua toxidade em todas as linhagens tumorais estudadas. Efeitos similares foram encontrados por Costa e colaboradores (2015), onde a inserção do geranila ou farnesila na posição orto mostrou-se essencial para a ação citotóxica dos compostos sintéticos analisados no estudo.

Em relação às linhagens celulares tumorais, estudadas neste trabalho (Figura 5), a maior sensibilidade das células de leucemia linfocítica T aguda Jurkat aos derivados ativos do

LQB-278 (LQB-292, LQB-287 e LQB-461), em relação às células de leucemia mielóide crônica K562, está de acordo com dados da literatura, que caracterizam as células K562 como mais resistentes à ação de fármacos (Moosavi *et al.*, 2005; Duvoix *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2015). Este resultado tem grande relevância, desde que as leucemias representam uma grande preocupação na área clínica, devido ao seu breve período de latência e rápida progressão, principalmente em infanto-juvenis. As leucemias correspondem a um percentual aproximado de 33% de todos os tipos de câncer no mundo em crianças menores de 14 anos (Couto *et al.*, 2010; Cipolat *et al.*, 2011; Pui e Evans, 2006; Diller, 2011).

Neste trabalho, a maior sensibilidade da linhagem celular de leucemia linfocítica aguda Jurkat às moléculas ativas pode estar relacionada ao efluxo reduzido de substâncias pelo transportador tipo ABC na membrana plasmática das células Jurkat. Estas células não expressam ou expressam em níveis basais vários transportadores tipo ABC, resultando em um perfil ineficiente de resistência múltipla a medicamentos (RMM) (El Azreq *et al.*, 2012). Por outro lado, as células K562 são caracterizadas pela presença do cromossomo Filadélfia, que evidencia uma translocação recíproca entre os braços longos do cromossomo 9 e cromossomo 22 (Peng *et al.*, 2012; Krysiak *et al*., 16; Kang *et al*., 2016), resultando na formação da tirosina cinase BCR–ABL, responsável por estimular múltiplas vias de sobrevivência celular, como ERK1 ⁄ 2, ERK5, AKT, JAK⁄ STAT, fator nuclear kappa beta (NF-κB), e BCL-xL, ou inibir a apoptose (Nambu *et al.*, 2010). Trabalhos na literatura também correlacionam a super-expressão BCR-ABL com o perfil RMM de células K562 (Nambu *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2012; Kang *et al*., 2016). Além disso, a maior resistência das células K562 neste trabalho parece estar relacionada à superexpressão da glicoproteína-P, um tipo de transportador MDR1, da subfamília B1 (ABCB1), caracterizando esta linhagem celular como de perfil de alta atividade RMM (Nambu *et al.* 2010, Peng *et al.*, 2012; Yamakawa *et al.*, 2014; Housman *et al.*, 2014). Essa mesma família de transportadores (ABCB1) encontra-se inativa em células Jurkat (El Azreq *et al.*, 2012). An *et al.* (2000) compararam as células Jurkat e K562 quanto aos efeitos de vários estímulos sobre as vias de morte celular, mostrando que a linhagem K562 é resistente à apoptose, potencialmente devido ao fato da ativação de caspase-3, nesta linhagem, apresentar um atraso em relação às outras linhagens. Desta forma, pode ser que os análogos cíclicos da terpenila-nitrona LQB-278 não exerçam ação citotóxica sobre células K562 ou que os efeitos nesta linhagem não estejam sendo visualizados por estarem sendo retardados.

Por outro lado, a maior resistência das linhagens celulares de tumores sólidos, como de pulmão, mama e próstata, ao LQB-287, LQB-292 e LQB-461 (Figuras 6.E., 6.D. e 6.C.),

em relação à linhagem leucêmica Jurkat, pode estar relacionada aos tumores sólidos apresentarem efluxo ativo de medicamentos através de transportadores do tipo ABC na membrana plasmática (Bram *et al.*, 2009), o que confere maior resistência múltipla a medicamentos (Bernistein *et al.*, 2007; Pommier *et al.*, 2004). Contudo, vale ressaltar que alguns análogos cíclicos da terpenila-nitrona LQB-278 estudados neste trabalho apresentaram citotoxicidade significativa para as linhagens de câncer de mama (LQB-461 e LQB-460) e próstata (LQB-287, LQB-292, LQB-461, LQB-460 e E LQB-462) em 10 µM (figura 5), mostrando resultados promissores para futuras pesquisas nesses tumores.

Em modelos *in vivo* de tumor, tal resistência aos quimioterápicos parece ocorrer, em parte, devido ao microambiente tumoral, que favorece o crescimento do tumor, e ineficácia dos fármacos em penetrarem a massa tumoral e exercerem os seus efeitos. Muitas vezes a dose precisa ser aumentada para permitir o acesso e ação do medicamento, o que aumenta os efeitos colaterais sobre células saudáveis (Saggar *et al.*, 2013; Gavhane *et al*., 2011, Minchinton, 2006).

A síntese do composto LQB-287, que apresenta tanto a ciclização do grupo terpenila, formando o fragmento cinamoila na porção apolar, como o grupo nitrona na porção polar, aumentou significativamente o efeito antileucêmico (IC_{50} = 1,4 ± 0,4 µM) (Figura 7.A.), em comparação com o LQB-278 (IC_{50} = 6,7) (Figura 6), que também possui o grupo nitrona na porção polar, porém possui o fragmento terpênico linear (Costa *et al.*, 2015). De fato, vários derivados do cinamoila têm sido descritos na literatura por apresentarem ação antitumoral *in vitro* (Ka *et al.*, 2003; Ng e Wu, 2011, Wani *et al.*, 2014), o que pode estar contribuindo para o efeito observado.

A presença do fragmento cinamoila junto com o fragmento benzaldeído, no LQB-292 e LQB-461, também mostrou ação citotóxica sobre a linhagem leucêmica Jurkat (IC_{50} = 2,6 ± 0,6 µM e IC_{50} = 2,8 ± 0,3 µM, respectivamente*)* (Figuras 7.A. e 7.C.), com diferença significativa ($p < 0,01$), quando comparada ao LQB-287, com grupo nitrona na porção polar (IC_{50} = 1,4 ± 0,4 µM,) (Figura 7.A.). De fato, dados da literatura mostram que derivados do benzaldeído foram utilizados no passado como precursores ou pró-drogas antitumorais (Pettersen *et al*, 1991). Taetle e colaboradores (1983) demonstraram a ação de um derivado benzaldeído inibindo o crescimento *in vitro* de células leucêmicas HL-60, e este efeito encontra-se relacionado à inibição da síntese de proteínas Pettersen e colaboradores (1983; 1985; 1991b) também mostraram em seus trabalhos a relação de derivados benzaldeídos com a inibição de síntese proteica. . Estudos mostraram que a deuteração do grupo formila de um Benzaldeído aumentou a sua citotoxicidade tumoral (Pettersen *et al*., 1991) e três diferentes

derivados benzaldeído sintetizados, o composto de inclusão de betaciclodextrina benzaldeído (CDBA), 4, 6-benzilideno D-glucose (BG) e Benzilideno-corbato de sódio (SBA), mostraram efeitos antitumorais em pacientes além de não apresentarem efeitos colaterais (Pettersen *et al*., 1991b, Sakagami *et al*., 1997). Também foi sintetizado um derivado do ácido ascórbico 5,6-benzilideno 1L (Zilascorb(H2)), que foi mais eficaz na citotoxicidade tumoral e na inibição da síntese protéica do que o benzaldeído (Pettersen *et al*., 1991b; Semb *et al*,, 1997, 1998). O efeito antitumoral do 4,6benzilideno (1) A dglucose (BG) também foi aumentado com a deuteração do hidrogênio no grupo formila, conduzindo ao composto PI 013 (Dunsead *et al.*, 1995; Dunsead *et al*., 1995b), que também inibiu a carcinogênese em modelo de tumor xenográfico humano em camundongos nude (Dunsead *et al*., 1995c). Outros estudos mostram que derivados benzaldeídos apresentam efeitos antitumorais, com interrupção da progressão do ciclo celular, além de e indução de morte por apoptose em linhagem de leucemia mielóide (Pettersen *et al*., 1991, 1983b; Sakagami *et al*, 1997). Desta forma, o fragmento benzaldeído pode estar contribuindo para os efeitos antiproliferativos observados com o LQB-292 e LQB-461, e/ou este fragmento pode estar atuando após hidrólise consequente da sua metabolização celular, fazendo com que o LQB-292 e o LQB-461 atuem como pró-drogas.

Ainda em relação ao estudo da estrutura-atividade dos análogos cíclicos da terpenila-nitrona LQB-278, observou-se que os grupamentos nitrona (LQB-287) e aldeído (LQB-292/ LQB-461) também são essenciais para a atividade citotóxica, visto que ao substituí-los pelo grupamento álcool (LQB-462/ LQB-463) a toxidade é significativamente diminuída (Figura 5). Na literatura, os benzaldeídos e nitrona-derivados tem mostrado efeito antitumoral em diversos tipos de câncer (Shervington *et al.*, 2009; Rahmani-Nezhad *et al.*, 2014; Csuk *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2011; Balázová e Koza, 1988; Liu *et al.*, 2008; Ariyoshi-Kishino *et al.*, 2010). Existe a possibilidade ainda de que, após terem sido metabolizados, o LQB-287, LQB-292 e LQB 461 liberem os grupamentos nitrobenzeno, benzaldeído e cinamaldeído, os quais podem promover efeitos sinérgicos na atividade antitumoral, mostrando ação antileucêmica maior do que o LQB-278 (Costa *et al.*, 2015). Dados da literatura demonstram que o cinamaldeído é capaz de induzir efeito sinérgico na ação antitumoral (Dornish *et al.*, 1988).

