Universidade Do Estado Do Rio De Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes

Thiago Martino Martins

Avaliação da ação antitumoral *in vitro* da pterocarpanoquinona LQB 118 e estudo de alguns mecanismos de ação

Rio de Janeiro

2013

Thiago Martino Martins

Avaliação da ação antitumoral *in vitro* da pterocarpanoquinona LQB 118 e estudo de alguns mecanismos de ação

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. Katia Costa de Carvalho Sabino

Rio de Janeiro
2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M379 Martins, Thiago Martino.
Avaliação da ação antitumoral *in vitro* da pterocarpanoquinona LQB 118 e estudo de alguns mecanismos de ação / Thiago Martino Martins. – 2013.
101 f.

Orientadora: Katia Costa de Carvalho Sabino.
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Apoptose – Teses. 2. Adenocarcinoma – Teses. 3. Próstata – Câncer – Teses. 4. Mama – Câncer – Teses. 5. Ciclo celular – Teses. 6. Ensaios de Seleção de Medicamentos Antitumorais. I. Sabino, Kátia Costa de Carvalho. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III Título.

CDU 616-006.66

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

_____ _____

Assinatura Data

Thiago Martino Martins

Avaliação da ação antitumoral *in vitro* da pterocarpanoquinona LQB 118 e estudo de alguns mecanismos de ação

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

Aprovada em 07 de março de 2013.

Orientadora: Prof.ª Dra. Katia Costa de Carvalho Sabino
Instituto Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca examinadora:

_____
Prof.ª Dra. Marcia Cristina Paes
Instituto Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____
Prof.ª Dra Raquel Ciuvalschi Maia
Instituto Nacional do Câncer

_____
Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro Costa
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
2013

DEDICATÓRIA

À minha família, pelo apoio incondicional perante minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me confortar nos momentos mais difíceis e por mostrar que dedicação e persistência são os principais ingredientes para alcançarmos nossos objetivos.

Aos meus pais Wagner e Claudia, meu irmão Rodrigo, minha tia Carla e minhas primas Julie e Juliana. O amor de vocês é o maior incentivo para continuar neste caminho. Obrigado por sempre acreditarem em mim!

Aos meus avós Hugo e Cely, pela confiança e admiração ao meu trabalho.

À minha avó Ilma. Sei que estarás sempre ao meu lado, me iluminando, me guiando e me fortalecendo. Para sempre estarás em meu coração!

À minha namorada (Fabiana), por estar presente nos melhores momentos da minha vida, pelos ensinamentos e pela paciência ao longo destes anos. Seu amor e seu apoio são fundamentais!

À minha professora e orientadora Katia Sabino, pela dedicação nos ensinamentos, por confiar e acreditar no meu futuro como pesquisador. Receba este “Muito obrigado” repleto de sentimentos bons!!!

Ao professor Pardal, por compartilhar sua grande sabedoria e mesmo não mais presente, influenciar nosso dia-a-dia com seus ensinamentos.

Aos professores Marsen Coelho, Graça Justo e Natália Pereira, do Departamento de Bioquímica, por todo o apoio e colaboração neste período.

À professora Marcia Paes, pelo apoio e valiosa revisão e avaliação deste trabalho.

Aos professores Ayres Dias e Paulo Costa, por representarem o combustível destes trabalhos promissores.

À banca, por aceitar o convite e por contribuir com a minha formação científica.

Aos amigos de trabalho, que contribuíram para a execução dos experimentos, pela troca de experiências, pela descontração e diversão nos momentos apropriados; Girlaine, Mariana, Nathália, Wanderson, Daniele, Fabiana, Velozo, Maurício, Francis, Jéssica, Quelle, Sarah, Márcio, Tatiane, Helena, Rafael, Amanda e Rafael Dantas.

Aos alunos da professora Katia; Stefany, Rachell, Letícia (Lelê) e Fernandinha, meu agradecimento pelo apoio de vocês, pelas discussões científicas e pela nossa união. Obrigado por tudo, vocês são demais!

Aos técnicos do laboratório 2, do departamento de Bioquímica; Paulinho (sempre resolvendo os problemas), Gustavo, Beto e Shirley (nossa mãezona!).

Aos meus velhos e eternos amigos. Saber que posso contar com vocês independente da distância é o que me conforta. E também aos novos amigos!

Aos meus queridos amigos da faculdade, que compreendem perfeitamente esta carreira louca, que torcem, sofrem e comemoram junto comigo cada momento (Juliana, Flávia, Anatália, Luíza e Yann).

A minha amizade de ouro Juliana!!! Sem você tudo seria mais difícil.

Aos amigos e professores dos outros laboratórios do Departamento de Bioquímica, que sempre ajudam nas horas mais complicadas.

Aos amigos distantes, mas presentes; Cíntiazinha, minha mentora e amiga Monica e Patrícia.

Aos amigos do Fundão/UFRJ: Michelle e Halliny.

Aos que contribuíram de alguma forma para a construção deste trabalho, o meu mais sincero e profundo, MUITO OBRIGADO!!!

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

José de Alencar

RESUMO

MARTINS, Thiago Martino. *Avaliação da ação antitumoral in vitro da pterocarpanoquinona LQB 118 e estudo de alguns mecanismos de ação*. 2013. 101f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Tem sido descrito que o acúmulo de mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor contribui para o direcionamento da célula à carcinogênese. Na maioria dos casos de câncer, as células apresentam proliferação descontrolada devido a alterações na expressão e/ou mutações de ciclinas, quinases dependentes de ciclinas e/ou inibidores do ciclo celular. Os tumores sólidos figuram entre o tipo de câncer mais incidente no mundo, sendo a quimioterapia e/ou hormônio-terapia, radioterapia e cirurgia os tratamentos mais indicados para estes tipos de tumores. Entretanto, o tratamento quimioterápico apresenta diversos efeitos colaterais e muitas vezes é ineficaz. Portanto, a busca por novas moléculas capazes de conter a proliferação destas células e com baixa toxicidade para o organismo se faz necessário. Este trabalho teve por objetivo avaliar a ação antitumoral *in vitro* de um novo composto sintético, a pterocarpanoquinona LQB118, sobre algumas linhagens tumorais humanas de alta prevalência e estudar alguns dos seus mecanismos de ação. As linhagens tumorais estudadas neste trabalho foram os adenocarcinomas de mama (MCF7) e próstata (PC-3), e carcinoma de pulmão (A549). A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio do MTT e a proliferação celular pela contagem de células vivas (exclusão do corante azul de tripan) e análise do ciclo celular (citometria de fluxo). A expressão gênica foi avaliada por RT-PCR e a apoptose foi avaliada por condensação da cromatina (microscopia de fluorescência-DAPI), fragmentação de DNA (eletroforese) e marcação com anexina V (citometria de fluxo). Das linhagens tumorais testadas, a de próstata (PC3) foi a que se mostrou mais sensível ao LQB 118, e em função deste resultado, os demais experimentos foram realizados com esta linhagem tumoral. O efeito citotóxico do LQB 118 se mostrou tempo e concentração dependente. Esta substância inibiu a proliferação celular e prejudicou a progressão do ciclo celular, acumulando células nas fases S e G_2/M. Buscando esclarecer os mecanismos desta ação antitumoral, demonstrou-se que o LQB 118 inibe a expressão do mRNA do fator de transcrição c-Myc e das ciclinas D1 e B1, e induz a apoptose de tais células tumorais. Em suma, o LQB 118 é capaz de inibir a proliferação das células tumorais de próstata, alterando a expressão do mRNA de alguns genes reguladores do ciclo celular, resultando em interrupção do ciclo celular e indução de apoptose, indicando este composto como um potencial candidato a futuro medicamento no tratamento do câncer de próstata.

Palavras-chave: Pterocarpanoquinona LQB 118. Apoptose. Ciclo cellular. Câncer de próstata e linhagem celular PC3.

ABSTRACT

It has been reported that accumulation of mutation on proto-oncogenes and tumor suppressor genes directs cells to carcinogenesis. In most described cancer, cells display uncontrolled proliferation due to altered expression or mutations of cyclins, cyclin-dependent kinases and cell cycle inhibitors. The solid tumors are the most common cancer type in world. Chemotherapy and/or hormone-therapy, radiotherapy and surgery are the suitable treatment for this disease. However, chemotherapy has been shown several side effects and often ineffective. Therefore, the search for new molecules with antitumoral activity low cytotoxicity is needed. The aim of this work was to evaluate the *in vitro* antitumoral effects of a new synthetic compound, the pterocarpanquinone LQB 118, on tumor cell lines of high prevalence in the world and to study some mechanisms of action. Tumor cell lines of breast (MCF7), lung (A549) and prostate (PC3) were cultivated at RPMI medium with 10% of serum fetal bovine. The cytotoxicity was evaluated by MTT assay and the cell proliferation by cell counting (trypan blue exclusion) and cell cycle analysis (flow cytometry). Apoptosis was evaluated by chromatin condensation (fluorescence microscopy with DAPI), DNA fragmentation (electrophoresis) and annexin-V and iodide propidium staining. Gene expression was studied by RT-PCR. As LQB 118 (5 µg/ml) induced cytotoxic effect mainly on prostate tumor cells, further experiments were then performed only with this tumor cell line. The LQB 118 cytotoxic effects were time and concentration-dependent. Furthermore, this substance inhibited cell proliferation and promoted cell cycle arrest, increasing cell number in S and G_2/M phases. Studying the mechanisms of the LQB 118 antitumoral action, it was demonstrated that this substance inhibited the mRNA expression of the transcription factor c-Myc, cyclin D1 and cyclin B1 and also induced apoptosis of PC3. Concluding, LQB 118 impairs prostate tumor cells proliferation due to altered mRNA expression of some cell cycle regulator genes, resulting in cell cycle arrest and apoptosis induction, suggesting this compound as a good candidate for a future drug in prostate cancer treatment.

Keywords: Pterocarpanquinone LQB 118. Apoptosis. Cell cycle. Prostate cancer and cell line PC3.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo celular e sua regulação..... 19

Tabela 1 - Ciclinas e Cdks envolvidas em cada fase do ciclo celular..... 21

Figura 2 – Principais vias de ativação da apoptose..... 28

Figura 3 – Localização anatômica da glândula prostática..... 30

Figura 4 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não-melanoma..... 31

Tabela 2 - Classificação dos agentes quimioterápicos e seus mecanismos de ação..... 35

Figura 5 – Estrutura do pterocarpano isolado de *Platymiscium floribundum*..... 36

Figura 6 - Estrutura da pterocarpanoquinona LQB 118..... 38

Quadro 1 - Sequência dos oligonucleotídeos senso e antisenso, temperatura de anelamento ao cDNA de cada oligonucleotídeo, número ciclos e tamanho do produto em pares de bases..... 42

Figura 7 - Efeito citotóxico do LQB 118 sobre a ARM de diferentes linhagens tumorais..... 58

Figura 8 - Comparação do efeito citotóxico do LQB 118 com o do quimioterápico Paclitaxel sobre a linhagem celular PC3..... 59

Figura 9 - Comparação do efeito citotóxico do LQB 118 com o do quimioterápico Paclitaxel sobre células prostáticas normais (RWPE-1)..... 60

Figura 10 - Comparação do efeito citotóxico do LQB 118 e do Paclitaxel sobre as células epiteliais prostáticas tumoral (PC3) e normal (RWPE-1)..... 62

Figura 11 - Efeito do LQB 118 e Paclitaxel na curva de crescimento das células PC3..... 63

Figura 12 - Proliferação e análise citofluorimétrica do ciclo celular de células PC3, após tratamento com LQB 118 ou Paclitaxel..... 65

Figura 13 - Efeito do LQB 118 e Paclitaxel sobre o ciclo celular das células PC3..... 66
Figura 14 - Efeito do LQB 118 e Paclitaxel sobre a expressão de mRNA do fator de transcrição c-Myc em células PC3..... 68
Figura 15 - Efeito do LQB 118 e Paclitaxel sobre a expressão de mRNA da ciclina D1 das células PC3..... 69
Figura 16 - Efeito do LQB 118 e Paclitaxel sobre a expressão de mRNA da ciclina B1 das células PC3..... 71
Figura 17 - Efeito do LQB 118 e Paclitaxel na apoptose de células PC3, por marcação com anexina V-FITC..... 74
Figura 18 - Efeito do LQB 118 e Paclitaxel sobre a fragmentação de DNA durante o processo apoptótico..... 76
Figura 19 - Efeito do LQB 118 e Paclitaxel sobre a morfologia celular e nuclear de células PC3, por microscopia de fluorescência..... 78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF - *Apoptosis induction factor* - Fator de indução de apoptose

Apaf-1 – Fator de ativação de peptidase envolvida na apoptose

ARM – Atividade redutora mitocondrial

ATP – Adenosina trifosfato

Cdks – Quinase dependente de ciclina

cDNA – DNA complementar

CIP/KIP – Família de proteínas inibidoras de Cdk para todas as Cdks

DAPI – Dilactato de 4',6-diamino-2-fenindol

DMSO – Dimetil sulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DNAse – Enzima que hidrolisa o DNA

dNTP – Mistura de desoxirribonucleotídeos

E2F – Fator de elongação do tipo 2

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FSC – "Forward side scatter" parâmetro do aparelho FACScan que determina o tamanho da partícula

IAPs – Proteínas inibidoras de apoptose

IC_{50} – Concentração que inibe 50% de um determinado efeito

INK – Família de proteínas inibidoras de Cdks específicas

MDR – *Multidrug Resistance* – Resistência a múltiplas drogas

MRP – Multidrug Resistance-associated Protein - Proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas

MTT – Brometo de 3-[4,5–dimetiltiazol–2-il]-2,5–difenil-tetrazol

NF-kB – Fator nuclear potencializador da cadeia leve kappa de células B ativadas

NQO1 – NAD(P)H quinona oxidoredutase 1

WHO – *World Health Organization* - Organização Mundial da Saúde

PBS – Phosphate-Buffered Saline - Solução salina tamponada por fósforo

PCR – Reação em cadeia da polimerase

Pgp – Glicoproteína P (P-glycoprotein)

PI – Iodeto de propídio

pRb – Proteína de retinoblastoma

PSA – Antígeno prostático específico

RNA – Ácido ribonucleico

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

RNAse – Enzima que hidrolisa o RNA

RT – Reação de transcrição reversa

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SFB – Soro fetal bovino

SSC – “Side scatter” parâmetro do aparelho do FACScan que determina a complexidade interna da partícula ou granulosidade

UV – Luz ultravioleta

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	**PROLIFERAÇÃO CELULAR**	18
1.1	**Ciclo celular**	18
1.2	**Regulação do ciclo celular**	19
1.2.1	Proteínas reguladoras	19
1.2.1.1	Quinases dependentes de ciclinas (Cdks) e ciclinas	19
1.2.1.2	Inibidores do ciclo celular	21
1.2.2	Transição entre as fases do ciclo celular	22
1.2.3	Transdução de sinal e ciclo celular	23
1.2.3.1	c-Myc	24
2	**APOPTOSE**	26
3	**CÂNCER**	29
3.1	**Câncer de próstata**	29
3.2	**Estudos com linhagens tumorais**	32
4	**TRATAMENTO DO CÂNCER**	34
4.1	**Pterocarpanos**	36
4.2	**Quinonas e naftoquinonas**	37
4.3	**Composto sintético, LQB 118**	37
5	**OBJETIVOS**	39
6	**MATERIAL**	40
6.1	**Pterocarpanoquinona (LQB 118)**	40
6.2	**Linhagem celular**	40
6.3	**Reagentes**	41
6.3.1	Cultura de células	41
6.3.2	Ensaios de citotoxicidade, proliferação, ciclo celular e apoptose	41
6.3.3	Extração de RNA e RT-PCR	42
6.3.4	Fragmentação de DNA	43
6.3.5	Gel em agarose para eletroforese	43
6.3.6	Microscopia de fluorescência – DAPI	43
6.4	**Equipamentos e Softwares**	44

6.5 **Material descartável e vidrarias especiais**..... 45
7 **METODOLOGIA**..... 46
7.1 **Linhagens celulares e cultura de células**..... 46
7.2 **Ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT**..... 46
7.3 **Curva de crescimento celular**..... 47
7.4 **Avaliação do Ciclo celular**..... 48
7.5 **Avaliação do nível de apoptose**..... 48
7.5.1 Anexina-V..... 49
7.5.2 Fragmentação de DNA..... 50
7.5.3 Marcação nuclear com DAPI..... 51
7.6 **Análise da expressão de RNA mensageiro por RT-PCR**..... 52
7.6.1 Cultura de células..... 52
7.6.2 Extração do RNA..... 52
7.6.3 Pureza e quantificação do RNA..... 53
7.6.4 Tratamento da amostra de RNA com DNAse..... 53
7.6.5 Determinação da integridade do RNA..... 54
7.6.6 Reação de transcrição reversa (RT)..... 54
7.6.7 Reação de polimerização em cadeia (PCR)..... 55
7.6.8 Análise dos produtos da PCR..... 55
7.7 **Análise estatística**..... 56
8 **RESULTADOS**..... 57
8.1 **Ensaio de citotoxicidade**..... 57
8.2 **Curva de crescimento celular**..... 62
8.3 **Ciclo celular**..... 64
8.4 **Expressão de mRNA**..... 66
8.5 **Apoptose**..... 72
8.5.1 Anexina V..... 72
8.5.2 Fragmentação de DNA..... 75
8.5.3 Marcação nuclear com DAPI..... 76
9 **DISCUSSÃO**..... 79
10 **CONCLUSÕES**..... 88
REFERÊNCIAS..... 89

INTRODUÇÃO

O aumento na expectativa de vida, a evolução tecnológica do diagnóstico de doenças, o estilo de vida da população e alguns outros fatores podem explicar a alta incidência de diferentes tipos de câncer na população mundial. Esta doença se desenvolve através do acúmulo de mutações em genes específicos no DNA das células, conferindo características proliferativas e resistência à morte (INCA, 2012). Geralmente o tratamento do câncer consiste em cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia. Existem diversos tipos de quimioterápicos disponíveis para o tratamento de diferentes tipos de tumores (Goodman e Gilman, 2012), entretanto a utilização dos quimioterápicos tem sua eficácia alterada devido à baixa ou nenhuma seletividade dos sobre as células tumorais, desencadeando diversos efeitos colaterais durante o tratamento, assim como o desenvolvimento da resistência aos quimioterápicos pelas células. Neste sentido, diversos campos da ciência têm tentado buscar novos compostos que apresentem baixa toxicidade ao organismo e/ou maior eficiência no tratamento da progressão da doença (INCA, 2012). Diante disto, a síntese de moléculas com atividade farmacológica direcionada é um campo proeminente na pesquisa, visto que o entendimento da relação entre estrutura e atividade permite o desenvolvimento de análogos de compostos já utilizados, porém com atividade melhorada (Hussain et al., 2007).

1 **PROLIFERAÇÃO CELULAR**

1.1. **Ciclo celular**

Nos organismos multicelulares existe um controle elaborado na proliferação das células, para manutenção da integridade do organismo, tanto em termos de número de células, quanto em organização espacial do mesmo. As células somáticas se reproduzem através da duplicação de seus constituintes, originando duas células-filhas geneticamente idênticas, mecanismo este altamente regulado denominado de ciclo celular. Tradicionalmente, este processo é dividido em duas fases; intérfase, o período mais longo do ciclo (compreende as fases G_1, S e G_2) e mitose ou fase M. Na intérfase a célula aumenta seu tamanho e realiza a síntese de DNA. G_1 corresponde ao intervalo entre a fase M e a fase S. Durante a fase G_1, a célula aumenta de tamanho e sintetiza proteínas necessárias para a duplicação do DNA nuclear, que ocorre na fase S. G_2 consiste no intervalo entre a fase S e a fase M, na qual ocorre crescimento celular, síntese proteica e duplicação das organelas (Vermeulen *et al*., 2003). A mitose na maioria das células dura uma hora, sendo de fato a fase de divisão celular. Nesta fase ocorre a segregação do material genético duplicado para os polos celulares, seguido da divisão da célula (citocinese) em duas células-filhas (McGowan, 2003).

A duração do ciclo depende do tipo celular e principalmente do período que a célula permanece na fase G_1, pois nesta fase, as células não estão comprometidas com a replicação do DNA, podendo entrar em um estado de descanso especializado ou quiescência celular (fase G_0), ocorrendo quando as células não recebem estímulos proliferativos apropriados, embora permanecendo metabolicamente ativas (Evan e Vousden, 2001).

A mitose pode ser dividida em quatro etapas: prófase, metáfase, anáfase e telófase. Na fase M, a célula interrompe seu crescimento, e a energia celular é direcionada para o processo de divisão da célula. De forma geral, ocorre condensação da cromatina em cromossomos, e rearranjo do citoesqueleto, que

permite a formação do fuso mitótico a partir dos microtúbulos (prófase). A membrana nuclear é rompida, favorecendo o alinhamento dos cromossomos no equador da célula (metáfase). As cromátides-irmãs movem-se em direção aos polos celulares (anáfase), seguida da construção da nova membrana nuclear ao redor dos cromossomos (telófase). Por fim, ocorre a separação do citoplasma (citocinese), originando duas células-filhas geneticamente idênticas (Alberts *et al*., 2009; Robinson, 2001).