É interessante destacar que, ao adicionar o grupo cetona ao cinamoila, próximo ao fragmento benzaldeído (LQB-464), o efeito citotóxico da molécula é totalmente perdido (Figura 5). Esta perda de toxicidade pode ser devido à instabilidade dos grupamentos ésteres em comparação aos grupamentos éter, ou a troca destes grupamentos permitirem uma catálise ácido básica eliminando esse fragmento molecular e assim inibindo sua ação.

Outro aspecto interessante do estudo da relação estrutura-atividade é que ao adicionar o grupo nitro ao radical cinamoila do LQB-292 (IC_{50} = 2,6 ± 0,6 µM), obtém-se o LQB-461, que também apresentou ação citotóxica (Figura 7.C.) sobre células Jurkat (IC_{50} de 2,8 ± 0,3 µM). Ao adicionar o grupo nitro ao fragmento cinamoila do LQB-287, que possui uma porção nitrobenzeno na porção polar, produziu-se o LQB-460, o qual não apresentou toxicidade às células Jurkat (Figura 5), talvez pelo fato do grupamento nitro prejudicar a sinalização do LQB-460 na célula.

Com relação à toxicidade do LQB-287, LQB-292 e LQB-461 em células não tumorais, o LQB-287 e LQB-292 apresentaram baixa toxicidade às CMNSP (figura 9) quando comparados aos seus efeitos em linhagem leucêmica Jurkat (figura 7). Na maior concentração testada de LQB-287 e LQB-292 (10 µM), as células CMNSP apresentaram viabilidade de 74 ± 10% e 86 ± 7%, respectivamente, enquanto o LQB-461 e o etoposídeo apresentaram 47 ± 13% e 52 ± 10%, respectivamente. Podemos observar, desta forma, que o LQB-292 e o LQB-287 foram as moléculas com efeito citotóxico em linhagem Jurkat (IC_{50} de 2,6 ± 0,6 µM e 1,4 ± 0,4 µM, respectivamente) com menor toxidade em CMNSP. No estudo com fibroblastos não tumorais NIH3T3, o LQB-461 não induziu citotoxicidade (viabilidade de 117 ± 11%), mesmo na maior concentração testada (10 µM) (Figura 8.C.). Curiosamente, segundo à literatura, os benzaldeídos e derivados complexados do benzaldeído também apresentam maior citotoxicidade contra linhagens celulares de tumor humano, em comparação com as células normais, o que sugere especificidade tumoral (Liu *et al.*, 2008, Ariyoshi-Kishino *et al.*, 2010). No entanto, o LQB-292, que também possui o grupo benzaldeído, apresentou citotoxicidade de 41% (Figura 8.B.).

O etoposídeo é um inibidor da DNA topoisomerase II, o que acarreta diversos danos no DNA levando à morte celular (Navakauskienë *et al.*, 2002; Karpinich *et al.*, 2006; Walsby *et al.*, 2011; Zhuang *et al.*, 2015; Mahbub *et al.*, 2015) e nesta dissertação mostrou alta toxicidade sobre células Jurkat (IC_{50} = 0,04 ± 0,02 µM) (Figura 7.D.), o que já era esperado, e mostrou toxicidade de 64% para CMNSP (Figura 9.D.) na maior concentração testada (10 µM). Apesar do etoposídeo ser um fármaco tradicionalmente utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo leucemias (Zhuang *et al.*, 2015; Walsby *et al.*, 2011; Mahbub *et al.*, 2015), o que justificou sua utilização como controle positivo neste trabalho, diversos estudos relatam resistência tumoral a este fármaco, inclusive leucemias (Walsby *et al.*, 2011; Lawson *et al.*, 2011; Asano *et al.*, 2005; Schroeder *et al.*, 2003; Styczynski *et al.*, 2007). Além disso, estudos relacionam o desenvolvimento secundário de leucemia após o tratamento do câncer com o etoposídeo (Ezoe, 2012; Kudo, *et al.*, 1998). Diante destes fatos,

apesar de apresentar uma maior atividade citotóxica em Jurkat, quando comparada ao LQB-287, LQB-292 e LQB-461, nossos análogos ainda podem representar potenciais alternativas no tratamento das leucemias.

Outro ponto a ser discutido é a ação do LQB-287, LQB-292 e LQB-461 na atividade anti-inflamatória *in vitro*, visto que moléculas desenvolvidas e estudadas neste trabalho foram sintetizadas pela inserção de uma cadeia terpênica ciclizada em um N-Fenil-t-butilnitrona (PBN), sendo este último fragmento conhecido na literatura por sua ação anti-inflamatória (Asanuma *et al.*, 2008; Doblas *et al.*, 2008; Floyd *et al.*, 2010). A atividade anti-inflamatória *in vitro* foi avaliada pela capacidade de inibição da produção de NO em linhagem macrofágica RAW264.7 estimulada com LPS. Os LQBs estudados quanto à produção *in vitro* de NO mostraram ação anti-inflamatória significativa, em relação ao controle estimulado (Figura 10.A., 10.C. e 10.E.), entretanto parte deste efeito se deve à indução de morte do macrófago, visto que no ensaio em paralelo de MTT encontramos diminuição significativa da viabilidade celular (Figura 10.B., 10.D. e 10.F.), embora, em algumas concentrações, não de forma tão expressiva quanto na diminuição da produção NO . De acordo com a literatura, os compostos cinamoila, benzaldeído e nitrobenzeno possuem ação anti-inflamatória, assim como os derivados do PBN (Kim *et al.*, 2014; Alam *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011; Saito e Yoshioka, 2002; Lee *et al.*, 2002; Abd El-Razek, 2007, Nagaoka *et al.*, 2003; Bland-ward *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2006).

Tendo o estudo da atividade citotóxica dos LQB-287, LQB-292 e LQB 461, na linhagem celular mais sensível (Jurkat), apresentado resultados mais satisfatórios que a ação anti-inflamatória (figuras 7.B., 7.A. e 7.C., respectivamente), os estudos foram direcionados para elucidar possíveis mecanismos da atividade antileucêmica. Para tal, foram realizados ensaios *in vitro* com Jurkat para analisar a ação dos respectivos análogos na proliferação celular, com o corante azul de Tripan. Todos os três mostraram, de forma significativa, diminuição da proliferação (Figuras 12.A., 12.B. e 12.C., respectivamente), corroborando os resultados obtidos pelo MTT..

Em relação à análise *in vitro* dos efeitos dos LQBs no ciclo celular, o LQB-287 (Figura 12.D.) em todas as concentrações testadas, o LQB-292 (Figura 12.E.) na menor concentração (1µM), e o LQB-461 (Figura 12.F.) nas menores concentrações testadas (1 µM e 3 µM), não mostraram ação fase-específica no ciclo celular, ou seja, não promoveram alteração significativa em nenhuma das fases do ciclo, em relação ao controle. Fármacos ciclo celular não-específicos são ativos nas células em divisão ou em um estado de repouso, e incluem agentes alquilantes, antibióticos anti-tumorais, nitrosureias, agentes não citotóxicos,

tais como hormônios e fármacos esteróides, e agentes diversos, tais como a procarbazina (Morgan, 2003). Estas drogas são ativas em todas as fases do ciclo celular. Diversos antitumorais utilizados clinicamente apresentam mecanismo de ação ciclo-celular não-específico e observou-se, mais recentemente, que, dentre estes agentes, o fator mais importante para a atividade antitumoral e potencialidade para seu uso no tratamento das diferentes neoplasias é sua capacidade de atuar como eletrófilo sobre macromoléculas nucleofílicas, particularmente o DNA (Almeida *et al.*, 2005; Morgan, 2003).

Em contraposição, o LQB-461, na concentração de 5 µM, o LQB-292 nas concentrações de 3 e 5 µM e o controle positivo etoposídeo mostraram acúmulo de células em sub-G1 (DNA fragmentado), o que indica indução de morte celular (Figuras 12.F. e 12.E.). Navakauskienë e colaboradores (2002) encontraram resultados similares de acúmulo de células em sub-G1, decorrente do tratamento de linhagem leucêmica com o etoposídeo. Di Fazio e colaboradores (2015) mostraram atividade antitumoral de um extrato onde um composto cinamila é um dos principais componentes, onde também se observou acúmulo em sub-G1, além de Costa e colaboradores (2015) que mostraram acúmulo em sub-G1 após tratamento com o terpenila nitrona LQB-278.