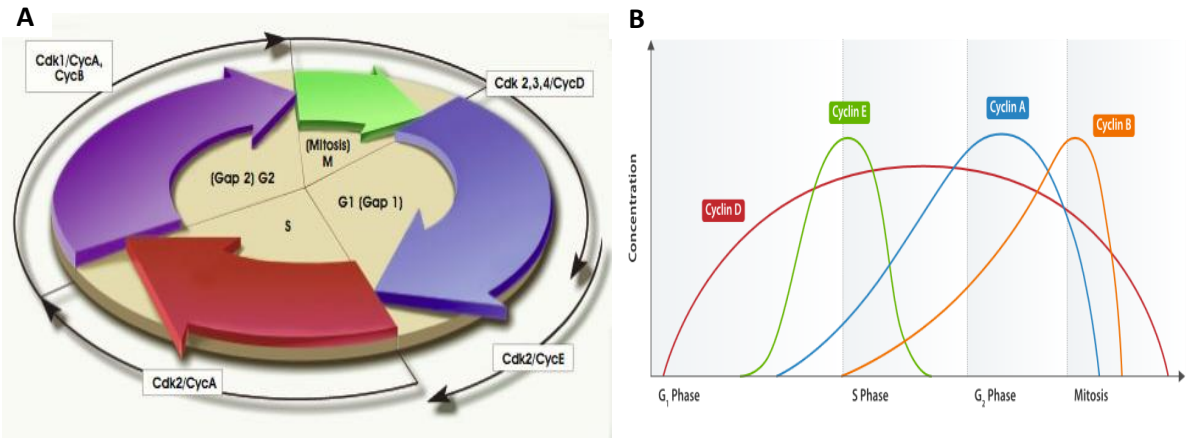

Figura 1: Ciclo celular e sua regulação. (A) Componentes reguladores de cada fase do ciclo celular. (B) Expressão das ciclinas ao longo do ciclo (©Terese Winslow, Lydia Kibuik, 2001, adaptado).

1.2 **Regulação do ciclo celular**

1.2.1 Proteínas reguladoras

1.2.1.1 Quinases dependentes de ciclinas (Cdks) e ciclinas

A maquinaria do ciclo celular envolve diversos mecanismos que permitem a sensibilização para fatores de crescimento, fatores inibidores ou danos que impedem a progressão do ciclo celular. A síntese e a degradação de proteínas, ao longo do ciclo celular, como as ciclinas, promovem sua regulação. Além disso,

existem diferentes *checkpoints* (pontos de restrição) que impedem o início de eventos subsequentes até que o anterior seja concluído com sucesso (Berthet e Kaldis, 2007). Análises moleculares mostram que proteínas reguladoras do ciclo celular encontram-se mutadas na maioria dos tumores humanos (Park e Lee, 2003).

A atividade das ciclinas é modulada por alterações nos níveis de expressão de seu RNA mensageiro (mRNA) e expressão proteica (controle transcricional e traducional, respectivamente), sendo estas proteínas moléculas ativadoras de enzimas quinases dependentes de ciclinas (Cdks). Por outro lado, as Cdks são expressas constitutivamente e sua atividade é modulada por fosforilação. As Cdks são subunidades catalíticas de serina/treonina quinases, que desencadeiam cascatas de sinalização, fosforilando diversos substratos. Assim, a formação do complexo ciclina-Cdk específico de cada fase, ativa a proteína Cdk, que fosforila alvos-chave, permitindo a progressão pelas fases do ciclo celular (Murray, 2004).

A holoenzima Cdk ativa é um dímero, sendo composta por duas subunidades, uma catalítica e outra reguladora, que é a ciclina. Cada ciclina é sintetizada em um estágio particular do ciclo celular, sendo degradada via proteassoma. Esta variação controlada da concentração de ciclinas é crítica para a dinâmica unidirecional do ciclo celular. Por exemplo, a ciclina D é sintetizada na fase inicial da fase G_1, a ciclina E é sintetizada tardiamente na fase G_1 e início da fase S, enquanto a ciclina A é sintetizada durante as fases S e G_2 e a ciclina B nas fases G_2 e M. Logo, uma subunidade catalítica não pode se tornar ativa até que uma ciclina específica seja sintetizada (Park e Lee, 2003). Existem descritos aproximadamente 29 genes que codificam proteínas com domínio de 150 aminoácidos, característico das ciclinas (Golias *et al.*, 2004). A tabela 1 exemplifica algumas Cdks e a associação com ciclinas específicas em cada fase do ciclo celular.

Tabela 1: Ciclinas e Cdks envolvidas em cada fase do ciclo celular (Park e Lee, 2003; Vermeulen *et al*., 2003, adaptado).

CDK	Ciclinas	Fase do ciclo celular
Cdk4/6	D1, D2 e D3	Fase G1
Cdk2	E	Transição G1/S
Cdk2	A	Fase S
Cdk1	A	Transição G2/M
Cdk1	B	Mitose

1.2.1.2 Inibidores do ciclo celular

A regulação do ciclo celular é coordenada por diversos fatores, sejam estes extracelulares ou intracelulares. Um importante regulador são os pontos de restrição ao longo do ciclo celular. Estes garantem a replicação e a separação fiel dos cromossomos, mantendo a estabilidade genética. Existem dois pontos de restrição, um situado no meio da fase G_1, após o qual as células tornam-se independentes de fatores de crescimento e comprometem-se com a divisão celular, e outro ponto localizado no final da fase G_2, pois se houver lesão ou erro no DNA pode acarretar a interrupção do ciclo celular (Pardee, 1974; Morrison, 2012). Outro importante regulador é a proteína retinoblastoma (pRb). Estudos mostram que a associação do complexo repressor pRb-E2F com genes que controlam o ciclo celular é importante para a interrupção do crescimento celular (Zhang *et al*., 1999: Talluri e Dick, 2012).

Os pontos de restrição do ciclo celular são regulados por duas classes de proteínas, através do complexo ciclina/Cdk e de inbidores de Cdk (CIKs). Estes últimos se ligam ao complexo ciclina/Cdk, mantendo-o no estado inativo. Existem duas famílias de proteínas inibidoras de quinases, epecífica (INK), composta por $p16^{INK4}$, $p14^{INK4a}$, $p15^{INKb}$, $p18^{INKc}$ e $p19^{INKd}$, membros desta família têm a capacidade de se ligar e inibir as Cdk4 e Cdk6, impedindo a fosforilação de Rb. A outra família, inibe todas as Cdks (CIP/KIP), a qual inclui $p21^{CIP1}$, $p27^{KIP1}$ e $p57^{KIP2}$. Estas proteínas podem se ligar a ambas as subunidades, ciclinas e Cdks. Membros da

família $p21^{CIP1}$ interagem tanto com ciclinas D e E, porém preferencialmente inibem a atividade da Cdk2. A síntese destas proteínas é estimulada por sinais mitogênicos e sua degradação ocorre via proteassoma. Estudos têm demonstrado a regulação da atividade das proteínas $p21^{CIP1}$ e $p27^{KIP1}$ através da fosforilação pela via Akt. A fosforilação destas proteínas irá determinar sua localização celular, visto que no estado fosforilado, p21 e p27 são retidas no citoplasma, permitindo a manutenção da atividade Cdk2. A localização citoplasmática destas proteínas deve estar associada à função anti-apoptótica. Além disso, existe um aumento na expressão de p27, através do contato célula-célula (Swanton, 2004).

1.2.2. Transição entre as fases do ciclo celular

Fatores de crescimento e sinais mitogênicos convergem no ciclo celular para estimular a expressão de ciclinas da família D (D1, D2 e D3). A ciclina D inicia a progressão inicial da fase G_1, através da associação com as Cdks 4/6. Esta ligação permite a fosforilação e parcial inativação da atividade repressora da pRb. A pRb existe em vários estados de fosforilação, progredindo de um estado repressor não-fosforilado, representando a fase G_0, à forma hiperfosforilada, representando a etapa tardia da fase G_1. No estágio hipofosforilado, a pRb encontra-se associada ao fator de elongação do tipo 2, mais conhecido como fator de transcrição E2F, além de recrutar a enzima histona deacetilase (HDAC), impedindo, desta forma, a transcrição de genes que favorecem a progressão do ciclo celular (Harbour *et al.*, 1999; Emori *et al.*,2012).

Uma vez fosforilada pelo complexo ciclina-D/Cdk4 ou Cdk6, a pRb perde afinidade ao fator de transcrição E2F, liberando-o para a transcrição de genes envolvidos nas fases seguintes do ciclo celular, como a ciclina E (E1, E2). Esta ciclina, por sua vez, associa-se à sua Cdk específica, Cdk2. O complexo formado aumenta o estágio de fosforilação da pRb e simultaneamente a ciclina D1 é ubiquitinada e sofre degradação, direcionando o ciclo celular para a fase seguinte (Kufe *et al*., 2003).

Antes de sua degradação, a ciclina D/Cdk4 ou Cdk6 promove o sequestro do inibidor do complexo ciclina E/Cdk2 ($p27^{KIP1}$). Após a ativação do complexo ciclina

E/Cdk2, este realiza a fosforilação do seu inibidor, $p27^{KIP1}$, auxiliando na degradação do mesmo e garantindo a progressão do ciclo celular (Swanton, 2004).

O complexo ciclina E/Cdk2 promove a fosforilação de diversos substratos, principalmente componentes da maquinaria de duplicação do DNA, como por exemplo, a fosforilação da nucleosfosmina, que leva à dissociação dos centrossomos favorecendo sua duplicação. Os níveis de ciclina E permanecem até a entrada na fase S, seguido de ubiquitinação e degradação, concomitante com o aumento nos níveis da ciclina A. Estas alterações favorecem a formação do complexo ciclina A/Cdk2 ou ciclina A/Cdk1, que controla a transcrição de genes para a síntese completa do DNA. Além disto, a ciclina A também é capaz de fosforilar a pRb, mantendo o fator de transcrição E2F ativo. Ao final da fase S a ciclina A é degradada e aumenta a expressão de ciclina B, a qual se associa à Cdk1 ou Cdc2 (Malumbres e Barbacid, 2005).

A sinalização positiva no ponto de restrição da fase G_2 é guiada pela Cdc2, a qual é modulada pela associação à sua ciclina específica (ciclina B1), assim como por fosforilação e desfosforilação de resíduos de treonina e tirosina (Thr 14 e Tyr 15), pela fosfatase Cdc25. A desfosforilação é essencial para a ativação do complexo ciclina B1/Cdc2, crucial para a entrada na fase M do ciclo celular. Caso haja algum erro na duplicação do DNA ou este não tenha sido duplicado, a fosfatase Cdc25 é fosforilada pela *checkpoint* quinase (Chk1/2), e consequentemente tem sua atividade inibida, evitando que a célula com o dano prossiga para a fase M (Perdiguero e Nebreda, 2004). Caso não haja danos ao DNA, a célula ingressa na fase M, com consequente degradação da ciclina B1 por ubiquitinação através da via proteolítica, regulada por uma E3 ubiquitina ligase, denominada complexo promotor de anáfase (APC) (Harper, 2002; Polanski *et al.*, 2012).

1.2.3. Transdução de sinal e ciclo celular

A transdução de sinal é realizada inicialmente pela ligação de um fator presente no meio extracelular (ligante) a um receptor específico, presente na membrana plasmática da célula. Esta associação pode promover alteração conformacional ou auto-fosforilação do receptor. Como consequência deste evento

proteínas citoplasmáticas são recrutadas desencadeando uma cascata de sinalização intracelular (Irish *et al.*, 2004).

1.2.3.1 c-Myc

Esta proteína pertence a uma pequena família com funções celulares bem estabelecidas como crescimento celular, proliferação, estruturação do citoesqueleto, adesão celular e motilidade, diferenciação e apoptose (Cole e Henriksson, 2006; Meyer *et al.*, 2008). Membros desta família compartilham uma similaridade na sequencia proteica e são caracterizados por pertencerem à família de fatores de transcrição que contém a porção C-terminal contemplando três domínios importantes; (a) região básica, responsável pelo reconhecimento específico da sequencia de DNA, (b) hélice-alça-hélice e (c) zíper de leucina. Estes últimos sendo responsáveis pela formação de heterodímeros específicos com os ligantes de c-Myc (Cotterman *et al*., 2008). Geralmente se heterodimerizam em E-boxer com seu monômero Max, entretanto recentes evidências sugerem uma ação E-boxer independente (Amati *et al*., 1993; Cascón e Robeldo, 2012).

Praticamente toda c-Myc celular está complexada com a proteína Max, que é expressa constitutivamente. A expressão do c-Myc é indispensável ao desenvolvimento embrionário normal e sua atividade é regulada por sinais externos, como fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular, bem como por sinais internos, como a maquinaria de ativação do ciclo celular (Gardner, Lee e Dang, 2002). A regulação da expressão gênica do c-Myc ocorre através da ativação do fator nuclear potencializador de cadeia leve kappa de células B ativadas (NFκB) (Duyao *et al*., 1990; Sacco *et al*., 2010).

Estudos informam que o c-Myc se liga a regiões gênicas e intergênicas para controlar a expressão de aproximadamente 10% de todos os genes (Fernandez, 2003). Dentre os genes regulados por c-Myc encontram-se os genes responsáveis pela progressão do ciclo celular como Cdc25, Cdk4, Ciclina D, E e A, além de promover a inibição de genes supressores do ciclo, assim como suas atividades, tais como dos inibidores $p15^{INK4b}$, $p21^{CIP1}$ e $p27^{KIP1}$ (Brenner *et al.*, 2005; White e Dalton, 2005). Paradoxalmente, evidenciou-se que, em certas circunstâncias, o c-Myc

poderia atuar induzindo a apoptose, pois muitos genes envolvidos na morte celular programada, como p53, $p21^{CIP1}$ e BAX contêm regiões em seus promotores responsivas ao c-Myc (Lutz, Leon e Eilers, 2002).

Sabendo-se que o c-Myc tem níveis de expressão aumentados em diversos tipos de tumores, este fator de transcrição torna-se um possível alvo terapêutico, visto que atua na regulação do ciclo celular, assim como em mecanismos de morte celular por apoptose (Meyer *et al*., 2008).

2. **APOPTOSE**

A existência de diferentes modalidades de morte celular foi inicialmente suspeitada por Kerr e colaboradores (1972), quando foi observada a diferença morfológica de dois tipos de morte celular: necrose, desencadeada por rápida e violenta degeneração celular, afetando uma extensa população de células e caracterizada por rompimento da membrana plasmática, extravasamento de componentes intracelulares e processo inflamatório; e apoptose, um tipo de morte celular pontual, dependente de energia e altamente regulado, que não induz inflamação. Este tipo de morte pode ser ativada por diversos estímulos, incluindo estresse intracelular e sinalização mediada por receptores.

Morfologicamente, a apoptose tem como característica a retração do citoplasma, causada por inicial desidratação e perda de aderência à matriz extracelular. As organelas mantêm-se integras, com exceção da mitocôndria, que em alguns casos pode apresentar ruptura na membrana externa. A cromatina sofre condensação (núcleo picnótico) e ocorre fragmentação do DNA (cariorrexis), visto que durante este processo, endonucleases são ativadas, promovendo a ruptura do DNA em fragmentos de tamanho variados, porém múltiplos de 200 pares de bases. As células apoptóticas são rapidamente fagocitadas *in vivo* por macrófagos, devido ao reconhecimento de um fosfolipídio de membrana (fosfatidilserina), que é externalizado na célula durante esse processo de morte celular. Caso as células apotóticas não sejam fagocitadas, a membrana plasmática emite prolongamentos (*blebbs*) englobando organelas e DNA, resultando na formação de grande número de corpos apoptóticos, o que caracteriza um estágio tardio da apoptose ou necrose secundária à apoptose (Ziegler e Groscurth, 2004; Kay e Grinstein, 2011; Galluzzi *et al.*, 2012).

Grande parte do processo apoptótico é regulada pela família das proteases chamadas de caspases (cisteína-proteases). Estas são sintetizadas na forma de zimogênio e sinais *upstream* estimulam a atuação destas proteases. Caspases iniciadoras (caspase-1, -8, -9, -10) são ativadas por oligomerização das mesmas, enquanto as caspases executoras (caspase-3, -6 e -7) são ativadas por ação de caspases iniciadoras e por outras proteases como granzima B. Três vias principais de apoptose podem ser direcionadas pelas caspases iniciadoras: via extrínseca, via

induzida por estresse no reticulo endoplasmático (RE) e via mitocondrial (Guimarães *et al.*, 2004).

A via extrínseca é mediada pela interação de ligantes a receptores da família dos receptores do fator de necrose tumoral (TNF). Estes receptores possuem domínio extracelular rico em resíduos de cisteína, que proporcionam o reconhecimento do ligante (Grivicich *et al*., 2007). A interação resulta na trimerização do receptor e consequente recrutamento de proteínas adaptadoras (FADD e TRADD), formando o complexo de morte celular (DISC). Uma vez formado este complexo, ocorre ativação da caspase iniciadora (caspase 8) e progressão na cascata de sinalização apoptótica (figura 2) (Huerta *et al*., 2007).

Danos ao DNA, estresse intracelular, hipóxia e/ou ativação de oncogenes são fatores que promovem ativação da apoptose pela via intrínseca ou mitocondrial. Estes sinais são direcionados à mitocôndria, levando ao colapso do potencial de membrana, bem como à transição da permeabilidade mitocondrial (TPM), com consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma (Grupta, 2003). Dentre estas proteínas, o citocromo-c é liberado, associando-se ao fator de ativação de peptidases envolvidas na apoptose (Apaf-1), adenosina trifosfato (ATP) e pró-caspase 9, formando o apoptossoma. Este complexo ativa a caspase iniciadora, que por sua vez ativa outras caspases executoras (figura 2) (Shi, 2001; Huerta *et al.*, 2007).

Proteínas da família Bcl-2 pró-apoptóticas (Bid, Bak e Bax) e anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-X_L) auxiliam na formação de poros mitocondriais, visto que formam complexos heterodiméricos capazes de alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial (Belizário *et al.*, 2007). Juntamente com o citocromo-c, outras proteínas são liberadas do espaço mitocondrial, como as proteínas inibidoras de apoptose (IAPs), dentre estes, a survivina, capazes de inibir a atividade das caspases. Por outro lado, ocorre a liberação de reguladores secundários da apoptose, Smac/DIABLO e HtrA2/Omi, que antagonizam a ação das IAPs, garantindo a progressão da apoptose. Além disso, são liberadas também proteínas com atividade endonucleásica como a Endo-G e o fator de indução de apoptose (AIF).

A via de estresse do retículo endoplasmático está associada ao acúmulo de proteínas mal enoveladas dentro do retículo. Este fenômeno ocorre por diversos fatores, como descontrole do mecanismo redox, causado por hipóxia, agentes oxidantes ou redutores (Frand *et al.*, 2000; Ludwig-Galezowska *et al.*, 2011),

ausência de glicose, interferindo na glicosilação das proteínas e alterações na homeostase do cálcio (Ma *et al.*, 2004). Esta via apoptótica é mediada por ativação da caspase-12 (figura 2) (Yoneda *et al*., 2001; Huerta *et al.*, 2007).

A comunicação destas vias pode ocorrer em diversas situações (figura 2), como por exemplo, a ativação da caspase-8 pode desencadear a ativação da Bid, em Bid-t, que é translocada para mitocôndria, favorecendo a liberação do citocromo-c (Huerta *et al.*, 2007).

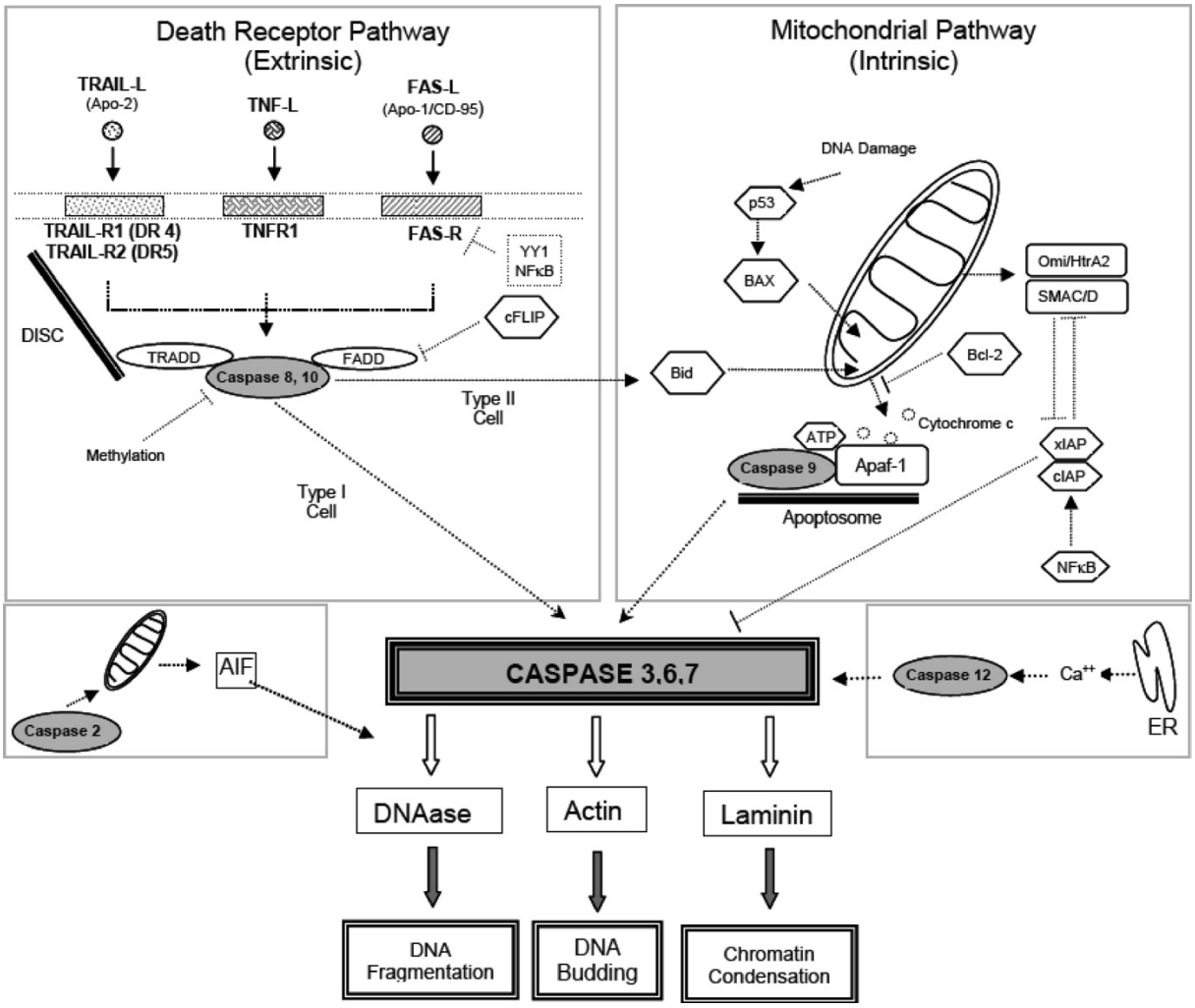

Figura 2: Principais vias de ativação da apoptose (Huerta *et al*., 2007).