Tendo em vista a descrição, na literatura, da toxicidade dos derivados benzaldeído, nitrobenzeno e cinamoila em células tumorais, foram realizados ensaios com anexina-V-FITC em linhagem celular Jurkat tratada com LQB-287, LQB-292 e LQB-461, para verificar a capacidade destas moléculas induzirem morte celular por apoptose. A observação de que o LQB-292 e o LQB-461 induzem tanto apoptose inicial como tardia (Figuras 14.B. e 14.C., respectivamente), confirma a sugestão de que tais moléculas induziam morte, pelo aumento de sub-G1 (Figuras 12.E. e 12,F., respectivamente). O LQB-461 apresenta tanto o fragmento cinamoila como o benzaldeído, como ocorre com LQB-292, mas sua estrutura difere do LQB-292 pela inserção de um grupamento nitro no fragmento cinamoila. Diversos trabalhos têm mostrado diminuição da viabilidade celular e indução de morte por apoptose pelo cinamoila em diferentes linhagens tumorais (Chen *et al.* , 2005; Shin *et al.*, 2007; Ng e Wu, 2011), assim como o composto benzaldeído (Balázová e Koza, 1988; Pettersen et al, 1991; Liu *et al.*, 2008; Ariyoshi-Kishino *et al.*, 2010). O agente antitumoral etoposídeo também induziu apoptose em células Jurkat, neste trabalho (Figura 14), o que é corroborado por dados da literatura em linhagens leucêmicas (Navakauskienë *et al.*, 2002; Karpinich *et al.*, 2006; Walsby *et al.*, 2011; Zhuang *et al.*, 2015; Mahbub *et al.*, 2015). Por outro lado, o LQB-287 parece possuir atividade citostática, assim como o LQB-461 e o LQB-292 nas menores concentrações, não promovendo morte por apoptose (Figura 14.A., 14.C. e figura 14.B.,

respectivamente), apenas diminuição de proliferação celular (Figura 12.A.-, 12.C. e 12.B., respectivamente). Takeuchi e colaboradores (1978) e Ishida e colaboradores (1983) também mostraram em seus trabalhos a ação citostática de compostos derivados do benzaldeído.

Como os compostos LQB-287, LQB-292 e LQB-461 inibiram a proliferação de células Jurkat (Figuras 12.A., 12.B. e 12.C., respectivamente) e os dois últimos induziram apoptose das mesmas (Figuras 14.B. e 14.C., respectivamente), a etapa seguinte foi avaliar o efeito dessas moléculas na expressão da proteína p21 nestas células, a fim de avaliar um possível mecanismo desta ação antileucêmica.

O p21 é uma proteína que pode apresentar múltiplas funções biológicas. Entre as mais estudadas encontram-se a capacidade de induzir parada do crescimento celular, bloqueando cinases dependentes de ciclinas (CDC) ou a atividade do antígeno de proliferação núcleo celular (PCNA), influenciando a proliferação, diferenciação celular e apoptose (Navakauskienë *et al.*, 2002; Savickienea *et al.*, 2005). Observamos que LQB-287, LQB-292 e LQB-461 regularam positivamente a expressão de p21 em células Jurkat, em quase todas as concentrações testadas (Figura 15). É importante destacar que estes três compostos apresentam um grupo químico em comum nas suas estruturas químicas, a porçãoéter cinamílico (Figura 6), e curiosamente, a expressão aumentada de p21 tem sido descrito para tratamentos com derivados cinamoila (Kwon et al, 2015; Remiszewski, 2003; Kwon *et al.*, 2015).). Além disso, o LQB-292 e LQB-461 apresentam a porção benzaldeído, e o LQB-287 apresenta o grupo nitrona, e aumento da expressão de p21 também têm sido demonstrado após tratamento com derivados do benzaldeído (Cheung et al, 2010) e de nitrona (Costa et al, 2015). Por outro lado, a expressão aumentada de p21 pelo etoposídeo, demonstrada neste trabalho (Figura 15), também se encontra descrita na literatura (Mahyar-Roemer e Roemer, 2001; Ding *et al.*, 2003; Jamil *et al.*, 2015).

A expressão aumentada de p21 pelo tratamento com LQB-287, LQB-292 e o LQB-461 pode estar contribuindo tanto para a provável ação citostática observada com o LQB-287 como para as menores concentrações do LQB-461 (1 e 3 µM), assim como para a indução de apoptose, observada nas concentrações de 3 e 5 µM do LQB-292 (Figura 14.B.) e com a maior concentração (5 µM) de LQB-461 (figura 14.C.). Este fato pode ser devido à capacidade dual do p21, pro-apoptótica e anti-apoptótica, já descrita na literatura (Navakauskienë *et al.*, 2002; Savickienea *et al.*, 2005; Cazzalini *et al.*, 2010; Piccolo e Crispi1, 2012). Este duplo efeito da p21 pode estar relacionado com sua localização subcelular. Modificações pós-tradução desta proteína, tais como a fosforilação específica nos resíduos de treonina e serina, pode promover a estabilização de p21 e sua translocação do

núcleo para o citoplasma, com perda da sua função como regulador negativo do ciclo celular, no núcleo. Além disso, essa translocação do p21 pode permitir a interação do mesmo com moléculas pro-apoptóticas no citoplasma, como pró-caspase 3 e caspase 8, impedindo a atividade das mesmas e protegendo, assim, as células da morte por apoptose (Ocker e Schneider-Stock, 2007; Cazzalini *et al.*, 2010; Piccolo e Crispi1, 2012). Essa capacidade anti-apoptótica do p21 está fortemente relacionada com sua ação citostática (Abbas e Dutta, 2009;. Piccolo e Crispi1, 2012), o que corrobora nossos resultados obtidos com o LQB-287 e baixas concentrações de LQB-461 e LQB-292.

Neste contexto, não podemos deixar de destacar um aspecto importante neste trabalho, que é a atividade anti-leucêmica do LQB-287, LQB-292 e o LQB-461 ocorrer de forma independente de p53, já que as células Jurkat possuem este gene expresso de forma deficiente (Costa *et al.*, 2015), como ocorre em 50% dos cânceres na população em geral. Por outro lado, o etoposídeo é capaz de induzir aumento na expressão de p21 de forma p53-dependente e p53-independente em vários tipos de tumores (Mahyar-Roemer e Roemer, 2001; Ding *et al.*, 2003; Jamil *et al.*, 2015). Tendo em conta que alterações na regulação do ciclo celular e apoptose encontram-se diretamente ligadas à tumorigênese e que as mutações do gene *TP53* têm gerado um perfil de células tumorais com maior resistência a múltiplas drogas quimioterápicas (Costa *et al.* 2015), o desenvolvimento de novas drogas capazes de inibir a proliferação de células tumorais e/ou induzir apoptose de modo independente de p53 é de grande relevância, o que torna os derivados LQB-292, LQB-287 e LQB-461 candidatos promissores como futuras abordagens terapêuticas em leucemias com perfil p53-mutante.

CONCLUSÕES

a) Os LQBs inibem a produção *in vitro* de NO, sendo parte deste efeito relativo à indução de morte celular;
b) Os LQBs apresentam atividade citotóxica para linhagem de leucemia linfocítica Jurkat *in vitro*, com os respectivos IC_{50}: 1,4 ± 0,4 µM - LQB-287; 2,6 ± 0,06 µM - LQB-292 e 2,8 ± 0,3 µM.- LQB-461;
c) O radical terpenila ciclizado (cinamoila) possui maior atividade antitumoral do que seu precursor (protótipo) LQB-278, sendo a posição orto também essencial para sua função;
d) Os grupamentos aldeído e nitrona, benzílicos, são fundamentais para atividade anti-leucêmica dos LQBs, enquanto o grupo álcool na mesma posição anula este efeito;
e) O derivado nitrado na porção cinamoilada, o LQB-461, teve seu mecanismo de ação modificado, em relação ao LQB-292, sugerindo uma potencialização do efeito citostático;
f) O LQB-287 parece possuir ação citostática em linhagem Jurkat, aumentando p21 e inibindo a proliferação, sem alterar o ciclo celular de maneira fase-específica;
g) Os tratamentos com o LQB-292 e o LQB-461 parecem possuir atividade citostática em células Jurkat nas menorres concentrações testadas. Contudo, nas maiores concentrações ambos os LQBs promoveram acúmulo de células em sub-G1, com aumento de apoptose e expressão de p21.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. Robbins & Cotran - Patologia, 9ª edição. Cap. 7 - neoplasia, Elsevier Brasil, 2005.

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

ABD EL-RAZEK, M. H. A new ester isolated from Ferula assa-foetida L. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 71, pp. 2300-2303, 2007.

ADANY, I.; YAZLOVITSKAYA, E. M.; HAUG, J. S.; VOZIYAN, P. A.; MELNYKOVYCH, G. Differences in sensitivity to farnesol toxicity between neoplastically- and non-neoplastically-derived cells in culture. Cancer Letters, v. 79, pp. 175-179, 1994.

AFZAL, M.; SAFER, A. M.; MENON, M. Green tea polyphenols and their potential role in health and disease. Inflammopharmacology, v. 23, pp. 151-161, 2015.

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S.; SANDUR, S. K.; PANDEY, M. K.; SETHI, G. Inflammation and cancer: How hot is the link. Biochemical Pharmacology, v. 72, pp. 1605-1621, 2006.

ALAM, A.; PAL, C.; GOYAL, M.; KUNDU, M. K.; KUMAR, R.; IQBAL, M. S.; DEY, S.; BINDU, S.; SARKAR, S.; PAL, U.; MAITI, N. C.; ADHIKARI, S.; BANDYOPADHYAY, U. Synthesis and bioevaluation of human macrophage migration inhibitory factor inhibitor to develop anti-inflammatory agent. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 19, pp. 7365-7373, 2011.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONICI, C. L.; LPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. Revista Química Nova, v. 28, São Paulo, 2005. DOI: dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021

AMITAY, E. L; KEINAN-BOKER L. Breastfeeding and Childhood Leukemia Incidence A Meta-analysis and Systematic Review. JAMA Pediatrics, v. 169, n. 6, 2015. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2015.1025.