Muitos estudos relatam alterações em proteínas que regulam as vias de ativação da apoptose, resultando em diversas doenças com caráter proliferativo, dentre elas o câncer (Kepp *et al.*, 2011). Diante deste cenário, diversas técnicas foram desenvolvidas ao longo dos anos para detectar a ação de possíveis fármacos na indução da morte celular por apoptose (Galluzzi *et al.*, 2009).

3. **CÂNCER**

O ciclo celular e a apoptose são críticos para o entendimento do câncer, visto que a célula tumoral apresenta duas características marcantes: divisão celular descontrolada e resistência à apoptose. Este quadro é estabelecido, quando há acúmulo de mutações em proto-oncogenes, cujos produtos promovem divisão celular, transformando-os em oncogenes, e em genes supressores de tumor, cujos produtos reprimem o ciclo de divisão celular e promovem apoptose (Futreal *et al.*, 2001). As células malignas apresentam imortalidade, capacidade de induzir angiogênese, perda de função, poder de invasão e capacidade metastática (Robbins, 2012).

Os cânceres são classificados de acordo com o tecido e o tipo celular que são originados. Os que são derivados de epitélios externos e internos de revestimento são denominados carcinomas, os de origem muscular, sarcomas, e quando o epitélio de origem for glandular trata-se de um adenocarcinoma. Os tumores que não se enquadram nestes grandes grupos incluem as leucemias, derivadas de células hematopoiéticas, e cânceres derivados do sistema nervoso (Almeida *et al*., 2005).

3.1 **Câncer de Próstata**

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino. Está localizada na frente do reto e abaixo da bexiga, rodeando a uretra (figura 3) e produz parte do sêmen, líquido espesso que contém espermatozoides, além de sintetizar substâncias que protegem a uretra de infecções. A próstata normal apresenta tamanho comparado a uma castanha, representando cerca de 20 gramas no jovem adulto, após ação dos hormônios da puberdade (Tanagho *et al.*, 2007).

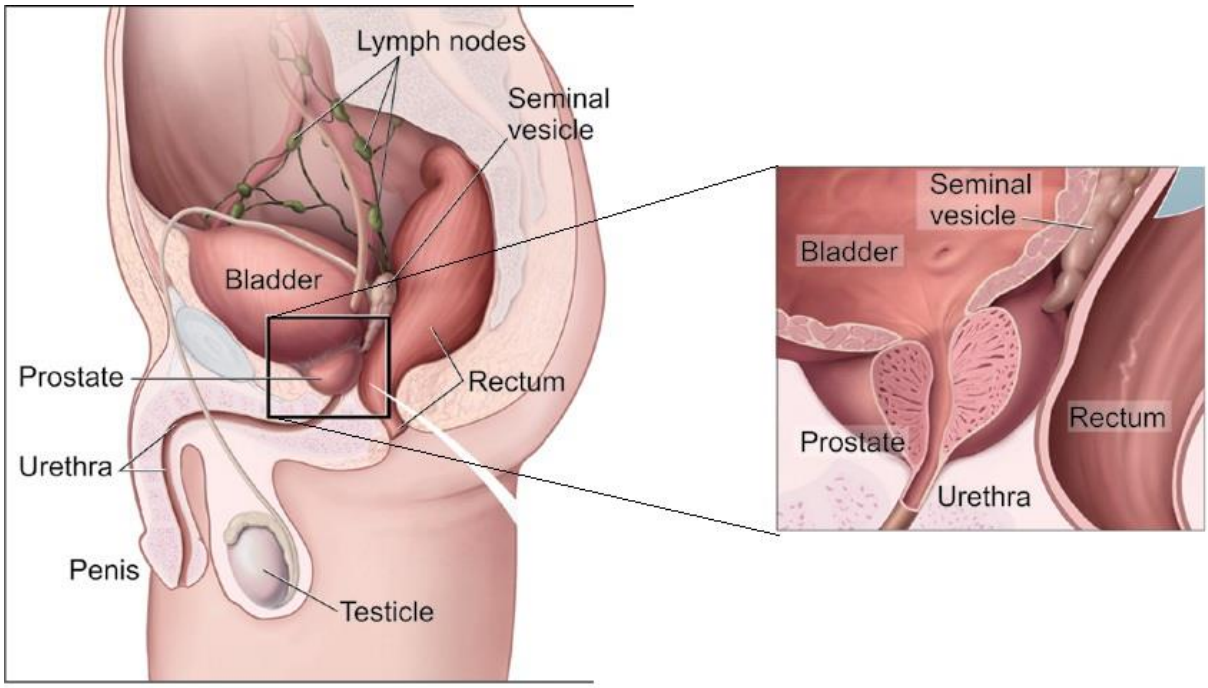

Figura 3: Localização anatômica da glândula prostática (WHO, 2012)

O crescimento das células prostáticas pode ser benigno ou maligno (câncer). Neste último caso, as células tumorais podem migrar para outras regiões do corpo, através dos vasos sanguíneos, estabelecendo novos focos tumorais. O câncer de próstata tem evolução silenciosa, e quando os pacientes apresentam algum sintoma, estes se resumem em aumento na frequência ou dificuldade em urinar. Por outro lado, na fase avançada da doença, observa-se dores ósseas, sintomas urinários, ou quando mais graves, infecção generalizada e insuficiência renal (Tanagho *et al.*, 2007).

Estimativas da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2008) apontam o câncer de próstata como o primeiro tipo de câncer mais diagnosticado nos homens (13% do total), aproximadamente 75% dos casos diagnosticados no mundo ocorrendo em países desenvolvidos. No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2012) revelam o câncer de próstata como o primeiro mais frequente nos homens (figura 4). O aumento da expectativa de vida e a melhoria e evolução tecnológica nos diagnósticos podem explicar o aumento na incidência de câncer ao longo dos anos.

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Figura 4: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não-melanoma. (INCA, 2012).

Assim como em outros cânceres, a idade é um marcador de risco importante para o câncer de próstata, pois a incidência e a mortalidade aumentam de forma exponencial após os 50 anos. Histórico familiar de câncer de próstata e a dieta podem exercer influência sobre a carcinogênese. Outros fatores associados ao câncer de próstata incluem aumento do fator de crescimento análogo à insulina, consumo excessivo de álcool e tabaco, e a vasectomia (INCA, 2002).

O toque retal é o teste mais utilizado para diagnosticar o câncer de próstata, apesar de suas limitações, uma vez que somente as porções lateral e posterior da próstata podem ser apalpadas, deixando 40% a 50% dos tumores fora de alcance. A dosagem de antígeno prostático específico (PSA), produzido pelas células prostáticas, surgiu como um teste promissor no diagnóstico inicial de câncer de próstata, embora haja uma falta de consenso entre os valores do ponto de corte e aqueles clinicamente significativos (alguns autores consideram valores acima de 4 ng/mL de PSA sanguíneo suficiente para realização de biópsia). Entretanto, muitos casos são falso-positivos, pois o PSA também é produzido pela célula prostática normal e não exclusivamente pela célula tumoral, podendo o valor preditivo de PSA para o câncer ser confundido com valores associados a outras doenças da próstata (prostatite, hiperplasia benigna da próstata, dentre outras) (Vickers *et al.*, 2012).

O diagnóstico do câncer de próstata é realizado pela análise histopatológica, após verificação de anormalidade no toque retal e dosagem de PSA. A histopatologia deve fornecer a graduação histológica do sistema de Gleason, cujo objetivo é informar a taxa de crescimento do tumor e a tendência à disseminação. A escala de graduação do câncer de próstata varia de 1 a 5, sendo o grau 1 a forma menos agressiva. Para obter o escore total, o patologista gradua duas áreas do

tumor e soma estes valores. Escores de Gleason acima de 7 representam tumores com altas taxas de crescimento e capacidade metastática (INCA, 2012). Esta graduação é o fator prognóstico isolado mais importante no câncer de próstata e determinante para a escolha da terapia.

3.2 **Estudos com linhagens tumorais**

Nos últimos anos a cultura de células *in vitro* passou de um instrumento de pesquisa para uma poderosa ferramenta no desenvolvimento da biotecnologia. A utilização da cultura de células tem se tornado uma necessidade para a ciência, pois permite o estudo dos mecanismos bioquímicos, moleculares e celulares de ação de drogas, dos fenômenos referentes à carcinogênese, resistência a drogas e toxicidade (Kepp *et al.*, 2011). Existem várias linhagens celulares utilizadas nos estudos de diferentes tipos de tumores. No caso do tumor de próstata, as linhagens celulares mais utilizadas nos estudos são a PC3, a LNCaP e a DU145 (Stone *et al.*, 1978; Kaighn *et al.*, 1979).

Existem diversos subtipos de câncer de próstata, sendo cerca de 80% sensíveis a hormônios androgênicos. Entretanto este câncer pode sofrer transição do estágio inicial de hormônio-sensível para um estágio mais avançado de hormônio-insensível (Bosland, 2000). Esta alteração no fenótipo é geralmente observada após longa administração de bloqueadores da ação androgênica, usados para inibir a progressão do câncer de próstata (Traish *et al.*, 2009).

Estudos *in vitro* tentam mimetizar os estágios de progressão do tumor de próstata, sendo a linhagem celular LNCaP (hormônio-sensível) utilizada para os estudos nos estágios iniciais do câncer de próstata, e a linhagem celular PC3 (hormônio-resistente) nos estágios tardios da doença (Marconett *et al.*, 2010).

Muitos estudos avaliam a capacidade de diversas substâncias, sejam estas sintéticas ou naturais, na inibição da proliferação *in vitro* da célula tumoral, assim como seus mecanismos de citotoxicidade. Grande parte dos compostos que interrompe a proliferação do tumor, *in vivo* ou *in vitro*, induz morte celular (Kepp *et al.*, 2011). As células em cultura devem ser consideradas como mortas, quando atingirem pelo menos um dos seguintes critérios: perda de integridade da membrana

plasmática, fragmentação celular em corpos apoptóticos ou seus fragmentos serem fagocitados por células vizinhas e redução do metabolismo celular (Kroemer *et al.*, 2009).

A técnica mais utilizada para acessar a morte de células em cultura é a marcação das mesmas com moléculas fluorescentes ou coloridas capazes de discriminar células mortas das vivas. Os marcadores vitais por exclusão se caracterizam por não serem capazes de atravessar membranas plasmáticas intactas (como por exemplo, Iodeto de propídio ou DAPI) e são usados na citofluorometria (Kepp *et al.*, 2011). Em relação ao metabolismo celular, a técnica mais utilizada é baseada na ação da luciferase, que utiliza como substrato o ATP (além do oxigênio molecular e luciferina), resultando na emissão de luz, que permite a sensível quantificação de ATP intracelular (Galluzzi *et al.*, 2009). Outros ensaios são capazes de mensurar o metabolismo celular, como o ensaio colorimétrico de redução do MTT ou outros derivados tetrazólicos (Berridge *et al.*, 2005). O nível de adesão de células ao substrato de cultura também é uma técnica utilizada, que serve para avaliar a viabilidade de células aderentes (Shiau *et al.*, 2008).

Dentre os métodos universais para detecção da morte celular por apoptose encontram-se: detecção da fragmentação do DNA, pela técnica do TUNEL, detecção da exposição da fosfatidilserina na membrana, por citometria de fluxo, através da marcação com Anexina-V-fluorocromo, fragmentação internucleossomal do DNA, por eletroforese em gel de agarose, redução do tamanho celular e condensação da cromatina, por coloração nuclear com DAPI ou Hoechst 33342 (Galluzzi et al., 2009; Kepp *et al.*, 2011). Outras técnicas como ensaio de atividade de caspases, determinação do potencial de membrana mitocondrial e avaliação da expressão de genes correlacionados também são amplamente utilizados (Keep O et al., 2011). Embora diversas técnicas tenham sido desenvolvidas, a apoptose não pode ser determinada pelo monitoramento de uma única técnica, principalmente porque alguns marcadores apoptóticos, comumente utilizados, compartilham com outras modalidades de morte celular (Galluzzi et al., 2008).

É importante salientar que o estudo utilizando a técnica de cultura de células é uma etapa inicial da fase pré-clinica dos estudos farmacológicos, sendo necessária a utilização de ensaios *in vivo* para avaliar todos os efeitos farmacocinéticos e farmacodinâmicos da droga, incluindo os efeitos toxicológicos (Pereira, 2007).

4. **TRATAMENTO DO CÂNCER**

O tratamento padrão para os casos de câncer consiste em cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia (incluindo manipulação hormonal). O tipo de tratamento a ser utilizado irá depender do tipo de câncer e no grau de malignidade do mesmo (Gan *et al*., 2009). Cirurgia e radioterapia são indicadas no tratamento da doença localizada e preferencialmente nos estágios iniciais. Estes tipos de tratamento apresentam limitações nos estágios mais avançados da doença (INCA, 2012).

A quimioterapia utiliza-se de compostos químicos que apresentam toxicidade para as células cancerosas. Estes compostos podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação (quadro 2) e quanto à sua ação no ciclo celular, podendo atuar de forma ciclo específico ou ciclo inespecífico, neste último caso, quando não há uma fase do ciclo celular determinada para atuação do fármaco (INCA, 2012).

O tratamento primário para o câncer de próstata é feito pela castração química, através da redução dos níveis circulantes de androgênio (Lynch *et al.*, 2001), visto que as células prostáticas proliferam através da ação do hormônio testosterona. Este exerce sua função após difundir-se na célula e ser convertido, por ação da 5 α-redutase, à diidrotestosterona (DHT), que por sua vez se liga a receptores androgênicos (AR), localizados no núcleo da célula prostática (Sharifi, 2012).

Tabela 2: Classificação dos agentes quimioterápicos e seus mecanismos de ação (Goodman e Gilman, 2012, adapado)

Classe	Mecanismo de ação	Ex.: Quimioterápicos
Agentes citotóxicos	Causam danos ou matam as células	Bleomicina
Agentes alquilantes	Formam ligações covalentes com o DNA	Ciclofosfamida
Antimetabólitos	Interferem nas vias metabólicas de síntese do DNA	5-Fluorouracila
Antibióticos citotóxicos	Impedem a divisão das células	Daunorrubicina
Derivados vegetais	Afetam a função dos microtúbulos	Paclitaxel
Hormônios	Suprimem ou antagonizam a ação de hormônios	Tamoxifeno

Nos estágios tardios do câncer de próstata, os quais não respondem mais ao bloqueio da ação hormonal, utiliza-se o tratamento quimioterápico. Este tipo de tratamento apresenta alta toxicidade para as células normais, causando diversos efeitos colaterais ao paciente, além de promover a seleção de populações celulares com fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR), após uso prolongado desta terapia (Jiang *et al.*, 2004).

Com o objetivo de aumentar as alternativas terapêuticas do câncer, diversos campos da ciência têm tentado buscar compostos que apresentem baixa toxicidade ao organismo e/ou maior eficiência no impedimento/redução/erradicação da progressão do tumor. Neste sentido, os produtos naturais constituem uma rica fonte de compostos bioativos de grande valor para a medicina. Mais da metade dos fármacos disponíveis são compostos naturais ou relacionados a eles, e no caso de drogas antitumorais, esta proporção ultrapassa 60% (Newman e Cragg, 2007; 2010).

4.1 **Pterocarpanos**

Os pterocarpanos são metabólitos secundários pertencentes à família dos flavonoides, especificamente da subclasse dos isoflavonóides, que são superexpressos quando as plantas são submetidas à estresse (Dewich, 1988; Liu *et al.*, 2006). Estes compostos são prevalentes em *Papilonoidae*, subfamília das *Leguminosae* (Dixon e Summer, 2003). A estrutura de um exemplo de pterocarpano é mostrada na figura 5. A estrutura básica é formada por quatro anéis (A, B, C e D), sendo dois aromáticos, e sendo as diferentes estruturas associadas aos anéis A e D as responsáveis pela diversidade farmacológica (Liu *et al.*, 2006).

Muitos trabalhos valorizam os isoflavonóides por possuírem muitas propriedades biológicas associadas à prevenção ao câncer. Alguns mecanismos de ação têm sido identificados, principalmente as atividades estrogênica/anti-estrogênica, antiproliferativa, indutora de apoptose, inibidora do ciclo celular, anti-oxidante e alterações na sinalização intracelular (Birt *et al.*, 2001; Murata *et al.*, 2006; Chrzan e Bradford, 2007). Dentre os pterocarpanos, o composto natural extraído da planta da espécie *Petalostemon purpureus* apresenta atividade antitumoral nas células KB (Huang et al.,1996).

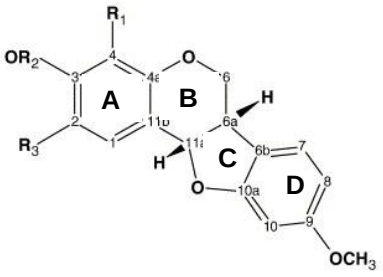

Figura 5: Estrutura do pterocarpano isolado de *Platymiscium floribundum* (Militão *et al.*, 2006).

4.2 **Quinonas e naftoquinonas**

As quinonas pertencem à família dos isoprenóides, compostos encontrados em todos os organismos. Exercem função de carreadores de prótons e elétrons na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, cloroplasto e membranas celulares bacterianas (Wang e Ohnuma, 1999; Cape *et al.*, 2006). Reações de oxidação/redução nas quinonas ocorrem em diferentes proteínas, como por exemplo na NADH quinona redutase (Complexo I), citocromo bc1 oxidoredutase (complexo II) e succinato quinona redutase (complexo III), na mitocôndria (Saraste, 1999). Os xenobióticos de origem quinona podem ser reduzidos na mitocôndria a radicais semi-quinonas, através da ação da citocromo P450 redutase, produto este que pode transferir um elétron para o oxigênio molecular. O ânion superóxido resultante é capaz de iniciar a cascata de eventos do estresse oxidativo (Chen e Hu, 2009)

Estudos indicam a utilização das quinonas no tratamento de diversas enfermidades, dentre elas o câncer, devido à sua atividade antiproliferativa. Daunorrubicina e doxorrubicina são exemplos de quinonas, da classe das antraciclinas/antraquinonas (Zhang et al., 2006), e o lapachol, α-lapachona e β-lapachona são derivados de quinonas (naftoquinonas), todas apresentando propriedades antitumorais (Duvoix *et al.*, 2004; Linard *et al.*, 1975; Mi *et al.*, 2002). As naftoquinonas também são conhecidas por induzirem estresse oxidativo e inibirem a ação de topoisomerases e telomerase (Li *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2005).

4.3 **Composto sintético LQB 118**

A síntese da pterocarpanoquinona LQB 118 resulta do processo de hibridização de um pterocapano, isolado de planta da espécie *Pelatostemon purpureus,* com uma naftoquinona com atividade antitumoral, o lapachol [2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona] (Netto *et al*., 2010). A nova molécula sintetizada apresentou atividade citotóxica significativa sobre linhagens celulares leucêmicas. Apesar do seu mecanismo de ação ainda ser pouco conhecido, o grupo *para-quinona,* presente na estrutura do LQB 118, pode participar de reações redox na

célula, atuando como precursor de espécies reativas de oxigênio e causando, consequentemente, estresse oxidativo. Além disso, o LQB 118 pode ser ativado por reações de redução, *in situ,* gerando conjugados intermediários, os quais são poderosos agentes alquilantes (Netto *et al*., 2010).

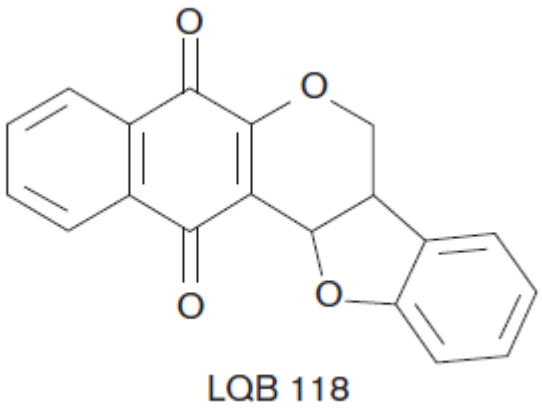

Figura 6: Estrutura da pterocarpanoquinona LQB 118.

A partir do conhecimento de que alguns pterocarpanos e quinonas apresentam ação antitumoral (Duvoix *et al.*, 2004; Linard *et al.*, 1975; Mi *et al.*, 2002; Murata *et al.*, 2006; Chrzan e Bradford, 2007), que o LQB 118 é sintetizado a partir de um pterocarpano e uma quinona, e que o LQB 118 apresenta ação antileucêmica *in vitro*, decidiu-se neste trabalho investigar o efeito cototóxico do LQB 118 sobre algumas linhagens celulares de tumores sólidos de alta prevalência no homem.

5 **OBJETIVOS**

Objetivo geral

- Avaliar a ação antitumoral *in vitro* da pterocarpanoquinona LQB 118.

Objetivos específicos

- Determinar o efeito do LQB 118 sobre as linhagens tumorais de adenocarcinomas de mama (MCF7) e próstata (PC3), e carcinoma de pulmão (A549);

- Comparar os efeitos citotóxicos do LQB 118 sobre a linhagem celular epitelial tumoral e normal;

- Avaliar os efeitos do LQB 118 sobre os seguintes parâmetros da linhagem celular tumoral:

  - Proliferação celular;

  - Morte celular por apoptose.

- Estudar o efeito do LQB 118 sobre a expressão do mRNA de genes envolvidos na proliferação celular, como possível mecanismo de ação.

6 **MATERIAL**

6.1 **Pterocarpanoquinona (LQB 118)**

A síntese orgânica da pterocarpanoquinona, LQB 118, foi realizada no Laboratório de Química Bioorgânica (LQB), no departamento de Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN), situado no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A amostra foi fornecida pelos doutores Paulo Ribeiro Costa, Alcides José Monteiro da Silva e Chiaquip Daher Netto. Uma patente para o composto LQB 118 foi depositada no ano de 2008, devido ao seu alto potencial como agente antitumoral (pedido de patente WO2010054452-A1).

O estoque desta amostra foi solubilizado em dimetil sulfóxido (DMSO) para a concentração de 20 mg/mL e mantido na geladeira, ao abrigo da luz.

6.2 **Linhagem celular**

- Carcinoma de pulmão (A549): Esta linhagem de origem epitelial foi estabelecida por Giard *et al*. 1973, através do explante de tecido pulmonar carcinomatoso de um indivíduo do sexo masculino, caucasiano de 57 anos.
- Adenocarcinoma de mama (MCF7): Linhagem celular provinda de glândulas mamárias de origem epitelial, derivadas de um sítio metastático e obtidas por efusão pleural de um indivíduo do sexo feminino, caucasiano de 69 anos (Soule *et al*., 1973).
- Adenocarcinoma de próstata (PC3): A linhagem prostática de origem epitelial foi iniciada de uma metástase óssea de um adenocarcinoma de próstata grau IV, de um indivíduo caucasiano de 62 anos. Estas células não são responsivas a hormônios androgênios, glicocorticóides e fatores de crescimento epidermal ou fibroblásticos (Kaighn *et al*., 1979).

- RWPE-1: Linhagem celular prostática normal de origem epitelial obtida da zona periférica da próstata, histologicamente normal, de um indivíduo adulto de 54 anos, e transfectadas com uma única cópia do gene HPV-18. Estas células quando estimuladas com hormônios androgênios secretam PSA (Bello *et al.*, 1997).

As informações das linhagens celulares estudadas foram extraídas do manual American Type Culture Collection: The Global Bioresource Center (ATCC). As linhagens celulares MCF7 e A549 foram comparadas do Banco de Células do Rio de Janeiro, RJ, Brasil, e a PC3 e RWPE-1 foram obtidas pelo Instituto Nacional do Câncer do Rio de Janeiro (INCA). As células são mantidas no laboratório criopreservadas.

6.3 **Reagentes**

6.3.1 Cultura de células

- Meio RPMI 1640, Sulfato de estreptomicina, Sigma Chemical Co, EUA.
- Penicilina G potássica, Fontoura-Wyerth, Brasil.
- Soro Fetal Bovino (SFB), Vitrocell, Brasil.

6.3.2 Ensaios de citotoxicidade, proliferação, ciclo celular e apoptose

- Anexina-V, Becton Dickinson (BD) Pharmigen, EUA.
- Azul de tripan, Iodeto de propídio (PI), Triton X-100, RNAse, 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5difenil-tetrazol brometo (MTT), Dodecil sulfato de sódio (SDS), Sigma Chemical Co, EUA.
- Paclitaxel (Bristol Myers Squibb Farmacêutica S.A).

6.3.3 Extração de RNA e RT-PCR

- Dietilpirocarbonato (DEPC), USB, EUA.
- Enzima que hidrolisa DNA (DNAse, 1 U/µL), Promega, EUA.
- Oligonucleotídeos senso e antisenso para ciclinas D1 e B1, c-myc e beta actina, Imprint, Brasil.
- Trealose 1,5 M, Sigma Chemical Co, EUA.
- Mistura de desoxirribonucleotideos (dNTP mix) 10 mM, Trizol, 1st stread buffer (5x), Inibidor de Ribonucleases (10 U/µL), Ditiotreitol (DTT, 0,5 M), SuperScript™ II RNAse H-Reverse Transcriptase (200 U/µL). Oligonucleotídeos Randômicos, Tampão (10x), $MgCl_2$ (50 mM), Taq polymerase platinum (5 U/µL), Invitrogen, EUA.

O quadro 1 mostra as sequências dos oligonucleotídeos estudados: beta-actina e ciclina D1 (Ullmannová *et al.*, 2003), c-Myc (Yokoyama *et al*., 1996) e ciclina B1 (Marconett *et al*., 2010) bem como as temperaturas de anelamento, o número de ciclos e os tamanhos dos produtos de cada gene.

Quadro 1: Sequência dos oligonucleotídeos senso e antisenso, temperatura de anelamento ao cDNA de cada oligonucleotídeo, número ciclos e tamanho do produto em pares de bases.

Oligonucleotídeo	**Sequência (5'-3')**	**T (ºC)**	**Ciclos**	**Produto (pb)**
Ciclina D multisenso	CTGGCCATGAACTACCTGGA	59	30	482
Ciclina D1 antisenso	GTCACACTTGATCACTCTGG			
Ciclina B1 senso	AGGAAGAGCAAGCAGTCAGAC	60	30	178
Ciclina B1 antisenso	GCAGCATCTTCTTGGGCACAC			
c-Myc senso	GTCCTCGGATTCTCTGCTC	60	30	318
c-Myc antisenso	GACTCTGACACTGTCCAACT			

Beta actina senso	TCCTGTGGCATCCACGAAACT	59	30	315
Beta actina antisenso	GAAGCATTTGCGGTGGACGAT			

6.3.4. Fragmentação de DNA

- Fenol equilibrado pH 8,0, USB, EUA.
- Isopropanol, Biosystems, Brasil.
- Proteinase K, Sigma, EUA.
- RNAse, Sigma Chemical Co, EUA.
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), Merck, Alemanha.

6.3.5 Gel em agarose para eletroforese

- Agarose, Sigma Chemical Co, EUA.
- SyBR® Safe DNA Gel Stain (10000x), Invitrogen, EUA.
- *Loading Dye solution* (6x), Fermentas, Brasil.
- GelRed™, Biotium, EUA.

6.3.6 Microscopia de fluorescência – DAPI

- Silano, Azul de Evans, Dilactato de 4’,6-diamidino-2-fenindol (DAPI), Sigma, EUA.

Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

6.4 **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.
- Microcentrífuga Eppendorf, modelo 5418, Eppendorf, Brasil.
- Microcentrífuga refrigerada, modelo 5417 R, Eppendorf, Brasil.
- Cuba horizontal para eletroforese, Life Technologies, Brasil.
- Espectrofotômetro de microplacas universal, modelo µQuant, Bio-Tek Instruments Inc., EUA.
- Espectrofotômetro Nano drop, Thermo Fisher Scientific Inc, EUA.
- Estufa com incubadora de CO_2, Sanyo, EUA.
- Gallios™, modelo A94303, Beckman Coulter, Inc., EUA.
- Microscópio invertido, com contraste de fase, modelo CK2: Olympus, Japão.
- Microscópio de fluorescência Olympus, modelo BX51WI. Sistema de captura TX72, Brasil
- Sistema de captura de imagem, Kodak, EUA
- Software Adobe Photoshop versão 5.0, EUA.
- Software Alfaimage, EUA.
- Software GIMP versão 2.0, EUA.
- Software KC4 versão 3.0 com Power Reports, Bio-Tek Instruments Inc., EUA.
- Software LabImage, EUA.
- Software Summit, EUA.
- Thermo Hybaid PCR Express, EUA.
- Transiluminador modelo TFX-20M, Life Thecnologies (GIBCO), Brasil.

6.5 **Material descartável e vidrarias especiais.**

- Câmara de Neubauer, BOECO, Alemanha.
- Garrafas plásticas para cultura de células, Corning, EUA.
- Falcon, Corning, EUA
- Lâminas (26 x 76 mm) e lâminulas (13 mm), Perfecta, Brasil.
- Placas de cultura de fundo chato com tampa de 96 e 24 poços estéreis, Falcon, Beckton Dickinson Labware, EUA.
- Membranas esterilizantes tipo GSW 02500 e 04700 de 0,22 µm, Millipore Corporation, EUA.
- Tubos tipo eppendorf, Axygen, EUA.

7 **METODOLOGIA**

7.1 **Linhagens celulares e Cultura de células**

As linhagens celulares tumorais de pulmão (A549), mama (MCF7) e próstata (PC3) foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), enquanto a linhagem celular normal de próstata (RWPE-1) foi cultivada em meio de cultura K-SFM suplementado com extrato bovino pituitário (BPE) e fator de crescimento epidermal (EGF), na estufa a 37ºC com 5% CO_2, com passagens regulares de duas a três vezes por semana, utilizando-se do processo de tripsinização (0,25% de tripsina + 0,53 mM EDTA) para soltar as células aderidas na garrafa.

7.2 **Ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT**

Esta é uma técnica colorimétrica e se baseia na redução do sal de tetrazol (amarelo) em cristais de formazan (violeta), por desidrogenases mitocondriais de células viáveis (Mosmann, 1983), determinando, portanto, a atividade redutora mitocondrial (ARM) de tais células.

As células (1 x 10^5/mL) foram cultivadas *overnight* em meio RPMI 1640, suplementado com 10% SFB, em placas de 96 poços de fundo chato, a 37ºC, com 5% de CO_2, para permitir a adesão das células ao substrato. Posteriormente, adicionou-se diferentes concentrações do LQB 118 e Paclitaxel (1 – 10 µg/mL), exceto no controle, que recebeu somente meio de cultura com SFB. As culturas foram realizadas em um volume final de 100 µL, por 24 e 48 h. Duas horas antes do final da incubação, foram adicionados 10 µL/poço de solução de MTT (5 mg/mL em PBS), sendo a placa novamente incubada nas mesmas condições descritas anteriormente, por mais 2 h. Com o objetivo de solubilizar os cristais de formazan resultantes da redução do sal de tetrazol pelas células viáveis, adicionou-se 100 µL

de SDS 10% com HCl 0,01 N (v/v) e incubou-se novamente, as placas na estufa, a 37ºC, *overnight,* para dissolução completa dos cristais de formazan. Então, realizou-se a leitura da absorvância em espectrofotômetro de microplacas a 570 nm.

Foram realizados ensaios controle cultivando-se células com DMSO, não tendo este mostrado efeito citotóxico. A maior concentração de DMSO utilizada nos ensaios foi 0,5%. Também foram realizados ensaios controle constituído de meio de cultura e diferentes concentrações de LQB 118, que resultou em absorvância igual ao meio sozinho, indicando que o LQB 118 não induz absorvância de luz em 570 nm, indicando que, sem as células, não é capaz de reduzir o MTT. Passou-se então a utilizar como branco somente meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB. A média da absorvância do branco foi descontada dos valores de absorvância das amostras. Os ensaios foram feitos em triplicata. A absorvância obtida com as células que não foram submetidas ao tratamento com LQB 118 e/ou Paclitaxel (cultura controle) foi considerada como 100% de viabilidade. Os resultados encontram-se expressos na forma de percentual de viabilidade, em relação ao controle.

$$\text{ARM (\% controle)} = \frac{\text{Absorvância das amostras}}{\text{Média da absorvância do controle}} \times (100)$$

7.3 **Curva de crescimento celular**

Foram realizados experimentos para determinar a capacidade antiproliferativa do LQB 118, comparando-se ao controle positivo (tratamento com Paclitaxel) e o controle negativo (sem tratamento), sobre a linhagem tumoral de próstata. As células (1×10^5/mL) foram cultivadas *overnight* em meio RPMI 1640 suplementadas com 10% de SFB a 37ºC com 5% CO_2, em microplacas de 24 poços, em duplicatas. Após adesão das células, as mesmas receberam LQB 118 ou Paclitaxel (5 µg/mL final) ou somente meio de cultura (controle), em um volume final de 1 mL e foram cultivadas por 72 h. As células vivas foram contadas em câmara de Neubauer, por microscopia de luz, utilizando-se solução de azul de tripan para exclusão das células mortas, em diferentes tempos de cultura (12, 24, 36, 48 e 72 h).

7.4 **Avaliação do Ciclo celular**

As células PC3 (1 x 10^5/mL) foram cultivadas *overnight* em meio RPMI 1640 com 10% SFB, em garrafas de cultura de 75 cm^2, a 37ºC, com 5% de CO_2. Posteriormente, adicionou-se às culturas, LQB 118 ou Paclitaxel (5 µg/mL final) ou somente meio de cultura, completando o volume para 20 mL/garrafa. Após 48 h de incubação, as células foram soltas por ação da tripsina com EDTA, e realizou-se a contagem do número de células vivas e mortas, separadamente, em câmara de Neubauer. Alíquotas de suspensão celular de cada condição estudada, contendo 1 x 10^6 células, foram centrifugadas (400 x g, 5 minutos) e o precipitado suspenso em 500 µL de tampão citrato (43 mM, pH 8,2), contendo o fluorocromo PI (50 µg/mL) e Triton X-100 (0,3%), o que possibilita a permeabilização das células, facilitando a marcação dos ácidos nucleicos o PI. As células permaneceram incubadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 15 minutos. Logo após esta incubação, adicionou-se 500 µL de solução de enzima que hidrolisa RNA (RNAse) 100 µg/mL (em tampão citrato 43 mM e pH 8,2), garantindo, com isso, a marcação exclusiva de DNA, seguindo a incubação por mais 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorrido este tempo, o núcleo das células foram analisados por citometria de fluxo (laser de argônio 488 nm), sendo adquiridos 100.000 eventos de cada amostra. Os núcleos foram analisados inicialmente pelo tamanho (Forward Scatter –FSC) e intensidade de fluorescência ao PI (detectado pelo canal FL2, que permite a captação da fluorescência na faixa de 585 $\pm$ 15 nm), através do software Summit 5.0. Restos celulares e agregados de núcleos foram excluídos da análise pela delimitação de regiões nos citogramas FSC x FL2-A. (Dalmau *et al*., 1999).

7.5 **Avaliação do nível de apoptose**

O nível de apoptose foi determinado neste trabalho por três técnicas distintas; citometria de fluxo, onde foi avaliada a externalização do fosfolipídio fosfatidilserina na membrana plasmática. Eletroforese em gel de agarose, para visualizar a

fragmentação do DNA, mediado por endonucleases, durante o processo apoptótico e por fim, a microscopia de fluorescência, para avaliar a condensação da cromatina.

7.5.1 Anexina-V

A anexina-V é um anticorpo monoclonal, conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), que apresenta especificidade ao fosfolipídio de membrana fosfatidilserina. Durante o processo apoptótico a fosfatidilserina é externalizada com o objetivo de sinalizar a ocorrência de apoptose. Para este ensaio as células foram marcadas com o anticorpo segundo o protocolo descrito pela BD Pharmigen™.

Após o cultivo das células PC3, nas mesmas condições utilizadas no estudo do ciclo celular, as células (5×10^5) foram centrifugadas (400 x g, 5 minutos) e lavadas com solução contendo 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 e 1,5 mM KH_2PO_4 (PBS), garantindo a retirada de todo meio de cultura. Posteriormente, as células foram suspensas em 500 µL de tampão de ligação (Hepes 10 mM NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM $CaCl_2$). Uma alíquota de 100 µL (1×10^5 células) de cada condição de cultura foi transferida para tubo de citometria (capacidade de 5 mL), adicionou-se 5 µL de Anexina-V/FIT-C e 5 µL de PI (100 µg/mL), misturou-se gentilmente e incubou-se as células ao abrigo da luz, no gelo (0ºC), por 15 minutos. Decorrido este tempo, adicionou-se 400 µL/amostra de tampão de ligação e a aquisição dos dados foi realizada no prazo de 1 h, no citometro de fluxo. A análise dos dados foi feita pelo software Summit 5.0, para determinar o tamanho celular (FSC), granulosidade (Side Scatter – SSC), fluorescência da Anexina V/FIT-C (canal FL1, faixa de 535 $\pm$ 15 nm), enquanto a fluorescência do PI foi detectada pelo canal FL2, faixa de 570 $\pm$ 10 nm).

7.5.2 Fragmentação de DNA

Com o objetivo de avaliar a indução da morte celular por apoptose induzida pelo LQB 118 e/ou Paclitaxel, realizou-se a análise dos fragmentos de DNA múltiplos de 200 pares de bases (formados por ação de endonucleases), padrão característico do processo apoptótico. Para tal, as células da linhagem PC3 (1 x 10^5/mL) foram cultivadas *overnight* em meio RPMI 1640 com 10% SFB, em garrafas de cultura de 75 cm^2, a 37ºC, com 5% de CO_2. Após a adesão celular, LQB 118 ou Paclitaxel (5 µg/mL) foram adicionados às garrafas para um volume final de 20 mL/garrafa. Decorridos 48 h de tratamento, as células foram submetidas ao processo de tripsinização, com posterior contagem de células totais (vivas e mortas, separadamente), em câmara de Neubauer, por microscopia de luz, utilizando o corante vital azul de tripan. Alíquotas de células (1 x 10^6) foram lavadas com PBS, centrifugadas (3000 x g, 5 minutos) e o precipitado de cada amostra suspenso em 100 µL de tampão de lise (0,4% SDS; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 0,5 mg/mL de Proteinase K) e incubado *overnight* a 50ºC para expor o conteúdo celular. Em seguida, adicionou-se 10 µL de RNAse A (5 g/L) e incubou-se as amostras por 1 h a 50ºC. A temperatura foi elevada para 70ºC, para inativar a ação enzimática da RNAse A e procedeu-se à extração química do ácido nucléico, com 100 µL de fenol-clorofórmio-isopropanol (25:24:1). Com o processo de centrifugação (12.000 x g, 15 minutos a 4ºC) formam-se duas fases, separadas por uma interface branca. A parte superior, contendo o DNA, foi transferida para um tubo novo e duas vezes esse volume foi adicionado de etanol absoluto gelado. Incubou-se por 2 h a -20ºC e novamente centrifugou-se as amostras (12.000 x g, 20 minutos a 4ºC), retirou-se todo o sobrenadante, suspendendo o precipitado em 20 µL de tampão Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). A análise dos fragmentos de DNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1,8%. A corrida foi realizada em tampão de corrida Tris base 90 mM; ácido bórico 90 mM; 20 mM EDTA 0,1 M, pH 8,0 (TBE 1x), por 4 h a12V (Li *et al*., 2004).

7.5.3 Marcação nuclear com DAPI

A condensação do núcleo das células é um evento importante durante o processo apoptótico e para visualização deste fenômeno utilizou-se a marcação do núcleo com DAPI. As células da linhagem tumoral de próstata (1 x 10^5/mL) foram cultivadas *overnight* em placa de 24 poços sobre lamínulas silanizadas, em meio RPMI 1640 com 10 % SFB, a 37ºC, com 5% de CO_2. Após a adesão celular, adicionou-se LQB 118 ou Paclitaxel (5 µg/mL) e as células foram cultivadas por 24 e 48 h sob as mesmas condições já descritas. Decorrido esse tempo, o meio foi totalmente retirado, procedeu-se à lavagem das células (duas vezes) com PBS e posterior adição de 500 µL de metanol absoluto gelado, para permeabilização das células. Estas foram lavadas com PBS contendo 5% SFB (3,5 e 7 minutos). As lamínulas foram retiradas dos poços, lavadas com NaCl 0,9% por 5 minutos e coradas com 15 µL de DAPI (0,1 µg/mL) por 5 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, seguido de três lavagens com NaCl 0,9%, por 3, 5 e 7 minutos, respectivamente. Realizou-se a marcação do citoplasma incubando as lamínulas com 15 µL de Azul de Evans (0,001% em PBS), por 5 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, seguida de lavagem com NaCl 0,9%. As lâminas foram montadas com as lamínulas, utilizando-se 10 µL de glicerol 90% em PBS e observadas à microscopia de fluorescência. O DAPI sofre excitação pelo comprimento de onda 358 nm e emite fluorescência na faixa de 461 nm. O filtro utilizado para visualização da fluorescência do DAPI foi o 1 e para o Azul de Evans o 3.