ALTROCK, P. M.; LIU, L. L.; MICHOR, F. The mathematics of cancer: integrating quantitative models. Nature Reviews Cancer, v. 15, pp. 730-745, 2015.

AN, W. G.; HWANG, S-G.; TREPEL, J. B.; BLAGOSKLONNY, M. V. Protease inhibitor-induced apoptosis: accumulation of wt p53, p21WAF1/CIP1, and induction of apoptosis are independent markers of proteasome inhibition. Leukemia, v. 14, pp. 1276-1283, 2000.

ARIYOSHI-KISHINO, K.; HASHIMOTO, K.; AMANO, O.; SAITOH, J.; KOCHI, M.; SAKAGAMI, H. Tumor-specific cytotoxicity and type of cell death induced by benzaldehyde. Anticancer Research, v. 30, pp. 5069-5076, 2010.

ASANO, T.; KLEINERMAN, E.S.; ZWELLING, L.A.; ZHOU, Z.; FUKUNAGA, Y. Adenovirus-mediated human topoisomerase IIα gene transfer increases the sensitivity of etoposide-resistant human and mouse breast cancer cells. Acta Oncologica, v. 44, pp. 240-247, 2005.

ASANUMA, T.; DOBLAS, S.; TESIRAM, Y. A.; SAUNDERS, D.; CRANFORD, R.; YASUI, H.; INANAMI, O.; SMITH, N.; FLOYD, R. A.; KOTAKE, Y.; TOWNER, R. A. Visualization of the protective ability of a free radical trapping compound against rat C6 and F98 gliomas with diffusion tensor fiber tractography. Journal of Magnetic Resonance Imaging, v. 28, pp. 574-587, 2008.

ASHKENAZI, A. Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer: lessons learned and future directions. The Journal of Clinical Investigation, v. 125, pp. 487-489, 2015.

AZREQ, M. E.; NACI, D.; AOUDJIT, F. Collagen/β1 integrin signaling up-regulates the ABCC1/MRP-1 transporter in an ERK/ MAPK-dependent manner. Molecular Biology of the Cell, v. 23, pp. 3473-3484, 2012.

BALÁZOVÁ, E.; KOZA, I. Therapy of P388 leukemia with benzaldehyde. Neoplasma, v. 35, pp.725-728, 1988.

BALDWIN, E. L.; OSHEROFF, N. Etoposide, topoisomerase II and cancer. Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents, v. 5, n. 4, pp. 363-372, 2005.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química medicinal. As bases moleculares da ação dos fármacos. Editora Art Med Ltda, 2ª edição, 2008.

BARRINGTON-TRIMIS, J. L.; COCKBURN, M.; METAYER, C.; GAUDERMAN, W. J.; WIEMELS, J.; MCKEAN-COWDIN, R. Trends in childhood leukemia incidence over two decades from 1992-2013. International Journal of Cancer, 2016. DOI: dx.doi.org/10.1002/ijc.30487

BERNISTEIN, B. E.; MEISSNER, A.; LANDER, E. S. The mammalian epigenome. Cell, v. 128, pp. 669-681, 2007.

BHALLA, Y.; GUPTA, V. K.; JAITAK, V. Anticancer activity of essential oils: a review. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 93, pp. 3643-3653, 2013.

BLAND-WARD, P. A.; PITCHER, A.; MOORE, P. K. Inhibition of nitric oxide synthase by nitro-substituted benzene derivatives. Pharmaceutical Sciences, v. 1, pp. 75-78, 1995.

BRAM, E. E.; STARK, M.; RAZ, S.; ASSARAF, Y. G. Chemotherapeutic drug-induced ABCG2 promoter demethylation as a novel mechanism of acquired multidrug resistance. Neoplasia, v. 11, pp. 1359-1370, 2009.

BOETKJAER, A; BOEDKER, M.; CUI, J. G.; ZHAO, Z.; LUKIW, W. J. Synergism in the repression of COX-2 and TNF-α induction in platelet activating factor-stressed human neural cells. Neuroscience Letters, v. 426, pp. 59-63, 2007.

BURKE, Y. D.; STARK, M. J.; ROACH, S. L.; SEN, S. E.; CROWELL, P. L. Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. Lipids, v. 2, pp. 51-156, 1997.

CÂNCER RESEARCH UK. Bone marrow transplants. Disponível em: < www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancers-in-general/treatment/transplant/bone-marrow-transplants>. Acesso em: dezembro de 2016.

CARDOZO, M. T. Atividade quimiopreventiva do geraniol e β-ionona quando administrados isoladamente ou em associação a ratos durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciência Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. DOI: 10.11606/D.9.2007.tde-26012009-150542

CARLSON, C. L. Effectiveness of the World Health Organization cancer pain relief guidelines: an integrative review. Journal of Pain Research, v. 9, pp. 515-534, 2016.

CARNESECCHI, S.; BRAS-GONCALVES, R.; BRADAIA, A.; ZEISEL, M.; GOSSE, F.; POUPON, M. F.; RAUL, F. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. Cancer Letter., v. 215, pp. 53-59, 2004

CAZZALINI, O.; SCOVASSI, A. I.; SAVIO, M.; STIVALA, L. A.; PROSPERI, E. Multiple roles of the cell cycle inhibitor $p21^{CDKN1A}$ in the DNA damage response. Mutation Research, v. 704, pp. 12-20, 2010.

CESCATO, V. A. S. Expressão dos genes relacionados à apoptose, Bcl-2, bax, e caspase-3 nos adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes e seu potencial como marcador do comportamento tumoral. Tese (Doutorado em Neurologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. DOI: 10.11606/T.5.2010.tde-10052010-151708

CIPOLAT, S.; PEREIRA, B. B.; VARGAS, F. Fisioterapia em Pacientes com Leucemia: Revisão Sistemática. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 2, pp. 229-236, 2011.

CHEN, L.; MENG, S.; WANG, H.; BALI, P.; BAI, W.; LI, B,. ATADJA, P.; BHALLA, K. N.; WU, J. Chemical ablation of androgen receptor in prostate cancer cells by the histone deacetylase inhibitor LAQ824. Molecular Cancer Therapeutics, v. 4, pp. 1311-1319, 2005.

CHEUNG, F. W.; CHE, C. T.; SAKAGAMI, H.; KOCHI, M.; LIU, W. K. Sodium 5,6-benzylidene-L-ascorbate induces oxidative stress, autophagy, and growth arrest in human colon cancer HT-29 cells. Journal of Cellular Biochemistry, v. 111, pp. 412-24, 2010.

CHO, M.; SO, I.; CHUN, J. N.; JE, J. The antitumor effects of geraniol: Modulation of cancer hallmark pathways (Review). International Journal of Oncology, v. 48, pp. 1772-1782, 2016.

CHOUDHARI, S. K.; CHAUDHARY, M.; BAGDE S.; GADBAIL, A. R.; JOSHI, V. Nitric oxide and cancer: a review. World Journal of Surgical Oncology, v. 11, pp. 118-129, 2013.

COSTA, D. S. S.; MARTINO, T.; MAGALHÃES, F. C.; JUSTO, G.; COELHO, M. G. P.; BARCELLOS, J. C. F.; MOURA, V. B.; COSTA, P. R. R.; SABINO, KÁTIA C. C.; DIAS, A. G. O-Alkyl-N-Methylarylnitrones derived from hydroxybenzaldehydes. Synthesis and antineoplastic effects on human cancer cell lines. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 23, pp. 2053-2061, 2015.

COSTA, M. T.; FABENI, R. C.; APTEKMANN, K. P.; MACHADO, R. R. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. Revista Ciência Rural, v. 33, pp. 967-974, 2003.

COTTER, T. G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. Nature Reviews Cancer, v. 9, pp. 501-507, 2009.

COUTO, A. C.; FERREIRA, J. D.; KOIFMAN, R. J.; MONTEIRO, G. T. R.; OLVEIRA, M. S. P, KOIFMAN, S. Tendência de mortalidade por leucemia infantil num período de 25 anos. Jornal de Pediatria, v. 86, pp. 405-410, 2010.

CSUK, R.; HELLER, L.; SIEWERT, B.; GUTNOV, A.; SEIDELMANN, O.; WENDISCH, V. β-Nitro substituted carboxylic acids and their cytotoxicity. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 24, pp. 4011-4013, 2014.

DE ANGELO, D. J.; STEIN, E. M.; RAVANDI, F. evolving therapies in acute myeloid leukemia: Progress at last?. American Society of Clinical Oncology, v. 35, pp. 302-312, 2016.

DEOL, A.; SENGSAYADETH, S.; AHN, K. W.; WANG, H.; ALJURF, M.; ANTIN, J. H.; BATTIWALLA, M; BORNHAUSER, M.; CAHN, J.; CAMITTA, B.; CHEN, Y.; CUTLER, C. S.; GALE, R. P.; GANGULY, S.; HAMADANI, M.; INAMOTO, Y.; JAGASIA, M.; KAMBLE, R.; KORETH, J.; LAZARUS, H.; LIESVELD, J.; LITZOW, M. R.; MARKS, D. I.; NISHIHORI, T.; OLSSON, R. F.; RESHEF, R.; ROWE, J. M.; SAAD, A. A.; SABLOFF, M.; SCHOUTEN, H. C.; SHEA, T. C.; SOIFFER, R. J.; UY, G. L.; WALLER, E. K.; WIERNIK, P. H.; WIRK, B.; WOOLFREY, A. E.; BUNJES, D.; DEVINE, S.; DE LIMA, M.; SANDMAIER, B. M.; WEISDORF, D.; KHOURY, H. J.; SABER, W. Does FLT3 Mutation impact survival after hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia? A Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR) Analysis. Cancer, v. 122, pp. 3005-3014, 2016.

DI FAZIO, P.; LINGELBACH, S.; SCHOBERT, R.; BIERSACK, B. 4,5-Diaryl imidazoles with hydroxamic acid appendages as anti-hepatoma agentes. Investigational New Drugs, v. 33, pp. 104-108, 2015.

DILLER, L. Adult primary care after childhood acute lymphoblastic leukemia. New England Journal of Medicine, v. 365, pp. 1417-1424, 2011.

DING, H.; DUAN, W.; ZHU, W.; JU, R.; SRINIVASAN, K.; OTTERSON, G. A.; VILLALONA-CALERO, M. A. p21 response to DNA damage induced by genistein and etoposide in human lung cancer cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 305, pp. 950-956, 2003.

DOBBIN, J. Leucemia aguda. Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=344 >. Acesso em: janeiro de 2017.

DOBLAS, S.; SAUNDERS, D.; KSHIRSAGAR, P.; PYE, Q.; OBLANDER, J.; GORDON, B.; KOSANKE, S.; FLOYD, R. A.; TOWNER, R. A. Phenyl-tert-butylnitrone induces

tumor regression and decreases angiogenesis in a C6 rat glioma model. Free Radical Biology & Medicine, v. 44, pp. 63-72, 2008.

DOLL, R.; PAYNE, P.; WATERHOUSE, J. Cancer incidence in five continents: A technical report. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1ª edição, 1966.

DORNISH, J.M.; PETTERSEN, E.O.; OFTEBRO, R. Synergistic cell inactivation of human NHIK 3025 cells by cinnamaldehyde in combination with cis-diamminedichloroplatinum(II). Cancer Research., v. 48, pp. 938-942, 1988.

DUNSAED, C. B.; DORNISH, J. M.; PETTERSEN, E. O. The bioavailability and dose dependency of the deuterated antitumor agent 4,6benzylidened(L)Dglucose in mice and rats. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, v. 35, pp. 464-470, 1995.

DUNSAED, C. B.; DORNISH, J. M.; OFTEBRO, R.; PETTERSEN, E. O. Effect on cell survival and protein synthesis·of benzylideneglucose (BG) and the deuterated analogue P1013 in cultured cells. Anticancer Research., v. 15, pp. 1921-1927, 1995b.

DUNSAED, C. B.; DORNISH, J. M.; AASTVEIT, T. E.; NESLAND, J. M.; PETTERSEN, E. O. Growth inhibition of human tumor xenograph in nude mice by treatment with the antitumor agent 4,6benzylidene-D(1)glucose (P1013). Anticancer Drugs, v. 6, pp. 456-464, 1995c.

DUVOIX, A.; MORCEAU, F.; SCHNEKENBURGER, M.; DELHALLE, S.; GALTEAU, M. M.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Curcumim-induced cell deth in two leucemia cell lines: K562 and Jurkat. New York Academy of Sciences, v. 1010, pp. 389-392, 2003.

EHRHARDT, H.; HOfiG, I.; WACHTER, F.; OBEXER, P.; FULDA, S.; TERZIYSKA, N.; JEREMIAS, I. NOXA as critical mediator for drug combinations in polychemotherapy. Cell Death and Disease, v. 3, e327, 2012. DOI: 10.1038/cddis.2012.53.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. Toxicol Pathology, v. 35, pp. 495-516, 2007.

EZOE, S. Secondary leukemia associated with the anti-cancer agent, etoposide, a topoisomerase ii inhibitor. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 9, pp. 2444-2453, 2012.

FAROOQUI, A. A.; HORROCKS, L. A. Glycerophospholipids in the brain: phospholipases A2 in neurological disorders. Springer Science & Business Media, 1ª edição, 2006.

FLOYD R. A.; SOONG L. M. Spin trapping in biological systems. Oxidation of the spin trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide by a hydroperoxide-hematin system. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 74, pp. 79-84, 1977.

FLOYD, R. A.; HENSLEY, K.; FORSTER, M.; KELLEHER-ANDERSSON, J. A.; WOOD,P. L. Nitrones, their value as therapeutics and probes to understand aging. Mechanisms of Aging and Development, v. 123, pp. 1021-1031, 2002.

FLOYD, R. A.; KOPKE, R. D.; CHOI, C. H.; FOSTER, S. B.; DOBLAS, S.; TOWNER, R. A. Nitrones as therapeutics. Free Radical Biology & Medicine, v. 45, pp. 1361-1374, 2008.

FLOYD, R. A.; TOWNER, R. A.; WU, D.; ABBOTT, A.; CRANFORD, R.; BRANCH, D.; GUO, W. X.; FOSTER, S. B.; JONES, I.; ALAM, R.; MOORE, D.; ALLEN, T.; HUYCKE, M. Anti-cancer activity of nitrones in the Apc (Min/+) model of colorectal cancer. Free Radical Research, v. 44, pp. 108-117, 2010.

FLOYD, R. A.; CHANDRU, H. K.; HE, T.; TOWNER, R. Anti-cancer activity of nitrones and observations on mechanism of action. Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry, v. 11, pp. 373-379, 2011.

FU,Q.; XU, L.; ZHANG.; WANG, Y.; CHANG, Y.; HUANG, X. Early lymphocyte recovery predicts superior outcomes after unmanipulated haploidentical blood and marrow transplant for acute myeloid leucemia. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 93, pp. 3643-3653, 2013.

FUSTER, J. J.; FERNÁNDEZ, P.; GONZÁLEZ-NAVARRO, H.; SILVESTRE, C.; NABAH, Y. N. A.; ANDRÉS, V. Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies. Cardiovascular Research, v. 86, pp. 254-264, 2010.

GAVHANE, Y. N.; SHETE, A. S.; BHAGAT, A. K.; SHINDE, V. R.; BHONG, K. K.; KHAIRNAR, G. A.; YADAV, A. V. Solid tumors: facts, challenges and solutions. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, v.2, pp. 1-12, 2011.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S.R. Analyses of nitrate, nitrite and [^{15}N]nitrate in biological fluids. Analytical Biochemistry, v. 126, pp. 131-138, 1982.

GRIMM, E. A.; SIKORA, A. G; EKMEKCIOGLU S. Molecular pathways: inflammation-associated nitric-oxide production as a cancer-supporting redox mechanism and a potential therapeutic target. Clinical Cancer Research, v. 19, pp. 5557-5563, 2013.

GOMPEL, A.; LEVY, D.; CHAOUAT, M.; FORGEZ, P.; ROSTENE, W. Apoptosis and aging: breast cells and apoptosis. Maturitas, v. 38, pp. 39-44, 2001.

HAUG, J. S.; GOLDNER, C. M.; YAZLOVITSKAYA, E.;M.; VOZIYAN, P. A.; MELNYKOVYCH, G. Directed cell killing (apoptosis) in human lymphoblastoid cells incubated in the presence of farnesol: effect of phosphatidylcholine. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 1223, pp. 133-140, 1994.

HAYAKAWA, Y.; KAWADA, M.; NISHIKAWA, H.; OCHIYA, T.; SAYA, H.; SEIMIYA, H.; YAO, R.; HAYASHI, M.; KAI, C.; MATSUDA, A.; NAOE, T.; OHTSU, A.; OKAZAKI, T.; SAJI, H.; SATA, M.; SUGIMURA, H.; SUGIYAMA, Y.; TOI, M.; IRIMURA, T. Report on the use of non-clinical studies in the regulatory evaluation of oncology drugs. Cancer Science, v. 107, pp. 189-202, 2016.

HJELMELAND, A.; ZHANG, J. Metabolic, autophagic, and mitophagic activities in cancer initiation and progression. Biomedical Journal, v. 39, pp. 98-106, 2016.

HONGMEI, Z. Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review. Biochemistry, Genetics and Molecular Biology, "Apoptosis and Medicine", 2012. DOI: 10.5772/50129

HOUSMAN, G.; BYLER, S.; HEERBOTH, S.; LAPINSKA, K.; LONGACRE, M.; SNYDER, N.; SARKAR, S. Drug resistance in cancer: an overview. Cancer, v. 6, pp. 1769-1792, 2014.

HU, H.; ZHU, W.; QIN, J.; CHEN, M.; GONG, L.; LI, L.; LIU, X.; TAO, Y.; YIN, H.; ZHOU, H.; ZHOU, L.; YE, D.; YE, Q.; GAO, D. Acetylation of PGK1 promotes liver cancer cell proliferation and tumorigenesis. Hepatology, 2016. DOI: 10.1002/hep.28887

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Falando Sobre Câncer e Seus Fatores de Risco. Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Controle de Tabagismo - CONTAPP, Rio de Janeiro, RJ, 1996.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Ministério da Saúde. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf >. Acesso em: julho de 2016a.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Tipos de câncer: Leucemia. Ministério da Saúde. Disponível em: < www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/definicao>. Acesso em: julho de 2016b.

INOUE, Y.; ASANUMA, T.; SMITH, N.; SAUNDERS, D.; OBLANDER, J.; KOTAKE, Y.; FLOYD, R. A.; TOWNER, R. A. Modulation of Fas-FasL related apoptosis by PBN in the early phases of choline deficient diet-mediated hepatocarcinogenesis in rats. Free Radical Research, v. 41, pp. 972 - 980, 2007.