As imagens foram adquiridas pelo software DP2-BSW, Olympus e as imagens foram sobrepostas através do software GIMP 2.0. Os experimentos foram realizados em duplicatas.

7.6 **Análise da expressão de RNA mensageiro por RT-PCR**

7.6.1 Cultura de células

As células PC3 (1 x 10^5/mL) foram cultivadas *overnight* em meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB, em garrafas de cultura de 75 cm² a 37ºC com 5% de CO_2 para adesão. Posteriormente, adicionou-se o LQB 118 ou Paclitaxel (10 µg/mL) às culturas, em um volume final de 20 mL/garrafa e incubou-se sob as mesmas condições, por diferentes tempos (12, 24 e 48 h). Após cada tempo de cultura, as células totais foram contadas em câmara de Neubauer e alíquotas contendo 2 x 10^6 células foram retiradas de cada condição de cultura para extração do RNA.

7.6.2 Extração do RNA

A extração foi realizada utilizando-se Trizol, segundo as recomendações do fabricante (Invitrogen). Após centrifugação (1000 x g, 3 minutos), o precipitado contendo aproximadamente 2 x 10^6 células foi suspenso em 1 mL de Trizol seguido de homogeneização e incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio gelado por mililitro de Trizol utilizado, as amostras foram misturadas gentilmente, incubadas por 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas por 15 minutos a 12.000 x g, 4ºC. A fase aquosa (parte superior), contendo o RNA total, foi transferida para um tubo novo (livre de RNAse), ao qual foram adicionados 500 µL de isopropanol por mililitro de Trizol utilizado. As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e em seguida centrifugadas (12.000 x g, 10 minutos, 4ºC). O sobrenadante foi desprezado com pipeta, sendo o precipitado lavado com 1 mL de etanol 75% em água deionizada tratada com DEPC 0,1% (inibidor da RNAse). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (12.000 x g, 5 minutos, 4ºC). O sobrenadante foi desprezado e deixou-se o precipitado secar por aproximadamente 10 minutos, o qual foi suspenso em 20 µL de água deionizada tratada com DEPC.

7.6.3 Pureza e quantificação do RNA

A absorvância da solução de RNA (2 µL) foi determinada em espectrofotômetro automático em dois comprimentos de onda (ƛ); 260 e 280 nm. A razão entre o primeiro e o segundo ƛ indica a pureza do ácido nucleico extraído. Quanto menor a relação maior a contaminação com proteínas. Essa relação deve estar entre 1,8 e 2,0 para que o ácido nucléico extraído esteja em um nível aceitável de purificação. A quantificação do RNA é expressa em µg/µL, considerando uma unidade de absorvância em 260 nm igual a 40 µg de ácido nucléico/mL.

7.6.4 Tratamento da amostra de RNA com DNAse

Após a quantificação do RNA foi feito o tratamento com DNAse (de acordo com as instruções de fabricação – Promega), para aumentar o seu grau de pureza, eliminando das amostras possíveis contaminações com DNA genômico. O RNA (10 e 20 µg) foi incubado com 2 µL de DNAse (1 U/µL), 5 µL de tampão Tris-HCl 400 mM, pH 8,0 contendo MgSO4 100 mM e CaCl2 10 mM, e o volume foi completado para 50 µL com água deionizada tratada com DEPC. As amostras de RNA foram incubadas à 37ºC por 30 minutos, e posteriormente elevou-se o volume de cada amostra para 100 µL, com água deionizada tratada com DEPC. Em seguida, todos os passos da extração do RNA foram repetidos, porém utilizando somente 200 µL de Trizol. O protocolo seguiu utilizando quantidades proporcionais dos demais reagentes.

7.6.5 Determinação da integridade do RNA

Para determinar a integridade do RNA fez-se uma eletroforese em gel de agarose a 1%. O gel foi preparado solubilizando, por aquecimento, 0,25 g de agarose em 25 mL de tampão SB 1x (NaOH 0,01 M, ácido bórico 0,0625, pH 8,0). A solução foi colocada na cuba (previamente esterilizada por 30 minutos com água oxigenada 3% em água deionizada e autoclavada) para gelificar. Acrescentou-se à cuba 250 mL de tampão SB. As amostras, previamente preparadas, contendo uma quantidade fixa de RNA (1,5 µg), foram aplicadas no gel em um volume de 15 µL. As amostras foram preparadas incubando 1 µL de tampão SB 5x concentrado, 5 µL de formamida e 2 µL de formaldeído à 65ºC, por 15 minutos (volume final de 12 µL). Posteriormente, a amostra foi imediatamente transferida para o gelo e adicionados 2 µL de tampão de amostra. A eletroforese foi desenvolvida em câmara fechada a 80V por aproximadamente 1 h. O gel foi corado com GelRed™ (1:10.000) e o RNA foi visualizado em transiluminador, sob a luz UV, e a imagem armazenada por sistema de captura de imagem automatizado. A qualidade das amostras de RNA foi determinada pela relação de bandas de RNA ribossomal 28S, 18 S e 5,8S (Gonzaga *et al.*, 2012).

7.6.6 Reação de transcrição reversa (RT)

Este procedimento foi dividido em duas etapas, de acordo com as instruções do fabricante, Invitrogen. A primeira consistiu em aquecer, por 5 minutos a 65ºC, 100 ng de Random primers (contendo seis pares de bases) para cada 1 µg de RNA (1 a 3 µg de RNA por amostra), completando-se com água deionizada tratada com DEPC para o volume final de 8 µL. Após o aquecimento, as amostras foram transferidas imediatamente para o gelo.

A segunda etapa consistiu em adicionar 21 µL de uma mistura de reagentes (12 µL de trealose 1,5 M, 6 µL de 1st stread buffer 5x, 1 µL de RNAsina, 1 µL de ditiotreitol 0,5 M e 1 µL de mistura de dNTP 10 mM) a cada amostra da primeira etapa e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Após um rápido pulso em

microcentrífuga, as amostras foram incubadas a 37ºC por 2 minutos, e em seguida, foi adicionado 1 µL da enzima transcriptase reversa (MMLV) em cada tubo, seguindo a incubação por mais 1 h. Após este tempo, os tubos foram incubadas a 70ºC por 15 minutos para inativação da enzima. Este procedimento permitiu a construção de um DNA complementar (cDNA) a partir dos mRNA transcritos em cada condição. As amostras foram armazenadas a -20ºC.

7.6.7 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

Para realizar a PCR, misturas de reagentes específicos para cada gene a ser analisado foram preparadas contendo: cDNA (quantidade variável para cada gene), 2,5 µL tampão da enzima 10x, 0,75 µL $MgCl_2$ 50 mM, 0,5 µL de mistura de desoxirribonucleotídeos - dNTP *mix* 10 mM, 2 µL de oligonucleotídeos senso e antisenso (40 ng/µL) para cada gene, 0,1 µL da Taq polimerase (5 U/µL) e água deionizada tratada com DEPC autoclavada para um volume final de 25 µL. Após aliquotar a mistura (25 µL/tubo), levou-se os tubos para centrífuga para um leve pulso e depois para o termociclador. As amostras foram aquecidas primeiramente a 95ºC por 5 minutos. Depois disso, programou-se um determinado número de ciclos nas seguintes condições: temperatura de desnaturação de 94ºC por 30 segundos, temperatura de anelamento de cada par de oligonucleotídeos por 30 segundos e temperatura de extensão de 72ºC por 1 minuto. Ao final do número de ciclos, as amostras foram submetidas novamente a 72ºC por 10 minutos. Como controle positivo da expressão gênica utilizou-se o gene constitutivo da Beta actina (Pereira *et al*., 2011).

7.6.8 Análise dos produtos da PCR

O padrão de expressão de cada gene estudado foi observado por eletroforese horizontal (gel de agarose) dos produtos da PCR. A agarose (0,375 g) foi dissolvida por aquecimento em 25 mL de tampão SB. Foi adicionado 1 µL de SYBR® Safe

(10.000x) à agarose ainda líquida e colocou-se a solução na cuba para gelificar. Foi adicionado 1 µL de *Loading dye solution* para cada 9 µL de amostra de PCR e o volume de cada amostra foi aplicado no gel. A corrida foi realizada em câmara fechada em 90V, por aproximadamente 30 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados em transiluminador, sob luz UV e a imagem armazenada por sistema de captura de imagem automatizado. A densitometria das bandas foi determinada pelo programa LabImage (Pereira *et al*., 2011).

7.7 **Análise estatística**

A análise da significância das diferenças entre duas amostras foi realizada pelo teste t *Student,* utilizando o software GraphPad Prism 5.0. As diferenças com $p<0,05$ foram consideradas significativas.

.

8 **RESULTADOS**

8.1 **Ensaio de citotoxicidade**

A fim de demonstrar o efeito citotóxico do LQB 118 sobre linhagens celulares de tumores sólidos de maior prevalência no mundo, determinou-se a atividade redutora mitocondrial (ARM) das linhagens de carcinoma de pulmão (A549), adenocarcinoma de mama (MCF7) e adenocarcinoma de próstata (PC3), através de ensaio colorimétrico, utilizando como substrato o sal tretazólico MTT, nos tempos de 24 h (figura 7A) e 48 h (figura 7B) de incubação com a droga. O LQB 118, na menor concentração testada (1 µg/mL), apresentou inibição de 22,8 $\pm$ 7% na ARM das células PC3 ($p < 0,01$) após 48 h de incubação (figura 7B), comparado à cultura controle. A diferença de inibição da viabilidade das células PC3 e MCF7, induzida pelo LQB 118, foi de 42,9 $\pm$ 7,8%, sendo as células PC3 mais sensíveis que a MCF7 (figura 7B). Quando a concentração do LQB 118 aumentou para 2,5 µg/mL, este promoveu inibição de 42 $\pm$ 11% ($p< 0,001$) na ARM das células MCF7 e inibição de 78 $\pm$ 5,7% nas células PC3, em relação ao controle, no tempo de 24 h (figura 7A). Uma diferença de 61,8 $\pm$ 5,7% de inibição na ARM entre as células PC3 e MCF7, neste mesmo tempo de incubação (figura 7A), confirmam a maior sensibilidade das células tumorais de próstata ao LQB 118. Este efeito inibitório foi intensificado no tempo de 48 h (figura 7B) tanto para as células MCF7 (76 $\pm$ 5,5%) quanto para as PC3 (79 $\pm$ 1%), em relação ao controle, não permitindo mais verificar a diferença de sensibilidade entre as duas linhagens tumorais. Na concentração de 5 µg/mL de LQB 118 houve intenso efeito inibitório ($p < 0,001$) da ARM nas células MCF7 (94 $\pm$ 2,3% e 92 $\pm$ 2,2%) e nas células PC3 (94% $\pm$ 2% e 92,3 $\pm$ 3,2%), nos tempos de 24 h (figura 7A) e 48 h (figura 7B), respectivamente, enquanto com as células A549 houve apenas uma inibição (23 $\pm$ 15% e 35 $\pm$ 4%), respectivamente.

A ação citotóxica do DMSO (solvente utilizado para solubilizar e esterilizar o LQB 118) sobre as linhagens tumorais também foi investigada, utilizando-se o ensaio do MTT (determinação da ARM), nos tempos de 24 e 48 h. O DMSO não apresentou efeito citotóxico na faixa de concentração testada (0,005 a 0,5%), sendo

0,1% a maior concentração final utilizada nos experimentos. Também não foi observada, por microscopia de luz, qualquer alteração morfológica nas células, após incubação com o DMSO (dados não mostrados).

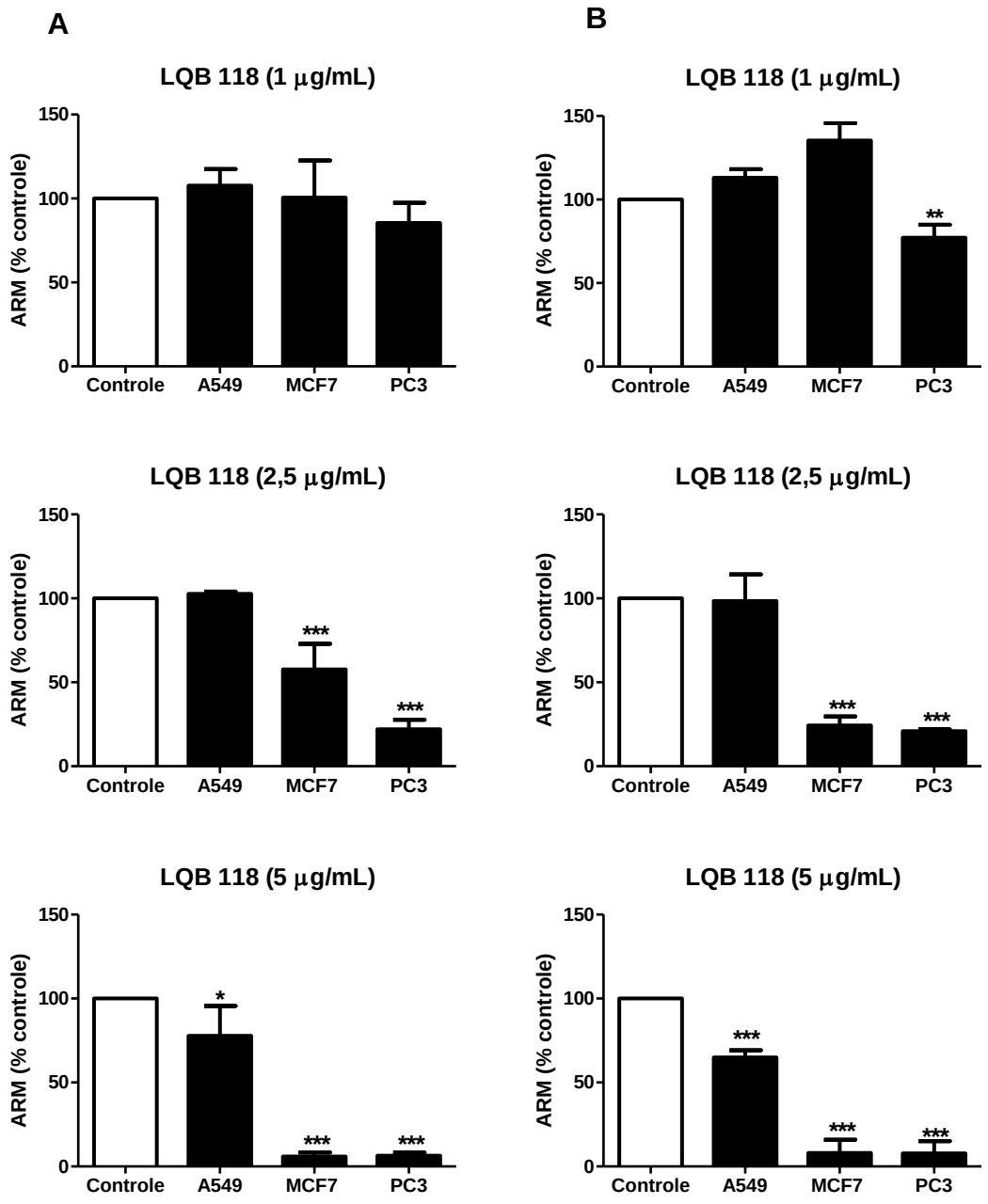

Figura 7: Efeito citotóxico do LQB 118 sobre a ARM de diferentes linhagens tumorais. (A) 24 h e (B) 48 h de tratamento. As células (1 x 10^5/mL) foram incubadas na ausência (controle) ou presença de diferentes concentrações de LQB 118 (1, 2,5 e 5 μg/mL). Os resultados mostram média ± desvio padrão de três experimentos independentes, com triplicatas. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, em relação ao controle (teste *t* de Student).

Devido ao fato do LQB 118 ter apresentado efeito citotóxico significativo com concentrações menores sobre um modelo tumoral de próstata *in vitro* em estágio avançado (células PC3, não responsivas a hormônio), em relação ao tumor de mama (células MCF7, responsivas a hormônio), seguiu-se o estudo do LQB 118 com a linhagem celular PC3. Antes de avaliar o mecanismo de ação desta molécula, o efeito citotóxico da mesma foi comparado a um dos tradicionais quimioterápicos utilizados no tratamento do tumor de próstata, o Paclitaxel, nos tempos de 24 e 48 h.

É possível observar na figura 8, que no tempo de 24 h (figura 8A) as células PC3 tratadas com o LQB 118 apresentaram ARM semelhante à apresentada pelas células tratadas com o Paclitaxel, com exceção da concentração de 2,5 µg/mL, cuja inibição foi aproximadamente 2,5 vezes maior que a do Paclitaxel. Com 48 h (figura 8B), o Paclitaxel foi mais potente na inibição da ARM que o LQB 118 na concentração de 1 µg/mL, o inverso acontecendo com 2,5 µg/mL. A construção das curvas com diferentes concentrações de LQB 118 e Paclitaxel permitiram determinar a concentração que inibe a ARM em 50% (IC_{50}) das duas substâncias sobre esta linhagem celular para os tempos de 24 h (1,85 µg/mL e 3,1 µg/mL) e 48 h (1,7 µg/mL e 2,1 µg/mL, respectivamente).

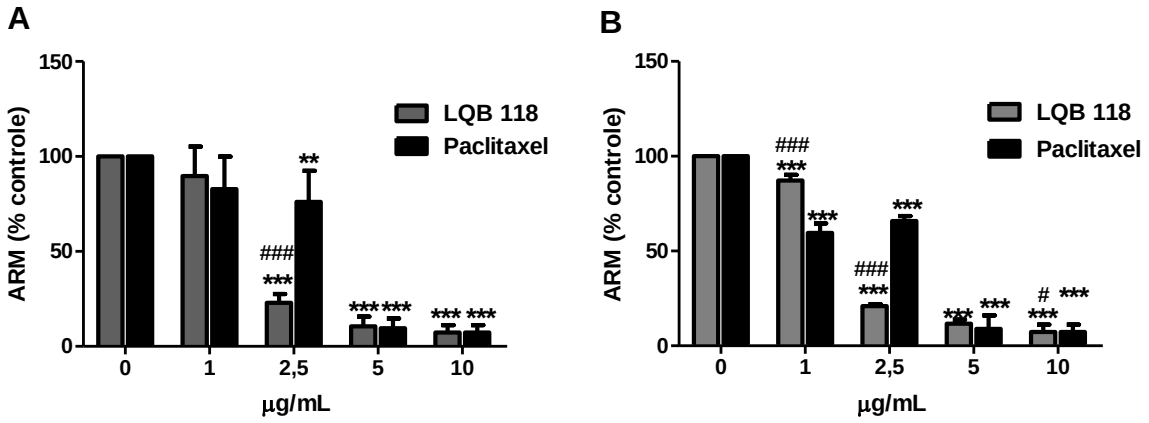

Figura 8: Comparação do efeito citotóxico do LQB 118 com o do quimioterápico Paclitaxel sobre a linhagem celular PC3. (A) 24 h e (B) 48 h de tratamento. Os resultados mostram média ± desvio padrão de três experimentos independentes, com triplicatas. **p<0,01 e ***p<0,001, em relação ao controle e $^{\#}$p<0,05 $^{\#\#\#}$p<0,001, em comparação ao Paclitaxel (teste *t* de *Student*).

A fim de determinar a citotoxicidade do LQB 118 sobre células de tecido normal, incubou-se células imortalizadas de origem epitelial de próstata (linhagem celular RWPE-1) na ausência ou presença de LQB 118 ou Paclitaxel, por 24 e 48 h.

A figura 9A mostra que ambos os compostos apresentaram citotoxicidade sobre as células normais no tempo de 24 h, entretanto o Paclitaxel, quimioterápico usado tradicionalmente no tratamento deste e de outros tipos de câncer, apresentou citotoxicidade (18,81 ± 1,4%) em uma concentração 100 vezes menor (0,01 µg/mL) do que a do LQB 118 (1 µg/mL), a qual inibiu a ARM em 30,4 ± 6,3%. Quando as células RWPE-1 foram tratadas com os mesmos compostos por 48 h (figura 9B) o efeito citotóxico de ambos foi potencializado, novamente com o Paclitaxel promovendo inibição mais alta da ARM (62 ± 5,6%, $p < 0,001$) com 0,01 µg/mL, concentração 100 vezes menor que a do LQB 118 (1 µg/mL), a qual inibiu apenas 31 ± 3% ($p < 0,001$) da ARM das células RWPE-1, quando comparado à cultura controle.