ISHIDA, A.; MIWA, N.; MIZUNO, SATOSHI. Differential Enhancement of cytotoxicity by combination of the carcinostatic agent benzaldehyde and hyperthermia in Simian Virus 40-transformed and normal cell lines. Cancer Research, v. 43, pp. 4216-4220, 1983.

JABBOUR, E.; O'BRIEN, S.; RAVANDI, F.; KANTARJIAN, H. Monoclonal antibodies in acute lymphoblastic leucemia. Blood, v. 125, pp. 4010-4016, 2015.

JAMIL, S.; LAM, I.; MAJD, M.; TSAI, S. DURONIO, V. Etoposide induces cell death via mitochondrial-dependent actions of p53. Cancer Cell International, v. 15, pp. 79-90, 2015.

JIAN, S.; YAN, W. T cell immunometabolism against cancer. Cancer Letters, v. 382, pp. 255-258, 2016.

JOO, J. H.; UEDA, E.; BORTNER, C. D.; YANG, X. P.; LIAO, G.; JETTEN, A. M. Farnesol activates the intrinsic pathway of apoptosis and the ATF4-ATF3-CHOP cascade of ER stress in human T lymphoblastic leukemia Molt4 cells. Biochem Pharmacol, v. 97, pp. 256-268, 2015.

KA, H.; PARK, H. J.; JUNG, H. J.; CHOI, J. W.; CHO, K. S.; HA, J.; LEE, K. T. Cinnamaldehyde induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. Cancer Letters, v. 196, pp. 143-152, 2003.

KANG, Z.; LIU, Y. F.; XU, L.; LONG, Z.; HUANG, D.; YANG, Y.; LIU, B.; FENG, J.; PAN, Y.; YAN, J.; LIU, Q. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. Chinese Journal of Cancer, v. 35, pp. 48-63, 2016.

KARPINICH, N. O.; TAFANI, M.; SCHNEIDER, T.; RUSSO, M. A.; FARBER, J. L. The course of etoposide-induced apoptosis in Jurkat cells lacking p53 and Bax. Journal of Cellular Physiology, v. 208, pp. 55-63, 2006.

KATO, M.; ISHIMARU, S.; SEKI, M.; YOSHIDA, K.; SHIRAISHI, Y.; CHIBA, K.; KAKIUCHI, N.; SATO, Y.; UENO, H.; TANAKA, H.; INUKAI, T.; TOMIZAWA, D.; HASEGAWA, D.; OSUMI, T.; ARAKAWA, Y.; AOKI, T.; OKUYA, M.; KAIZU, K.; KATO, K.; TANEYAMA, Y.; GOTO, H.; TAKI, T.; TAKAGI, M.; SANADA, M.; KOH, K.; TAKITA, J.; MIYANO, S.; OGAWA, S.; OHARA, A.; TSUCHIDA, M.; MANABE, A. Long-term outcome of 6-month maintenance chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children. Leukemia, setembro, 2016. DOI:10.1038/leu.2016.274.

KEPP, O.; GALLUZZI, L.; LIPINSKI, M.; YUAN, J.; KROEMER, G. Cell death assays for drug discovery. Nature Reviews, v. 10, pp. 221-223, 2011.

KIM, K. S.; CUI, X.; LEE, D. S.; KO, W.; SOHN, J. H.; YIM, J. H.; AN, R. B.; KIM, Y. C.; OH, H. Inhibitory effects of benzaldehyde derivatives from the marine fungus *Eurotium* sp. SF-5989 on inflammatory mediators via the induction of heme oxygenase-1 in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. International Journal of Molecular Sciences, v. 15, pp. 23749-23765, 2014.

KWON, H.; LEE, J. J.; LEE, J. H.; CHO, W. K.; GU, M. J.; LEE, K. J.; MA, J. Y. Cinnamon and its components suppress vascular smooth muscle cell proliferation by up-regulating cyclin-dependent kinase inhibitors. The American Journal of Chinese Medicine, v. 43, pp. 621-636, 2015.

KOIRI, R. K.; TRIGUN, S. K. Dimethyl sulfoxide activates tumor necrosis factorα-p53 mediated apoptosis and down regulates d-fructose-6-phosphate-2-kinase and lactate dehydrogenase-5 in Dalton's lymphoma *in vivo*. Leukemia Research, v. 35, pp. 950-956, 2011.

KRYSIAK, K.; CHRISTOPHER, M. J.; SKIDMORE, Z. L.; DEMETER, R. T.; MAGRINI, V.; KUNISAKI, J.; O'LAUGHLIN, M.; DUNCAVAGE, E. J.; MILLER, C. A.; OZENBERGER, B. A.; GRIFFITH, M.; WARTMAN, L.; GRIFFITH, O. L. A genomic analysis of Philadelphia chromosome-negative AML arising in patients with CML. Blood Cancer Journal, v. 6, e413, 2016. DOI:10.1038/bcj.2016.18

KUDO, K.; YOSHIDA, H.; KIYOI, H.; NUMATA, S.; HORIBE, K.; NAOE, T. Etoposide-related acute promyelocytic leucemia. Leukemia, v. 12, pp. 1171-1175, 1998.

KUDUK, S. D.; ZHENG, F. F.; SEPP-LORENZINO, L.; ROSEN, N.; DANISHEFSKY, S. Synthesis and evaluation of geldanamycin-estradiol hybrids. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 9, pp. 1233-1238, 1999.

KUTTAN, G.; PRATHEESHKUMAR, P.; MANU, K. A.; KUTTAN, R. Inhibition of tumor progression by naturally occurring terpenoids. Pharmaceutical Biology, v. 49, pp. 995-1007, 2011.

LAWSON, M. H.; CUMMINGS, N. M..; RASSL, D. M.; RUSSELL, R.; BRENTON, J. D.; RINTOUL, R. C.; MURPHY, G. Two novel determinants of etoposide resistance in small cell lung cancer. Cancer research, v. 71, pp. 4877-4887, 2011.

LEE, H. S.; KIM, B. S.; KIM, M. K. Suppression effect of *Cinnamomum cassia* bark-derived component on nitric oxide synthase. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, pp. 7700-7703, 2002.

LI, Z. Y.; LI, Q. Z.; MA, G. X.; CHEN, L.; ZHANG, C.; CHEN, B. D.; YANG, J. S.; LI, W. P. Cassane-type diterpenes from *Caesalpinia minax* induce apoptosis in pituitary adenoma: structure-activity relationship, ER stress and Wnt/β-catenin pathways. Journal of Asian Natural Products Research, v. 2, pp. 1-13, 2016.

LIN, Z.; LI, H.; LUO, H.; ZHANG, Y.; LUO, W. Benzylamine and methylamine, substrates of semicarbazide-sensitive amine oxidase, attenuate inflammatory response induced by lipopolysaccharide. International Immunopharmacology, v. 11, pp. 1079-1089, 2011.

LIU, Y.; SAKAGAMI, H.; HASHIMOTO, K.; KIKUCHI, H.; AMANO, O.; ISHIHARA, M.; KANDA, Y.; KUNII, S.; KOCHI, M.; ZHANG, W.; YU, G. Tumor-specific cytotoxicity and type of cell death induced by beta-cyclodextrin benzaldehyde inclusion compound. Anticancer Research, v. 28, n. 1ª, pp. 229-236, 2008.

LONKAR, P.; DEDON, P. C. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates. International Journal of Cancer, v. 128, pp. 1999-2009, 2011.

MAHBUB, A. A.; LE MAITRE, C. L.; HAYWOOD-SMALL, S. L.; CROSS, N. A.; JORDAN-MAHY, N. Polyphenols act synergistically with doxorubicin and etoposide in leukaemia cell lines. Cell Death Discovery, v. 1, e15043, 2015. DOI:10.1038/cddiscovery.2015.43

MAHYAR-ROEMER, M.; ROEMER, KLAUS. p21 Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents. Oncogene, v. 20, pp. 3387-3398, 2001.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigma. Nature Reviews Cancer, v. 9, pp. 153-166, 2009.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature, v. 454, pp. 428-435, 2008.

MELNYKOVYCH, G.; HAUG, J. S.; GOLDNER, C. M. Growth inhibition of leukemia cell line CEM-C1 by farnesol: effects of phosphatidylcholine and diacylglycerol. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 186, pp. 543-548, 1992.

MÉNDEZ-ARMENTA, M.; NAVA-RUÍZ, C.; JUÁREZ-REBOLLAR, D.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, ERIKA; GÓMEZ, P. Y. Oxidative Stress Associated with Neuronal Apoptosis in Experimental Models of Epilepsy. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 293689, 2014. DOI: 10.1155/2014/293689.

MINCHINTON, A. I.; TANNOCK, I. F. Drug penetration in solid tumours. Nature Reviews Cancer, v. 6, pp. 583-592, 2006.

MIYAJIMA T, KOTAKE Y. Optimal time and dosage of phenyl *N*-tert-butyl nitrone (PBN) for the inhibition of nitric oxide synthase induction in mice. Free Radical Biology & Medicine, v. 22, pp. 463-470, 1997.

MORGAN, GWYNETH. Chemotherapy and the cell cycle. Cancer Nursing Practice, v. 2, pp. 27-30, 2003.