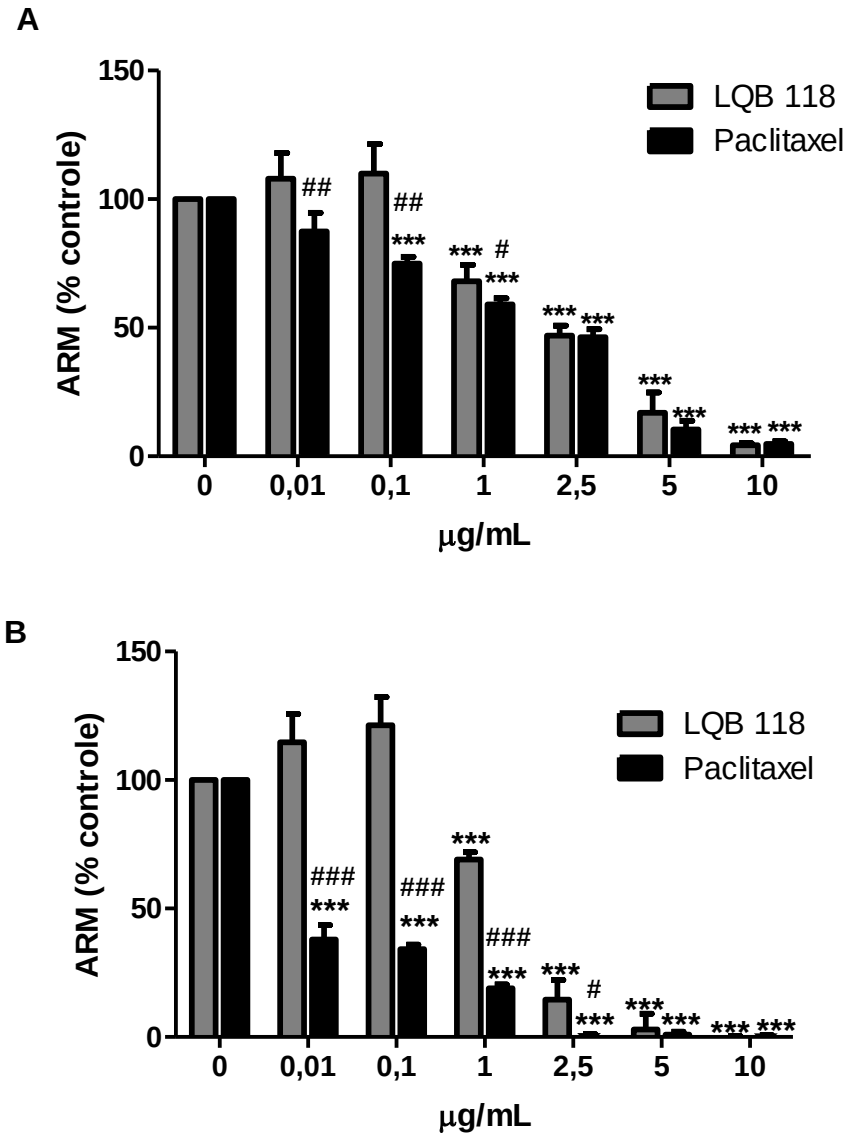

Figura 9: Comparação do efeito citotóxico do LQB 118 com o do quimioterápico Paclitaxel sobre células prostáticas normais (RWPE-1). (A) 24 h e (B) 48 h de tratamento. Células (1 x 10^5/mL) foram cultivadas na ausência (controle) ou na presença de LQB 118 ou Paclitaxel. Os resultados mostram média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes com triplicatas. $^{***}p<0,001$, em relação ao controle e $^{\#}p<0,05$, $^{\#\#}p<0,01$, $^{\#\#\#}p<0,001$, em relação ao LQB 118 (teste *t* de *Student*).

Comparando-se os efeitos citotóxicos do LQB 118 e Paclitaxel entre as linhagens tumorais PC3 e normais RWPE-1 (figura 10), nota-se que na concentração de 1 µg/mL, no tempo de 24 horas, o LQB 118 inibiu a ARM somente das células RWPE-1, representando uma diferença ($p<0,05$) entre as linhagens de 21,7 $\pm$ 6,4% (figura 10A). Quando a concentração do LQB 118 foi aumentada 2,5 vezes, observou-se inibição da ARM sobre as duas linhagens celulares, entretanto as células PC3 foram mais sensíveis aos efeitos citotóxicos, quando comparadas às células RWPE-1, mostrando diferença ($p<0,001$) de 24 $\pm$ 4,7% (figura 10A). Nas maiores concentrações testadas neste tempo não foi possível mais observar diferença do efeito citotóxico do LQB 118 entre as linhagens celulares. Quando o tempo de incubação de ambas as células foi aumentado para 48 h, na presença do LQB 118 (figura 10B) observou-se inibição da ARM de ambas as células em todas as concentrações testadas, entretanto, na menor concentração (1 µg/mL) o perfil observado no tempo anterior foi invertido, sendo as células RWPE-1 mais sensíveis ($p<0,001$) ao efeito citotóxico (18 $\pm$ 3%) do LQB 118, quando comparadas as células PC3. Aumentando-se a concentração do LQB 118 só foi possível observar diferença significativa nas concentrações de 5 e 10 µg/mL, sendo as células RWPE-1 mais sensíveis (8,8 $\pm$ 1% e 7,2 + 0,3%, respectivamente) quando comparada às células PC3 (figura 10B).

As linhagens celulares incubadas com Paclitaxel por 24 h (figura 10C) mostram uma tendência deste composto em apresentar maior efeito citotóxico sobre as células RWPE-1, quando comparada às células PC3 (figura 10C), entretanto somente na concentração de 2,5 µg/mL este efeito foi significativo ($p<0,05$), representando uma diferença de 29,7 $\pm$ 3,1% (figura 10C) entre as linhagens. Quando o tempo de incubação com Paclitaxel aumentou para 48 h (figura 10D), as células RWPE-1 foram mais sensíveis aos efeitos citotóxicos em todas as concentrações testadas. A partir da menor concentração (1 µg/mL) a diferença na

inibição da ARM entre linhagens celulares foi de 40,7 ± 1,4% (figura 10D), alcançando 65,9 ± 0,7% na concentração de 2,5 µg/mL, reduzindo a diferença de inibição da ARM para 8 ± 1,1% e 7 ± 0,7%, respectivamente nas concentrações de 5 e 10 µg/mL de Paclitaxel (figura 10D).

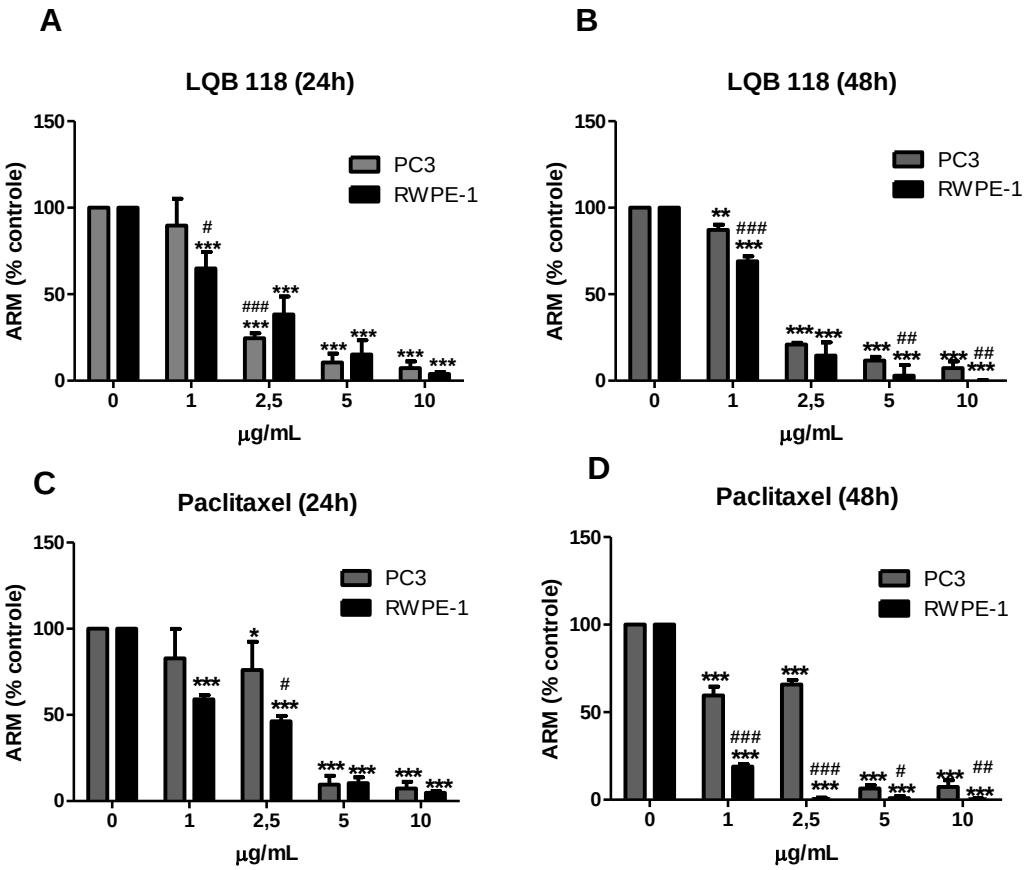

Figura 10: Comparação do efeito citotóxico do LQB 118 e do Paclitaxel sobre as células epiteliais prostáticas tumoral (PC3) e normal (RWPE-1). (A) 24 h e (B) 48 h incubadas com LQB 118, e (C) 24 h e (D) 48 h incubadas com Paclitaxel. Células (1 x 10^5/mL) foram cultivadas na ausência (controle) ou na presença de LQB 118 ou Paclitaxel. Os resultados mostram média ± desvio padrão de três experimentos independentes com triplicatas. ***p<0,001, em relação ao controle e $^{\#}$p<0,05, $^{\#\#}$p<0,01, $^{\#\#\#}$p<0,001, em relação ao LQB 118 (teste *t* de *Student*).

8.2 **Curva de crescimento celular**

Diante da redução da ARM induzida pelo LQB 118 sobre a linhagem tumoral de próstata PC3, decidimos avaliar o efeito deste composto na proliferação destas

células. Para isto, acompanhou-se o número de células PC3 na ausência (controle) ou presença do LQB 118 ou Paclitaxel (5 µg/mL) ao longo do tempo de cultura. Nota-se que tanto o LQB 118 quanto o Paclitaxel promoveram inibição da proliferação celular nas primeiras 12 h de tratamento e a partir deste tempo, ambos os compostos apresentaram um número de células menor do que no início da cultura, sugerindo morte das células PC3. Não houve diferença significativa, ao longo do tempo, entre o LQB 118 e Paclitaxel. Na figura 11 observam-se percentuais de inibição do crescimento celular de 35,5 ± 0,3%, 77,4 ± 0,1%, 82 ± 0,2%, 89,2 ± 0,1%, 92,2 ± 0,1% para o LQB 118 e de 48,8 ± 0,3%, 64,6 ± 0,3%, 67,7 ± 0,1%, 80,7 ± 0,2%, 87,8 ± 0,1% para o Paclitaxel, em relação à cultura controle de cada respectivo tempo de de cultura (12, 24, 36, 48 e 72 h, respectivamente).

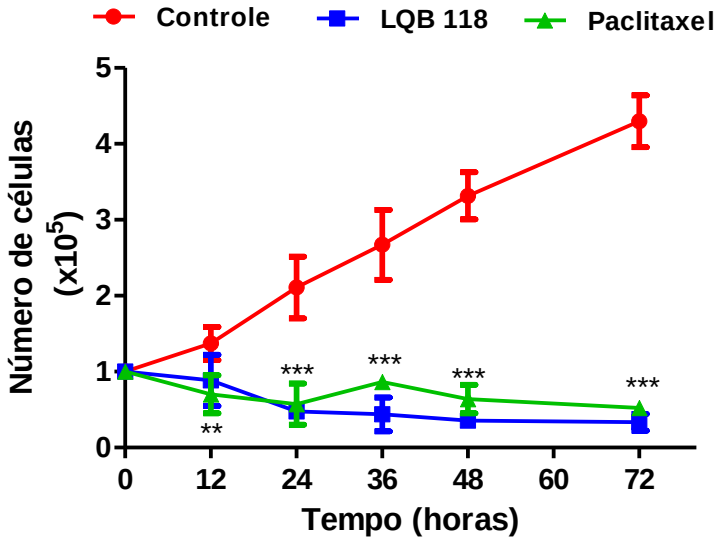

Figura 11: Efeito do LQB 118 e Paclitaxel na curva de crescimento das células PC3. As células ($1x10^5$/mL) foram incubadas na ausência e presença de LBQ 118 ou Paclitaxel (ambos a 5 µg/mL). Após os tempos de 12, 24, 36, 48 e 72 h de incubação as células viáveis foram contadas, utilizando solução de azul de tripan. Os resultados expressam média ± desvio padrão de três experimentos independentes com duplicata. **p<0,01 e ***p<0,001 (para ambos os compostos testados), em relação ao controle de cada respectivo tempo de cultura (teste *t* de *Student*).

8.3 **Ciclo celular**

Após verificação de que o LQB 118 inibe a proliferação da linhagem celular tumoral PC3, decidiu-se avaliar o efeito deste composto em cada fase do ciclo celular nestas células.

O ciclo celular das células PC3 foi avaliado por citometria de fluxo, após incubação por 48 h das células na ausência ou presença de LQB 118 (5 µg/mL), sendo o Paclitaxel (5 µg/mL) utilizado como controle positivo. A figura 12A compara o número absoluto de células vivas após o tratamento com LQB 118 ou Paclitaxel com o de células não tratadas (controle). Tanto o LQB 118, quanto o Paclitaxel promoveram inibição do crescimento celular de 67 $\pm$ 0,02%. Na figura 12B os histogramas mostram a distribuição das células, de um experimento representativo, em função da intensidade de fluorescência do PI, que é proporcional ao conteúdo de DNA. No histograma visualiza-se um pico à esquerda, que representa a intensidade de fluorescência correspondente ao DNA de células contendo cromossomos equivalentes a 2n, ou seja, a fase G_1 do ciclo celular (antes da duplicação dos cromossomos). A região intermediária representa as células na fase S, visto que apresentam eventos com quantidade diferenciada de DNA, maior que 2n e menor que 4n. Por fim, o pico à direita representa a fase G_2/M, com intensidade de fluorescência ainda maior, no qual o DNA já está todo duplicado (4n).

Ao comparar o perfil do ciclo celular da cultura controle com o perfil das células tratadas com LQB 118 (figura 12B), observa-se nestas últimas, redução de 46% no número de células na fase G_1, com consequente aumento de 132,9% e 88,8% nas fases S e G_2/M, respectivamente. Por sua vez, o controle positivo, Paclitaxel (figura 12B) promoveu redução de 86,7% no número de células na fase G_1, enquanto nas fases S e G_2/M observam-se aumentos de 32,9% e 350,8%, respectivamente, em relação ao controle.

A figura 13 mostra o percentual médio (quatro experimentos independentes) de células PC3 em cada fase do ciclo celular após 48 h de incubação com LQB 118 ou Paclitaxel (5 µg/mL). Observa-se que o LQB 118 induziu redução significativa (49 $\pm$ 3,8%) do número de células na fase G_1, assim como aumentos significativos na fase S (95,3 $\pm$ 6,5%) e G_2/M (78,6 $\pm$ 5,7%), sugerindo interrupção do ciclo celular nestas últimas fases. Por outro lado, o Paclitaxel mostrou grande aumento no

número de células PC3 na fase G_2/M (275,6 ± 6,6%), além da redução (87,5 ± 1,8%) na fase G_1.

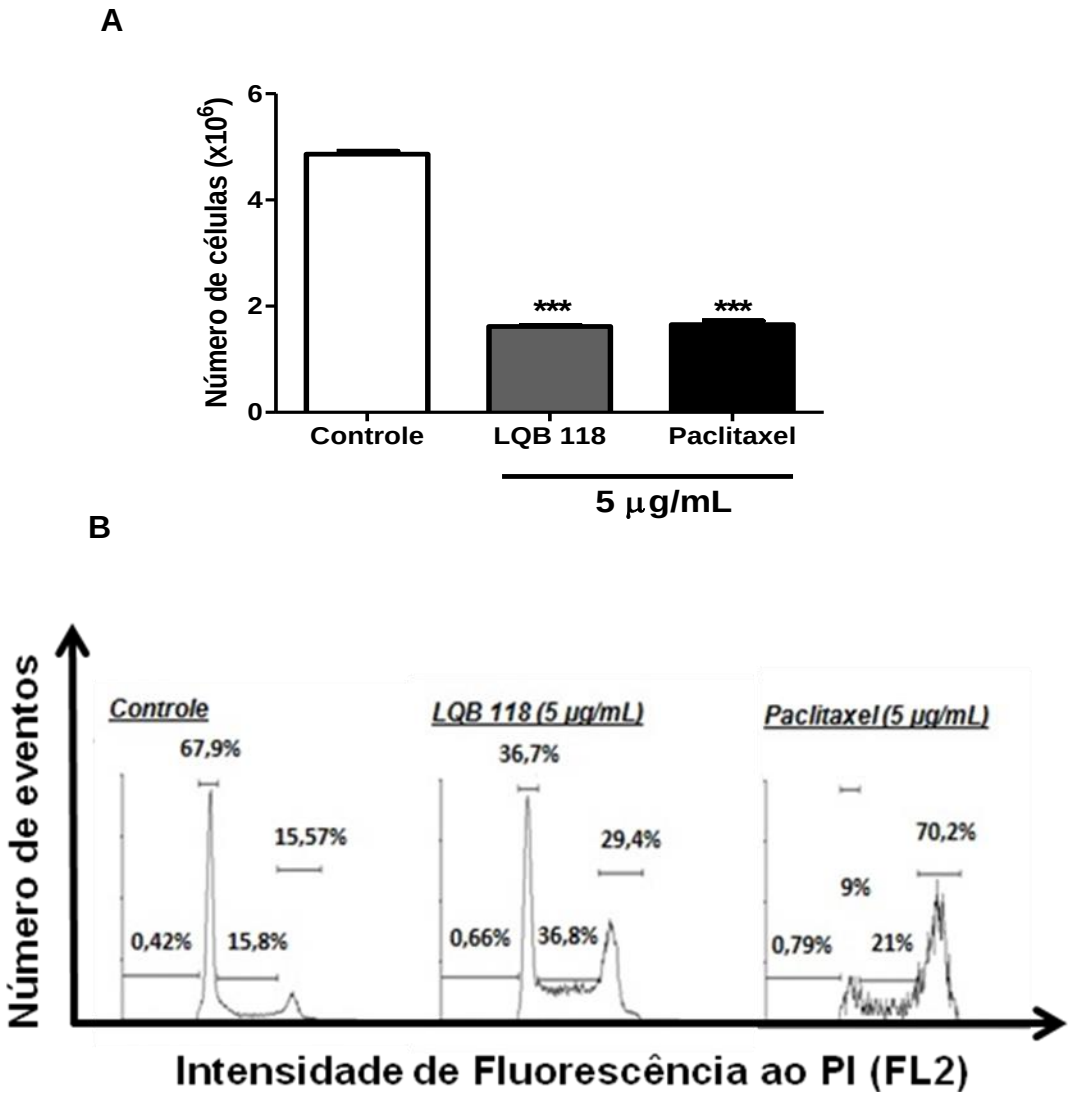

Figura 12: Proliferação e análise citofluorimétrica do ciclo celular de células PC3, após tratamento com LQB 118 ou Paclitaxel. (A) Número de células vivas, após 48 h de incubação, média ± desvio padrão de quatro experimentos independentes, e (B) Histograma mostrando os percentuais de células nas respectivas fases G_1. S e G_2/M do ciclo celular (experimento representativo). Células (1 x 10^5/mL) foram incubadas na ausência (controle) ou presença de LQB 118 ou Paclitaxel (5 µg/mL), por 48 h. Posteriormente foram contadas e tratadas (1 x 10^6 de células) com PI, triton X-100 e RNAse para análise de ciclo celular, conforme descrito no item métodos. A fluorescência do PI (DNA) foi detectada em FL2 (FL2-A, área do pico de fluorescência de cada evento) para 50.000 eventos/amostra. *Debrits* foram excluídos da análise por regiões delimitadas nos gráficos FSC x SSC e FSC x FL2. ***p<0,001, em relação ao controle (teste *t* de *Student*).

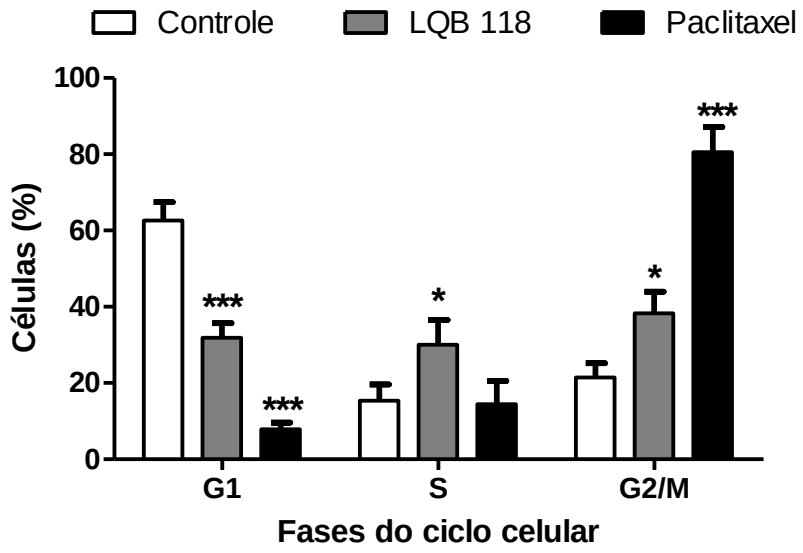

Figura 13: Efeito do LQB 118 e Paclitaxel sobre o ciclo celular das células PC3. Células (1 x 10^5/mL) foram incubadas na ausência (controle) ou presença de LQB 118 ou Paclitaxel (5 µg/mL), por 48 h e posteriormente tratadas (1 x 10^6 de células) com PI, triton X-100 e RNAse, conforme descrito no item métodos. A fluorescência do PI (DNA) foi detectada em FL2 (FL2-A, área do pico de fluorescência de cada evento) com 50000 eventos/amostra. *Debrits* foram excluídos da análise por regiões delimitadas nos gráficos FSC x SSC e FSC x FL2. Os resultados representam média ± desvio padrão de quatro experimentos independentes. *p<0,05 e ***p<0,001, em relação ao controle (teste *t* de *Student*).