MOOSAVI, M. A.; YAZDANPARAST, R.; SANATI, M. H. The cytotoxic and anti-proliferative effects of 3-Hydrogenkwadaphnin in K562 and Jurkat cells is reduced by guanosine. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, v. 38, pp. 391-398, 2005.

MOURA, N. S.; VASCONCELOS, A. C. M.; BERNABÉ, B. M.; TEIXEIRA, L. J. Q.; SARAIVA, S. H. Ensaios toxicológicos: um estudo sobre a utilização de testes *in vivo* e *in vitro*. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 8, pp. 1945, 2012.

MUMM, J. B.; OFT, M. Cytokine-based transformation of immune surveillance into tumor-promoting inflammation. Oncogene, v. 27, pp. 5913-5919, 2008.

MUZ, B.; DE LA PUENTE, P.; AZAB, F.; AZAB, A. K. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. Hypoxia, v. 3, pp. 83-92, 2015.

NAGAOKA, T.; BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) analogues: potent nitric oxide inhibitors from the Netherlands própolis. Biological and Pharmaceutical Bulletin, v. 26, pp. 487-491, 2003.

NAGARSENKAR, A.; GUNTUKU, L.; GUGGILAPU, S. D.; DANTHI BAI, K.; SRINIVASULU, G.; NAIDU, V. G. M.; BABU, B. N. Synthesis and apoptosis inducing studies of triazole linked 3-benzylidene isatin derivatives. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 124, pp. 782-793, 2016.

NAITO, Y.; YOSHIOKA, Y.; YAMAMOTO, Y.; OCHIYA, T. How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. Cellular and Molecular Life Sciences, 1-17, 2016. DOI: 10.1007/s00018-016-2346-3

NAMBU, T.; ARAKI, N.; NAKAGAWA, A.; KUNIYASU, A.; KAWAGUCHI, T.; HAMADA, A.; SAITO, H. Contribution of BCR-ABL-independent activation of ERK1⁄2 to acquired imatinib resistance in K562 chronic myeloid leukemia cells. Cancer Science, v. 101, pp. 137-142, 2010.

NAUMANN, E. C.; GÖRING, S.; OGOREK, I.; WEGGEN, S.; SCHMIDT, B. Membrane anchoring c-secretase modulators with terpene-derived moieties. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 23, pp. 3852-3856, 2013.

NAVAKAUSKIENË, R.; TREIGYTË, G.; PIVORIÛNAS, A.; SAVICKIENË, J. Cell cycle inhibitors in retinoic acid and etoposide-mediated biological responses. Biologija, n. 2, pp. 64-67, 2002.

NG, L. T.; WU, S. J. Antiproliferative activity of *Cinnamomum cassia* constituents and effects of Pifithrin-alpha on their apoptotic signaling pathways in Hep G2 cells. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, e492148, 2011. DOI: 10.1093/ecam/nep220.

OCKER, M.; SCHNEIDER-STOCK, R. Histone deacetylase inhibitors: Signalling towards p21cip1/waf1. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 39, pp. 1367-1374, 2007.

OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F.-T.; ZHOU, T.-T.; LIU, B.; BAO, J.-K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. Cell Proliferation, v. 45, pp. 487-498, 2012.

PALMISANO, A.; ZÁMBORSZKY, J.; OGUZ, C.; CSIKÁSZ-NAGY, A. Molecular network dynamics of cell cycle control: periodicity of start and finish. Methods in Molecular Biology, v. 1524, pp. 331-349, 2017.

PATEL, P.; VORA, H.; AGGARWAL, B. B.; GANDHI, V.; MEHTA, K.; PATHAK, S. Prevention and treatment of cancer: hypes and hopes 6th International Translational Cancer Research Conference. Anticancer Research, v.36, pp. 4971-4976, 2016.

PAULICK, M. G.; BERTOZZI, C. R. The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins. Biochemistry, v. 47, pp. 6991-7000, 2008.

PENG, X.; TIWARI, A. K.; WU, H.; CHEN, Z. Overexpresssion of p-glycoprotein induces acquired resistence to imatinib in chronic myelogenous leucemia cells. Chinese Journal of Cancer; v. 31, pp. 110-118, 2012.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. Revista Quimica Nova, v. 30, pp. 171-177, 2007.

PETTERSEN, E.O.; RONNING, O.W.; NOME, O.; OFTEBRO, R. Effects of benzaldehyde on protein metabolism-of human cells cultivated *in vitro*. European Journal of Cancer and Clinical Oncology, v. 19, pp. 935-940, 1983.

PETTERSEN, E.O.; NOME, O.; RONNING, O.W.; OFTEBRO, R. Effects of benzaldehyde on survival and cell-cycle kinetics of human cells cultivated in vitro. European Journal of Cancer and Clinical Oncology, v. 19, pp. 507-514, 1983b.

PETTERSEN, E.O.; DORNISH, J.M.; RONNING, O.W. 4,6-Benzylidene-D-glucose, a benzaldehyde derivative that inhibits protein synthesis but not mitosis of NHIK 3025 cells. Cancer Research, v. 45, pp. 2085-2091, 1985.

PETTERSEN, E. O.; LARSEN, R. O.; BORRETZEN, B.; DORNISH, J. M.; OFTEBRO, R. Increased effect of benzaldehyde by exchanging the hydrogen in the formyl group with deuterium. Anticancer Research, v. 11, pp. 369-373, 1991.

PETTERSEN, E.O.; LARSEN, R.O.; BOERRETZEN, B.; DORNISH, J.M.; OFTEBRO, R. Effect on protein synthesis and cell survival of the benzaldehyde derivatives sodium benzylidene ascorbate (SBA) and the deuterated compound Zilascorb(H2). Anticancer Research, v. 11, pp. 1077-1081, 1991b

PICCOLO, M. T.; CRISPI, S. The dual role played by p21 may influence the apoptotic or anti-apoptotic fate in cancer. Journal of Cancer Research Updates, v. 1, pp. 189-202, 2012.

POMMIER, Y.; SORDET, O.; ANTONY, S.; HAYWARD, R. L.; KOHN, K. W. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. Oncogene, v. 23, pp. 2934-2949, 2004.

PORTT, L, G. N.; CLAPP, C.; GREENWOOD, M.; GREENWOOD, M. T. Anti-apoptosis and cell survival: a review. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1813, pp. 238-259, 2011.

PUI, C. H.; EVANS, W. E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. New England Journal of Medicine, v. 354, pp. 166-178, 2006.

RAHMANI-NEZHAD, S.; SAFAVI, M.; PORDELI, M.; ARDESTANI, S. K.; KHOSRAVANI, L.; POURSHOJAEI, Y.; MAHDAVI, M.; EMAMI, S; FOROUMADI, A.; SHAFIEE, A. Synthesis, *in vitro* cytotoxicity and apoptosis inducing study of 2-aryl-3-nitro-2H-chromene derivatives as potent anti-breast cancer agentes. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 86, pp. 562-569, 2014.

RAMADAN, M.; GAMAL-ELDEEN, A. M.; ABDEL-AZIZ, M.; ABUORAHMA, G. E.; ABDEL-NABI, H.; NAGIB, H. C-(2-Chloroquinoline-3-yl)- N-phenyl nitrone: new syntheticantioxidant inhibits proliferation and induces apoptosis of breast carcinoma MCF-7 cells. Archives der Pharmazie. v. 339, pp. 242-249, 2006.

RANDHAWA, J. K .; FERRAJOLI, A. A review of supportive care and recommended preventive approaches for patients with chronic lymphocytic leukemia. Expert Review of Hematology, v. 9, pp. 235-244, 2016.

REIS, R. S.; SANTOS, M. O.; CAMARGO, B.; OLIVEIRA, J. F. P.; THULER, L. C. S.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. Early childhood leukemia incidence trends in Brazil. Pediatric Hematology and Oncology, v. 33, pp. 83-93, 2015.

REMISZEWSKI, S. W. The discovery of NVP-LAQ824: from concept to clinic. Current Medicinal Chemistry, v. 10, pp. 2393-2402, 2003.

RIBEIRO, M. G.; FILHO, A. S. C.; LISTONI, F. J. P. *In vitro* effect of dimethyl sulfoxide - DMSO in antimicrobial susceptibility test of Rhodococcus equi isolated from pulmonary infections in foals. Ciência Rural, Santa Maria, v.31, pp.889-892, 2001.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell viability assays. Editores: Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, *et al*. . Assay Guidance Manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013. Retirado de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/ Acesso em: janeiro de 2017.

RODRIGUES, T.; SIEGLITZ, F.; BERNARDES, G. Natural product modulators of transient receptor potential (TRP) channels as potential anti-cancer agents. Chemical Society Reviews, v. 45, pp. 6130-6137, 2016.

ROSHANDEL, G.; BOREIRI, M.; SADJAD, A.; MALEKZADEH, R. A diversity of cancer incidence and mortality in west asian populations. Annals of Global Health, v. 80, pp. 346-357, 2014.

SAGGAR, J. K.; YU, M.; TAN, Q.; TANNOCK,I. F. The tumor microenvironment and strategies to improve drug distribution. Frontiers in Oncology, v.3, pp. 1-7, 2013.

SAITO, K.; YOSHIOKA, H. ESR characterization of a novel spin-trapping agent, ^{15}N-labeled N-tert-butyl-alpha-phenylnitrone, as a nitric oxide donor. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, v. 66, pp. 2189-2193, 2002.