8.4 **Expressão de mRNA**

Tendo a análise do ciclo celular das células PC3 mostrado que o LQB 118 e o Paclitaxel promovem interrupção do mesmo, o próximo objetivo deste estudo foi investigar alguns mecanismos de ação do LQB 118. Avaliou-se, então, por RT-PCR, a expressão de alguns genes envolvidos na regulação da proliferação celular, dentre estes, o fator de transcrição c-Myc, a ciclina D1 (envolvida na progressão da fase G1) e a ciclina B1 (envolvida na transição entre as fases G_2 e M), após incubação das células na ausência ou presença de LQB 118 ou Paclitaxel (10 µg/mL) por 24 e 48 h. A figura 14A mostra o padrão de expressão do mRNA (bandas representando produtos de PCR) do fator de transcrição c-Myc (gene alvo) e da beta-actina (gene constitutivo) de um experimento representativo, enquanto a figura 14B mostra a média das densitometrias relativas (gene alvo dividido pelo gene constitutivo beta-actina) (três experimentos independentes) das bandas do c-Myc. Com 24 h de cultura, o tratamento com o LQB 118 ou Paciltaxel não alteraram a expressão do c-

Myc (figura 14A), o que foi confirmado na Figura 14B. Comparando-se a expressão de uma mesma condição de cultura em 24 h e 48 h (figura 14A), observa-se em 48 h um aumento da expressão do c-Myc na cultura controle, redução pelo tratamento com LQB 118 e aumento pelo tratamento com Paclitaxel. A análise das médias das densitometrias relativas em cada condição de cultura (figura 14B) confirmou o aumento na expressão do gene c-Myc (64%) na cultura controle, inibição (29%) da expressão pelo tratamento com LQB 118, assim como aumento (139%) da expressão após tratamento com o Paclitaxel em 48 h, em relação à mesma condição em 24 h. Comparando-se as densitometrias das bandas das diferentes culturas em 48 h, observa-se que o LQB 118 reduziu a expressão do c-Myc em 60% e o Paclitaxel induziu um aumento na mesma de 39%, em relação à cultura controle (figura 14B).

A figura 15A mostra o padrão de expressão de mRNA da ciclina D1 de um experimento representativo, após tratamento com LQB 118 ou Paclitaxel, e a figura 15B indica as médias das densitometrias relativas de vários experimentos independentes. Após 24h de cultura, a análise do gel (figura 15A) mostra que o tratamento com LQB 118 reduziu a expressão da ciclina D1, sem alteração na cultura tratada pelo Paclitaxel, o que foi confirmado na figura 15B (inibição de 27%). Comparando-se a mesma condição de cultura nos dois tempos estudados, observa-se em 48 h um aumento na expressão da ciclina D1 na amostra controle, assim como redução na expressão com ambos os tratamentos, em relação ao tempo de 24 h (figura 15A), no entanto, não houve diferença significativa nas culturas tratadas com LQB 118 entre 24 h e 48 h (figura 15B). O aumento de 52% na expressão do gene da ciclina D1 em 48 h na cultura controle, em relação a 24 h, indica proliferação celular ao longo do tempo, enquanto o Paclitaxel inibiu em 30% a expressão deste gene em 48 h, também em relação à mesma condição de cultura em 24 h (figura 15B). Analisando-se os grupos apenas no tempo de 48 h de incubação, as células PC3 incubadas com o LQB 118 e com o Paclitaxel mostraram inibições de 59% e 48% na expressão da ciclina D1, quando comparado ao controle de 48 h (figura 15B).

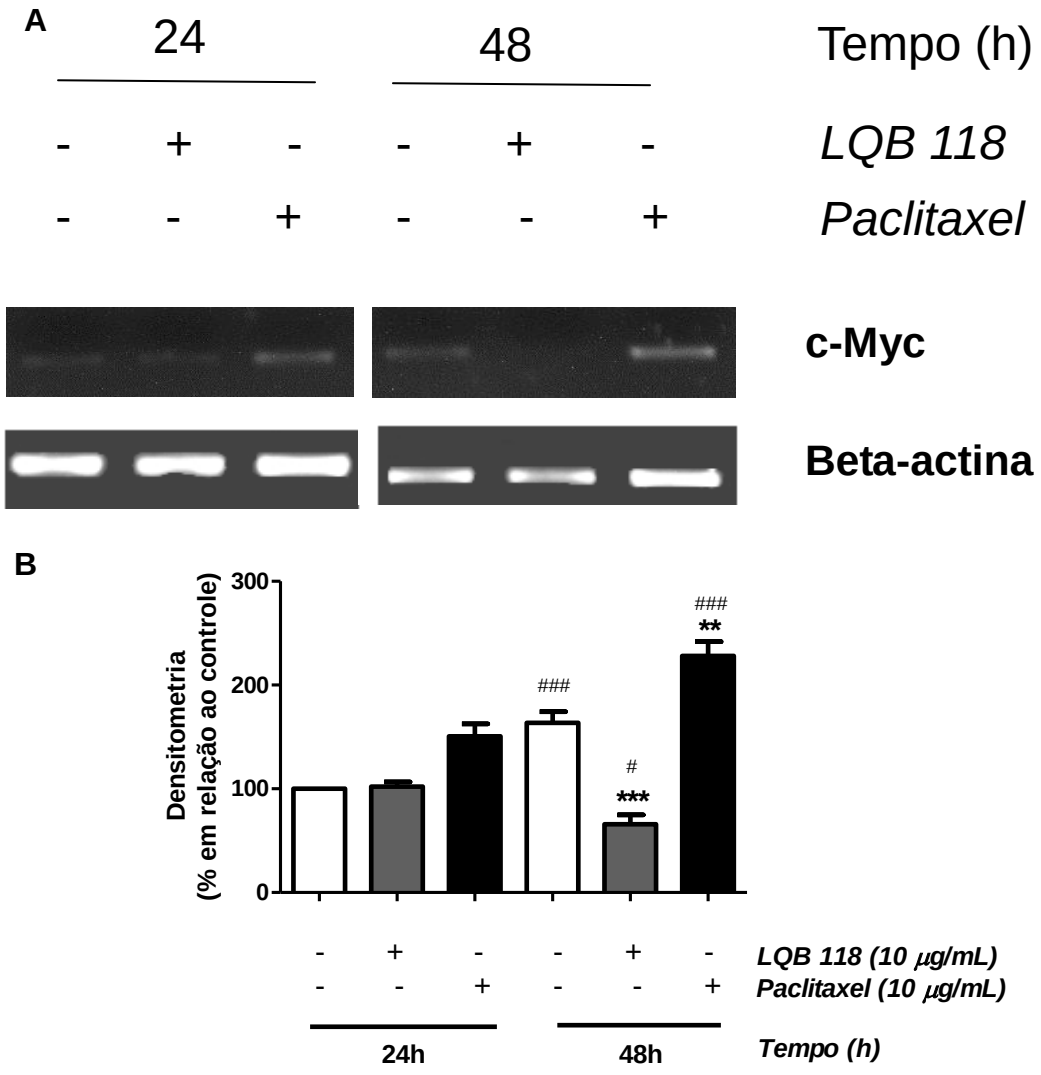

Figura 14: Efeito do LQB 118 e Paclitaxel sobre a expressão de mRNA do fator de transcrição c-Myc em células PC3. (A) Gel de agarose a 1,8% representando a expressão gênica através da intensidade das bandas, resultado representativo. (B) Densitometria relativa (gene alvo dividido pelo gene constitutivo beta-actina) das bandas do gene c-Myc (n=3) As células (1 x 10^5/mL) foram tratadas na ausência ou presença dos respectivos compostos (10 µg/mL) e após cada tempo o RNA total de 2 x 10^6 células foi extraído e o RT-PCR realizado para os genes específicos. O gráfico B mostra média ± desvio padrão da expressão (%) do gene alvo em cada condição de cultura, em relação ao controle do tempo de 24 h (considerado 100%). **p<0,01 e ***p<0,001 (em relação ao controle do respectivo tempo de cultura) e $^{\#}$ p<0,05 e $^{\#\#\#}$p<0,001 (em relação à mesma condição de cultura no tempo de 24 h), pelo teste *t* de Student.

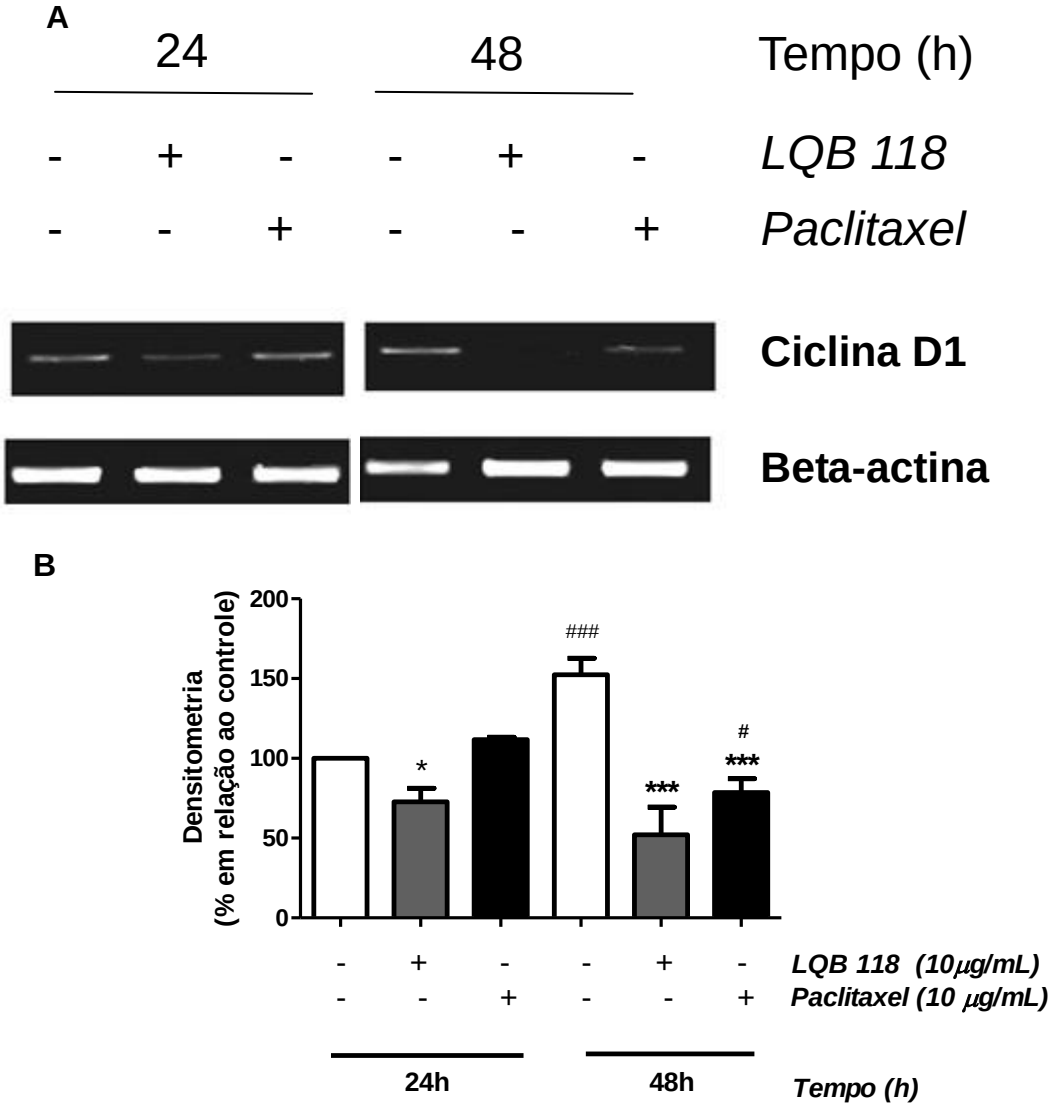

Figura 15: Efeito do LQB 118 e Paclitaxel sobre a expressão de mRNA da ciclina D1 das células PC3. (A) Gel de agarose a 1,8% representando a expressão gênica através da intensidade das bandas, experimento representativo. (B) Densitometria relativa (gene alvo dividido pelo gene constitutivo beta-actina) das bandas do gene ciclina D1 (n=3). As células (1 x 10^5/mL) foram tratadas na ausência ou presença dos compostos (10 µg/mL) e após cada tempo o RNA total de 2 x 10^6 células foi extraído e o RT-PCR realizado para os genes específicos. O gráfico mostra média ± desvio padrão da expressão (%) do gene alvo em cada condição de cultura, em relação ao controle do tempo de 24 h (considerado 100%). *p<0,05 e ***p<0,001 (em relação ao controle do respectivo tempo de cultura) e $^{\#}$p<0,05 e $^{\#\#\#}$p<0,001 (em relação à mesma condição de cultura no tempo de 24 h), pelo teste *t* de Student.

A análise da expressão do mRNA do gene da ciclina B1 também foi realizada (figura 16), visto que o LQB 118 e o Paclitaxel promoveram interrupção do ciclo celular na fase G_2/M. A figura 16A mostra o padrão de expressão de mRNA da ciclina B1 de um experimento representativo, após tratamento com LQB 118 ou Paclitaxel, e a figura 16B indica as médias das densitometrias relativas de vários experimentos independentes. Após 24h de cultura, a análise do gel (figura 16A) mostra que o tratamento com LQB 118 reduziu a expressão da ciclina B1, o que foi confirmado na figura 16B (inibição de 58%), sem alteração na cultura tratada pelo Paclitaxel. Comparando-se a mesma condição de cultura nos dois tempos de incubação estudados, observa-se em 48 h um aumento (24%) na expressão da ciclina B1 na amostra controle, indicando proliferação celular ao longo do tempo, e redução (32%) na expressão deste gene pelo tratamento com Paclitaxel, ambos em relação ao tempo de 24 h, não havendo diferença significativa entre os tempos nas culturas tratadas com LQB 118 (figuras 16A e 16B). Analisando-se os grupos apenas no tempo de 48 h de incubação, as células PC3 incubadas com o LQB 118 e com o Paclitaxel mostraram inibições de 43% e 44% na expressão da ciclina B1, respectivamente, quando comparadas à cultura controle de 48 h (figura 16B).

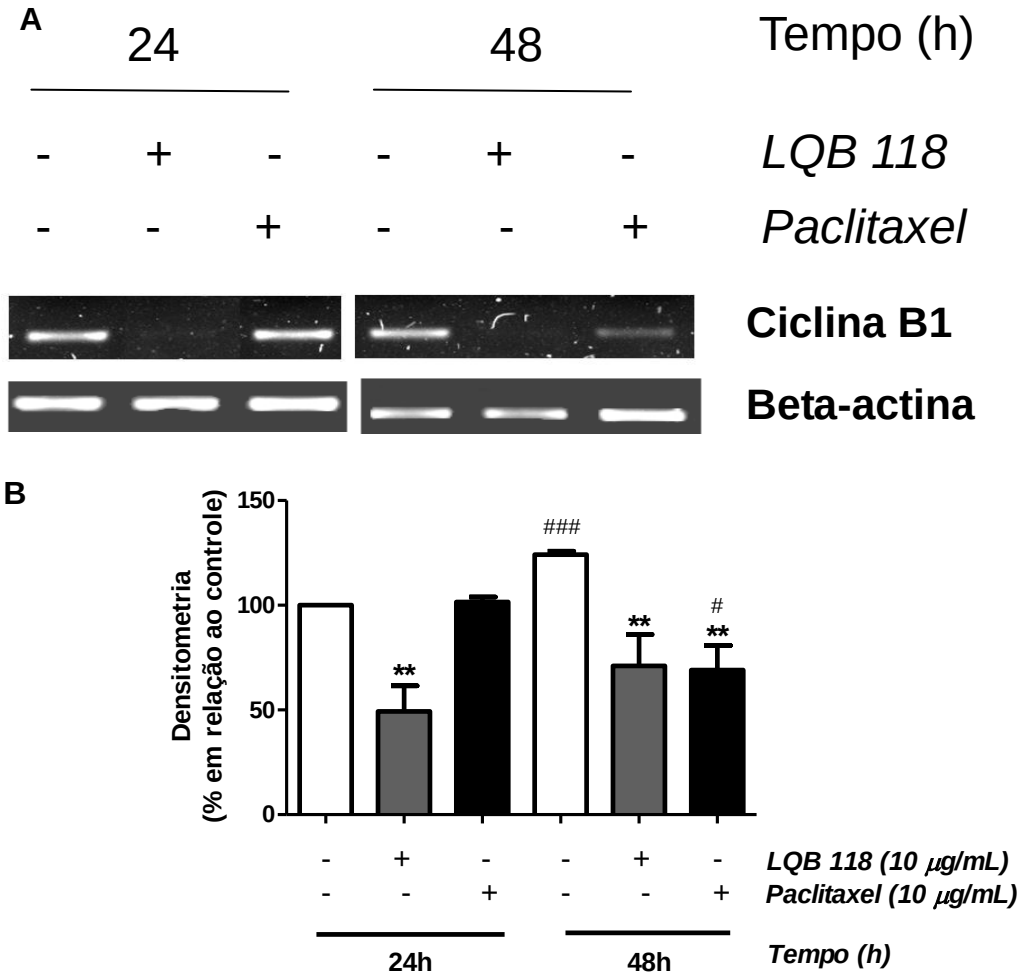

Figura 16: Efeito do LQB 118 e Paclitaxel sobre a expressão de mRNA da ciclina B1 das células PC3. (A) Gel de agarose a 1,8% representando a expressão gênica através da intensidade das bandas, experimento representativo. (B) Densitometria relativa (gene alvo dividido pelo gene constitutivo beta-actina) das bandas do gene ciclina B1 (n=3). As células (1 x 10^5/mL) foram tratadas na ausência ou presença dos respectivos compostos (10 µg/mL) e após cada tempo o RNA total de 2 x 10^6 células foi extraído e o RT-PCR realizado para os genes específicos. O gráfico mostra média ± desvio padrão da expressão (%) do gene alvo em cada condição de cultura, em relação ao controle do tempo de 24 h (considerado 100%). *p<0,05 e ***p<0,001 (em relação ao controle do respectivo tempo de cultura) e $^{\#}$p<0,05 e $^{\#\#\#}$p<0,001 (em relação à mesma condição de cultura no tempo de 24 h), pelo teste *t* de Student.

Em virtude da observação do efeito antiproliferativo e citotóxico do LQB 118 sobre a linhagem celular PC3, decidiu-se avaliar uma possível consequência da interrupção do ciclo celular, como a capacidade de induzir morte celular por apoptose.

8.5 **Apoptose**

8.5.1. Anexina V

A anexina V é um anticorpo monoclonal que, na presença de íons cálcio, se liga especificamente ao fosfolipídio de membrana fosfatidilserina, presente na camada interna da membrana plasmática de células vivas. Geralmente, a anexina-V está conjugada a um fluorocromo, neste trabalho à fluoresceína (FITC), a qual absorve luz de determinado comprimento de onda e emite fluorescência em outro comprimento de onda (de menor energia), sendo possível a captação desta fluorescência através de diferentes técnicas, como a citometria de fluxo. Durante o processo apoptótico, a membrana plasmática das células sofre desorganização, favorecendo a externalização da fosfatidilserina. Desta forma, quando as células são incubadas com este anticorpo é possível determinar o nível de apoptose, através da ligação anexina V-fosfatidilserina. Nesta técnica, utiliza-se também outro marcador, o iodeto de propídio (PI), que irá se ligar às bases nitrogenadas das células que perdem a seletividade de permeabilidade pela membrana plasmática.

A figura 17A mostra o efeito do LQB 118 e do Paclitaxel sobre a distribuição das células em relação à intensidade de fluorescência do PI (detectada pelo canal FL2) e à marcação por anexina-V conjugada a FITC (fluorescência detectada pelo canal FL1). Logo, as células que apresentam marcação positiva somente para anexina-V (região inferior direita) são consideradas mortas por apoptose, em um estágio inicial do processo, enquanto, as células que apresentam marcação positiva somente para PI (região superior esquerda) são consideradas mortas por necrose. As células que apresentam dupla marcação positiva, para anexina-V e PI (região superior direita), encontram-se em um estágio mais tardio da apoptose.

A análise dos citogramas (figura 17A) indica que as células da cultura controle (não tratada com LQB 118 ou paclitaxel) apresentou população elevada de células viáveis (91,2%). Após tratamento por 48 h com o LQB 118 (5 µg/mL), observou-se redução de 60% na população de células viáveis, enquanto o percentual de células marcadas apenas com anexina-V (apoptose inicial) aumentou de 2,4% para 43,6% (18 vezes) e as células duplamente marcadas (apoptose tardia), aumentou de 4,8% para 19,5% (4 vezes). As células que receberam tratamento por 48 h com Paclitaxel (5 µg/mL) apresentaram redução de 25,8% na população de células viáveis e aumentos de 279,2% e 304,2% nas células em apoptose inicial e tardia, respectivamente.