SAKAGAMI, H.; SATOH, K.; KOCHI, M. Comparative study of the antitumor action between sodium 5,6benzylidene Lascorbate and sodium ascorbate. Anticancer Research, v. 17, pp. 4451-4452, 1997.

SAVICKIENEA, J.; TREIGYTEA, G.; MAGNUSSONB, K. E.; NAVAKAUSKIENEA, R. p21 (Waf1/Cip1) and FasL gene activation via Sp1 and NFBis required for leukemia cell survival but not for cell deathinduced by diverse stimuli. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 37, pp. 784-796, 2005.

SCHROEDER, U.; BERNT, K. M.; LANGE, B.; WENKEL, J.; JIKAI, J.; SHABAT, D.; AMIR, R.; HUEBENER, N.; NIETHAMMER, A. G.; HAGEMEIER, C.; WIEBUSCH, L.; GAEDICKE, G.; WRASIDLO, W.; REISFELD, R. A.; LODE, H. N. Hydrolytically activated etoposide prodrugs inhibit MDR-1 function and eradicate established MDR-1 multidrug-resistant T-cell leucemia. Blood, v. 102, pp. 246-253, 2003.

SEGI, M. Cancer mortality for selected sites in 24 countries (1950-57). Department of Public Health, Tohoku University of Medicine, Japan. 1960.

SELDEN, N. S.; TODHUNTER, M. E.; JEE, N. Y.; LIU, J. S.; BROADERS, K. E.; GARTNER, Z. J. Chemically programmed cell adhesion with membrane-anchored oligonucleotides. Journal of the American Chemical Society, v. 134, pp. 765−768, 2012.

SEMB, K. A.; FODSTAD, O.; KLEM, B.; BIBOW, K.; OSMUNDSEN, K.; AAMDAL, S. Zilascorb H2 a new reversible protein synthesis inhibitor: clinical study of an oral preparation. Anticancer Drugs, v. 8, pp. 296-303, 1997.

SEMB, K. A.; AAMDAI, S; METTE, E.; INGVAR, C.; GULLAKSEN, N.; OSMUNDSEN, K. Zilascorb(H2), a low toxicity protein synthesis inhibitor that exhibits signs of anticancer activity in malignam melanoma. Anticancer Drugs, v. 9, pp. 797-802, 1998.

SHACTER, E.; WEITZMAN, S. A. Chronic inflammation and cancer. Oncology (Williston Park), v. 16, pp. 217-226, 2002.

SHERVINGTON, L. A.; SMITH, N.; NORMAN, E.; WARD, T.; PHILLIPS, R.; SHERVINGTON, A. To determine the cytotoxicity of chlorambucil and one of its nitro-derivatives, conjugated to prasterone and pregnenolone, towards eight human cancer cell-lines. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 44, pp. 2944-2951, 2009.

SHIN, D. S.; KIM, J.; HAN, D. C.; SON, K. H.; LEE, C. W.; KIM, H.; HONG, S. H.; KWON, B. M. Synthesis and biological evaluation of cinnamyl compounds as potent antitumor agentes. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 17, pp. 5423-5427, 2007.

STURION, D. J.; PINHEIRO, E. R.; PARDO, E.; TANAKA, N. M. Efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos do dimetil sulfóxido em aplicações tópicas em cães. UNOPAR Científia, Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 1, pp. 41-47, 1999.

STYCZYNSKI, J.; TOPORSKI, J.; WYSOCKI, M.; DEBSKI, R.; CHYBICKA, A.; BORUCZKOWSKI, D.; J WACHOWIAK, A.; WOJCIK, B.; KOWALCZYK, J.; GIL, L.; BALWIERZ, W.; MATYSIAK, M.; KRAWCZUK-RYBAK, M.; BALCERSKA, A.; SONTA-JAKIMCZYK, D. Fludarabine, treosulfan and etoposide sensitivity and the outcome of hematopoietic stem cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. Anticancer research, v. 27, pp. 1547-1552, 2007.

TAFANI, M.; SANSONE, L.; LIMANA, F.; ARCANGELI, T.; DE SANTIS, E.; 4 POLESE, M.; FINI, M.; RUSSO, M. A. The interplay of reactive oxygen species, hypoxia, inflammation, and sirtuins in cancer initiation and progression. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2016, pp. 1-18, 2016. DOI: dx.doi.org/10.1155/2016/3907147.

TAKEUCHI,, S.; KOCHI,, M.; SAKAGUCHI, K.; NAKAGAWA, K.; MIZUTANI, T. Benzaldehyde as a carcinostatic principle in figs. Agricultural and Biological Chemistry, v. 42, pp. 1449-1451, 1978.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Methods in Molecular Biology, v. 731, pp. 237-245, 2011.

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

VELEZ, A. M. A.; HOWARD, M. S. Tumor-suppressor genes, cell cycle regulatory checkpoints, and the skin. North American Journal of Medical Sciences, v. 7, pp. 176-188, 2015.

VIEGAS JUNIOR, C.; NICASTRO, P. C.; FOSSALUZZA, P. C.; GOMES, C. P.; SANTOS, L. A.; BOLZANI, V. S.; PIVATTO, M.; DA SILVA, D. J. C.; MELO, G. M. A.; DA SILVA, Y. K. C.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; DA COSTA, R. S.; AREAS, T. F. M.; CASTRO, N. G. Structural modifications in (-)-Cassine and LASSBio-767: strategies for the discovery and optimization of new drug candidates. Revista Virtual de Química, v. 1, pp. 117-127, 2009.

VIEGAS JUNIOR, C.; DANUELLO, A.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E.; FRAGA, C. A. M. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. Current Medicinal Chemistry, v. 14, pp. 1829-1852, 2007.

VONDRÁČEK, J.; SOUČEK, K.; SHEARD, M. A.; CHRAMOSTOVÁ, K.; ANDRYSÍK, Z.; HOFMANOVÁ, J.; KOZUBÍK, A. Dimethyl sulfoxide potentiates death receptor-mediated apoptosis in the human myeloid leukemia U937 cell line through enhancement of mitochondrial membrane depolarization. Leukemia Research, v. 30, pp. 81-89, 2006.

WALSBY, E.J.; COLES, S. J.; KNAPPER, S.; BURNETT, A. K. The topoisomerase II inhibitor voreloxin causes cell cycle arrest and apoptosis in myeloid leukemia cells and acts in synergy with cytarabine. Haematologica, v. 96, pp. 393-399, 2011.

WANI, K.D.; KADU, B.S; MANSARA, P.; GUPTA, P.; DEORE, A.V.; CHIKATE, R.C.; PODDAR, P.; DHOLE, S.D.; KAUL-GHANEKAR, R. Synthesis, characterization and *in vitro* study of biocompatible cinnamaldehyde functionalized magnetite nanoparticles (CPGF Nps) for hyperthermia and drug delivery applications in breast cancer. PLoS One, v.9, pp. 1-13, e107315, 2014. DOI:10.1371/journal.pone.0107315

WERMUTH, C. G. Selective optimization of side activities: another way for drug discovery. Journal of Medicinal Chemistry, v. 47, pp. 1303-1314, 2004.

WERMUTH, C. G. The practice of medicinal chemistry. Elsevier Science, terceira edição, cap. 18, 2008.

WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The cell cycle and câncer. Journal of Pathology, v. 226, pp. 352-364, 2012.

WU, B.; CHEN, C.; LIOU, S.; YEH, J.; CHUNG, H.; CHEN, I. Inhibition of Proinflammatory Tumor Necrosis Factor--Induced Inducible Nitric-Oxide Synthase by Xanthine-Based 7-[2-[4-(2-Chlorobenzene)piperazinyl]ethyl]-1,3-dimethylxanthine (KMUP-1) and 7-[2-[4-(4-Nitrobenzene)piperazinyl]ethyl]-1,3-dimethylxanthine (KMUP-3) in Rat Trachea: The Involvement of Soluble Guanylate Cyclase and Protein Kinase G. Molecular Pharmacology, v. 70, pp. 977-985, 2006.

YAMAKAWA, Y.; HAMADA, A.; UCHIDA, T.; SATO, D.; YUKI, M.; HAYASHI, M.; KAWAGUCHI, T.; SAITO, H. Distinct interaction of Nilotinib and Imatinib with P-glycoprotein in intracellular accumulation and cytotoxicity in CML cell line K562 cells. Biological and Pharmaceutical Bulletin, v. 37, pp. 1330-1335, 2014.

YU, S. G.; HILDEBRANDT, L.A.; ELSON, C. E. Geraniol, an inhibitor of mevalonate biosynthesis, suppresses the growth of hepatomas and melanomas transplanted to rats and mice. Journal of Nutrition, v. 125, pp. 2763-2767, 1995.

ZASK, A.; KAPLAN, J.; MUSTO, S.; LOGANZO, F. Hybrids of the hemiasterlin analogue Taltobulin and the Dolastatins are potent antimicrotubule agents. Journal of the American Chemical Society, v. 127, pp. 17667-17671, 2005.

ZHOU, Y.; FENG, X.; KOH, D. W. Synergistic cytotoxicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and absence of poly(ADP-ribose) glycohydrolase involves chromatin decondensation. International Journal of Oncology, v. 39, pp. 121-127, 2011.

ZHUANG, Y.; LU, Y.; LI, D.; SUN, N.; JU, X. Upregulation of AIOLOS induces apoptosis and enhances etoposide chemosensitivity in Jurkat leukemia cells. Oncology Reports, v. 33, pp. 1319-1325, 2015.