Os dados da figura 17B, que mostram as médias (quatro experimentos independentes) dos percentuais de células em cada tipo/etapa do processo de morte celular confirmam a indução de apoptose nas células PC3 pelo LQB 118, visto que este promoveu aumento significativo na população de células em apoptose inicial (379,6 $\pm$ 0,6%) e apoptose tardia (328,6 $\pm$ 4%), entretanto não apresentou diferença na população de células necróticas em relação ao controle. Nas células tratadas com Paclitaxel também foi confirmado o seu efeito indutor de apoptose, demonstrado pelo aumento ($p<0,05$) na população de células em apoptose inicial (63,9 $\pm$ 0,6%) e apoptose tardia (123,9 $\pm$ 7,3%), não havendo diferença na população de células necróticas, em relação às culturas controle.

Com o objetivo de confirmar a capacidade indutora de apoptose do LQB 118, utilizou-se outras técnicas para detecção deste fenômeno, como a fragmentação internucleossomal do DNA e análise morfológica das células.

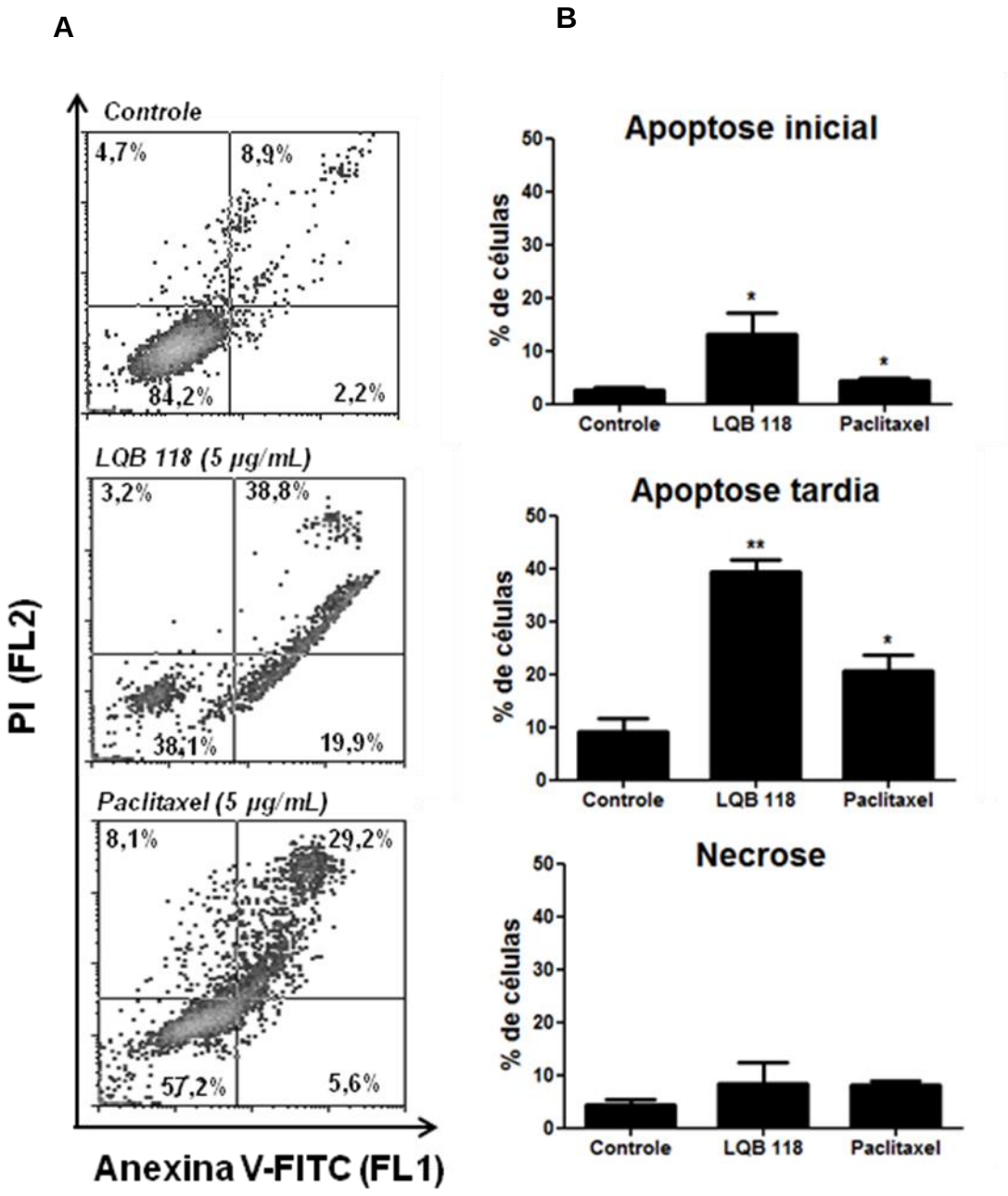

Figura 17: Efeito do LQB 118 e do Paclitaxel na apoptose de células PC3, por marcação com anexina V-FITC. (A) Citogramas mostrando permeabilidade de membrana plasmática ao PI (FL2) e intensidade de ligação da anexina V-FITC à fosfatidilserina (FL1), experimento representativo (B) Número relativo de células em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose (média ± desvio padrão de quatro experimentos independentes). Células PC3 (1 x 10^5/mL) foram incubadas na ausência ou presença de LQB 118 ou Paclitaxel (5 µg/mL), por 48 h. *p<0,05 e **p<0,01, em relação a cultura controle (teste *t* de *Student*).

8.5.2. Fragmentação de DNA

Outro marcador bioquímico da apoptose é a fragmentação do DNA por endonucleases endógenas, que promovem a clivagem da dupla fita de DNA em fragmentos múltiplos de 180-200 pares de base, observado pelo padrão de migração das bandas de DNA semelhante a degraus de escada (*ladder*), por eletroforese horizontal em gel de agarose. Caso não haja degradação do DNA, o gel mostrará somente uma banda na origem, visto que o DNA íntegro ficará retido na porção inicial do gel. Por outro lado, havendo necrose, o DNA sofre fragmentação inespecífica, não apresentando o padrão de bandeamento em escada, e sim um padrão de arraste do DNA, já que sua degradação ocorre de forma aleatória.

A figura 18 mostra o padrão de migração do DNA de células PC3 tratadas ou não com LQB 118 ou Paclitaxel (5 µg/mL) por 48 h, em gel de agarose (1,5%). Na primeira coluna à esquerda observa-se o DNA de células de timo de camundongo (*Swiss webster*) tratadas com dexametasona (indutor de apoptose em linfócitos) por 48 h, representando o controle positivo (CP) de apoptose. Este ponto apresenta o padrão de fragmentação de DNA característico da apoptose (*ladder*), ou seja, fragmentos de DNA múltiplos de 200 pares de base. Na segunda coluna da esquerda para direita, observa-se o DNA de células PC3 não tratadas com LQB 118 ou Paclitaxel (controle), com pequena degradação e grande parte do DNA retido na porção inicial do gel. Na terceira coluna é possível observar importante degradação do DNA com padrão de bandeamento característico da apoptose. Neste ponto encontra-se o DNA de células tratadas com LQB 118. Por fim, na última coluna encontra-se o DNA de células tratadas com Paclitaxel, sendo possível observar um padrão mais leve de bandeamento em *ladder*. Estes resultados corroboram os resultados obtidos na citometria de fluxo, indicando que tanto o LQB 118 quanto o Paclitaxel são capazes de induzir apoptose em células PC3, e que os efeitos do LQB 118 foram mais intensos do que o do Paclitaxel, no que refere à fragmentação internucleossomal do DNA e marcação com anexina-V.

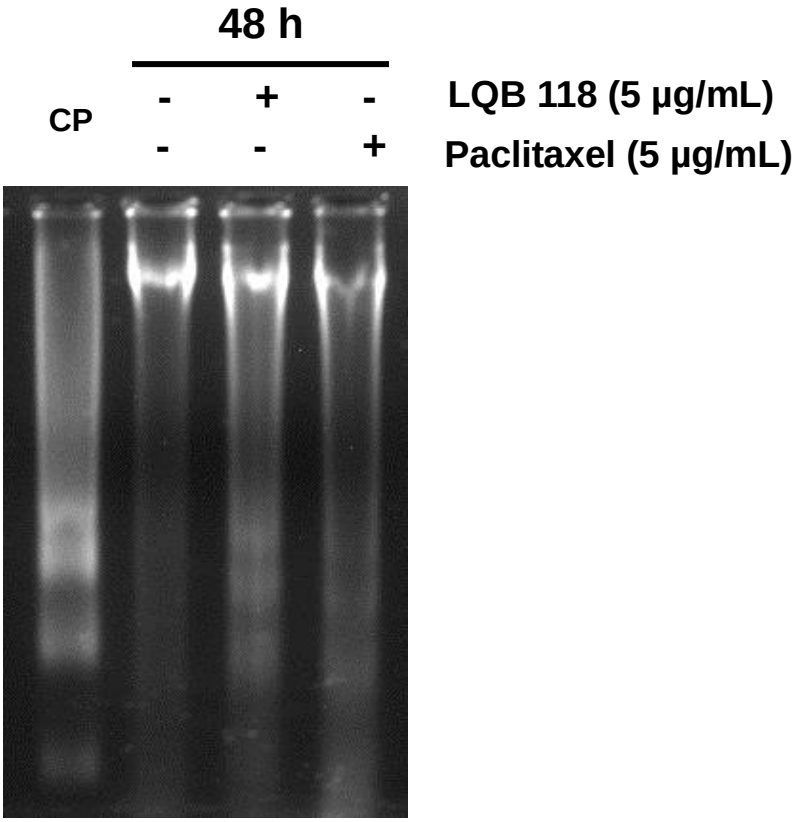

Figura 18: Efeito do LQB 118 e Paclitaxel sobre a fragmentação de DNA durante o processo apoptótico. As células (1 x 10^5/mL) foram incubadas na ausência ou na presença de LQB 118 ou Paclitaxel (5 µg/mL) por 48 h. Após a incubação, as células (1 x 10^6) foram lisadas e o DNA extraído submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% e corado com SYBER Safe®. A corrida foi feita em tampão TBE por 4h a 12V e as bandas visualizadas através de luz UV. As imagens foram obtidas por sistema de captura de imagens Kodak. Resultado representativo de três experimentos independentes

8.5.3 Marcação nuclear com DAPI

Com o objetivo de avaliar os efeitos do LQB 118 na morfologia celular, utilizou-se o DAPI, para marcação nuclear (coloração azul), e o Azul de Evans (coloração vermelha), para delimitação do citoplasma. As figuras 19A e 19B mostram os efeitos do tratamento de células PC3 por 24 h e 48 h, respectivamente, com o LQB 118 e o Pacliaxel. Em ambas as figuras, na primeira linha encontram-se as células coradas somente com o marcador de citoplasma (azul de evans), na segunda linha encontram-se as células coradas apenas para núcleos (DAPI), e na terceira linha são mostradas as células com as duas marcações sobrepostas. Após

incubação das células por 24 h (figura 19A) na ausência do LQB 118 ou Paclitaxel (controle, primeira coluna), é possível visualizar núcleos de tamanho médio (2ª e 3ª linhas), com quantidade normal de citoplasma (1ª e 3ª linhas), podendo estar representando células com quantidade de DNA equivalente a 2n, ou seja, células que apresentem núcleos com DNA correspondente a 23 pares de cromossomos, que estejam ou não se preparando para duplicar seu material genético. Também podem ser observados nas mesmas figuras do controle de 24 h (2ª e 3ª linhas) núcleo maiores, arredondados ou alongados, podendo corresponder a células que estejam em fase de duplicação do material genético ou que este já esteja duplicado (4n). Tais núcleos encontram-se também acompanhados de uma maior área citoplasmática. Na figura 19B, a cultura controle (primeira coluna) apresenta maior número de células no campo, e estas com maior frequência de núcleos e citoplasmas aumentados, indicando maior proliferação celular em 48 h. Após 24 h de tratamento (figura 19A) das células com LQB 118 (segunda coluna) observa-se um pequeno número de células grandes, com quantidade aumentada de DNA, e frequência aumentada (em relação ao controle) de células de tamanho normal, a maioria destas se apresentando com núcleo de tamanho reduzido e cromatina condensada (núcleos apoptóticos, densos para a marcação com o DAPI, em relação aos núcleos das células controle). Após 48 h de incubação com o LQB 118, observa-se redução drástica do número de células, sugerindo inibição da proliferação celular, com células grandes contendo núcleos aumentados, o que pode estar relacionado à interrupção do ciclo celular na fase G_2/M, e células normais. A cultura incubada 24 h (figura 19A) com Paclitaxel (terceira coluna) apresenta menor número de células do que a cultura controle ou tratada com LQB 118, a maioria das células encontram-se com o núcleo e o citoplasma aumentados, sugerindo possível inibição da proliferação celular em algum estágio após a duplicação do DNA, embora alguns núcleos encontrem-se disformes e condensados, sugerindo morte por apoptose. Ao analisar a cultura tratada por 48 h (figura 19B) com Paclitaxel (terceira coluna), observa-se que o tamanho do citoplasma e do núcleo das células está aumentado, semelhante à cultura controle (material celular e nuclear duplicado), característico de proliferação celular, entretanto, o número de células foi drasticamente reduzido, semelhante ao efeito do LQB 118, sugerindo interrupção da divisão celular em G_2/M.

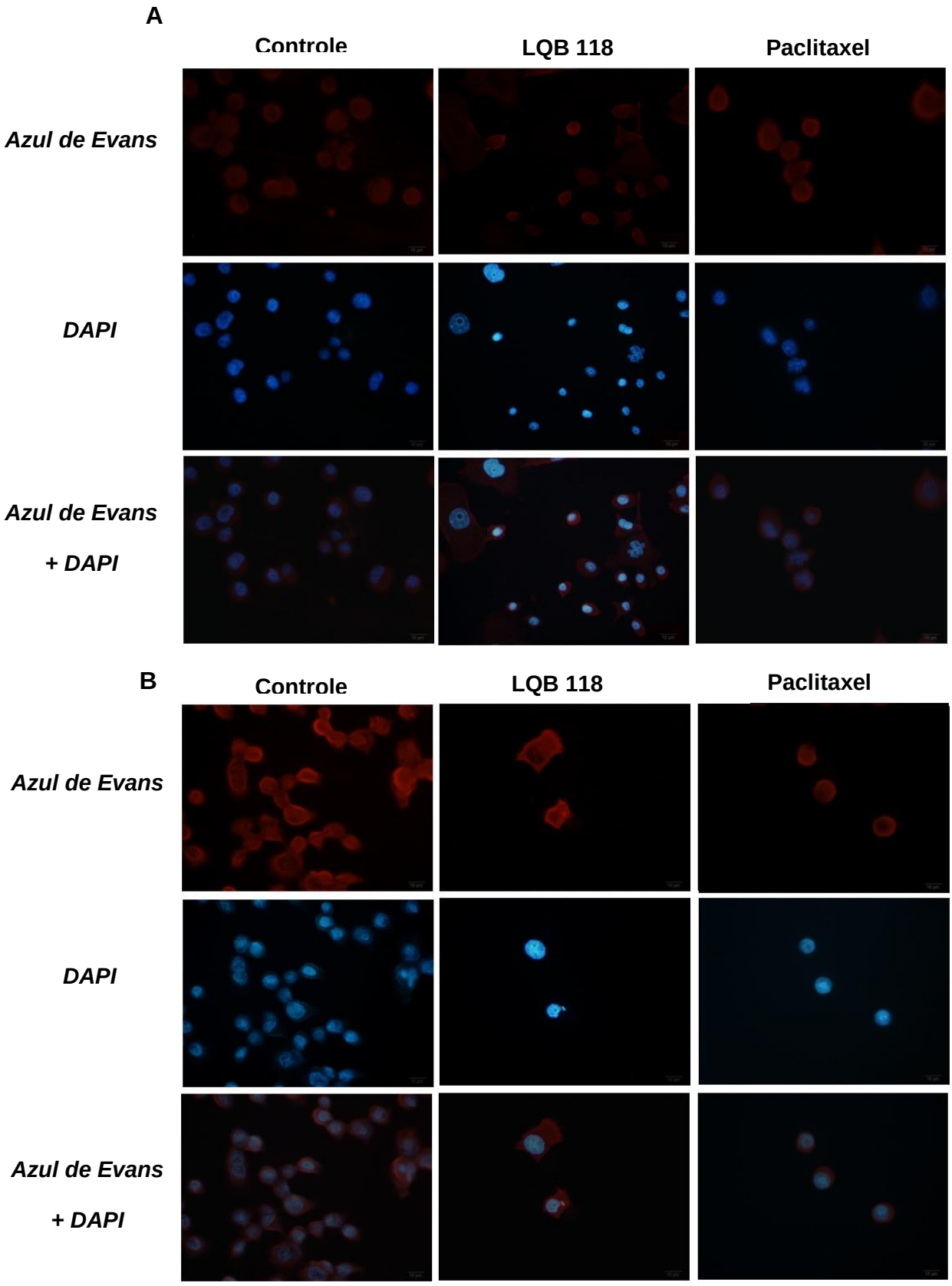

Figura 19: Efeito do LQB 118 e Paclitaxel sobre a morfologia celular e nuclear de células PC3, por microscopia de fluorescência. (A) 24 h e (B) 48 h. As células ($1x10^5$/mL) foram incubadas na ausência ou presença de LQB 118 ou Paclitaxel (5 µg/mL). Após o tempo de incubação as células tiveram o citoplasma marcado com Azul de Evans e o núcleo marcado com DAPI, segundo descrito no item 5.5.3 da metodologia. As imagens foram visualizadas por microscopia de fluorescência (60x). Resultado representativo de dois experimentos independentes.

9 **DISCUSSÃO**

Diante do impacto crescente do câncer sobre a população mundial, muitas pesquisas vêm buscando novos compostos capazes de combaterem o câncer. Neste sentido, a síntese de moléculas com atividade farmacológica direcionada é um campo proeminente na pesquisa, visto que o entendimento da relação entre a estrutura e a atividade farmacológica permite o desenvolvimento de análogos de compostos já utilizados, porém com atividade melhorada (Balunas e Kinghorn, 2005; Hussain *et al.*, 2007). Pterocarpanos são isoflavonóides encontrados em diversas Leguminosae (Harbone *et al.*, 1975) e muitas atividades biológicas para esta classe de compostos são descritas na literatura, incluindo atividade antiviral, antitumoral e antimitótica (Militão *et al.*, 2006; Militão *et al.*, 2007). Estudos demonstram a atividade antileucêmica para alguns pterocarpanos isolados, assim como atividade citotóxica contra a linhagem tumoral de mama MCF7 (Militão *et al.*, 2006; Netto *et al.*, 2009; Leonti *et al.*, 2010). As naftoquinonas são amplamente distribuídas na natureza, e o componente mais conhecido desta classe é o lapachol, que apresenta propriedades antitumorais bem descritas em células de câncer de ovário, mama, próstata, melanoma, pulmão, cólon e pâncreas (Li *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999).

Este trabalho estudou algumas ações farmacológicas de um composto sintético, obtido a partir do processo de hibridização de um composto da família dos pterocarpanos com um composto da família das naftoquinonas, resultando na pterocarpanoquinona LQB 118, que apresenta atividade antileucêmica já estabelecida *in vitro* (Netto *et al.*, 2010; de Sá Bacelar *et al.*, 2013). Entretanto, pouco se conhece sobre o efeito do LQB 118 sobre linhagens celulares de tumores sólidos. Diante disto, este trabalho avaliou a atividade citotóxica do LQB 118 sobre linhagens celulares de tumores sólidos de grande prevalência no mundo (pulmão, mama e próstata), e investigou possíveis mecanismos de ação do mesmo sobre a linhagem celular mais sensível aos seus efeitos citotóxicos.

Ao avaliar a citotoxicidade do LQB 118 sobre as linhagens tumorais (figura 7), através do ensaio colorimétrico do MTT (utiliza o metabolismo mitocondrial para monitorar a viabilidade das células), observou-se que a linhagem celular mais sensível aos efeitos citotóxicos do LQB 118 foi a linhagem tumoral prostática (PC3),

seguido da linhagem tumoral de mama (MCF7). A linhagem tumoral de pulmão (A549) só apresentou sensibilidade aos efeitos citotóxicos do LQB 118 na maior concentração testada (5 µg/mL), enquanto as outras células também foram sensíveis a 2,5 µg/mL. O LQB 118 atuou em todas as linhagens de maneira concentração dependente, e tempo dependente (em concentrações fixas, específicas para cada tipo celular).

Apesar de todas as linhagens celulares utilizadas serem de origem epitelial, estas apresentaram diferença quanto à sensibilidade aos efeitos citotóxicos do LQB 118. Estudos mostram que resistência a compostos tóxicos geralmente estão associados à atividade de transportadores do tipo ABC (dependentes de ATP) acoplados à membrana plasmática das células, que por sua vez, promovem a retirada de compostos químicos de origem endógena ou exógena do interior das células, resultando no fenômeno conhecido como múltipla resistência a drogas (MDR, do inglês *Multidrug Resistence*). Geralmente, a glicoproteína-P (Pgp) e a família de proteínas de resistência a múltiplas drogas (MRP) são os principais, porém não únicos, transportadores responsáveis pela caracterização da resistência à drogas em tumores sólidos (Litman *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004). Assim como a linhagem MCF7 é mais sensível à adriamicina, por apresentar menor expressão de Pgp e MRP, quando comparada à linhagem resistente à adriamicina (MCF-7/ADR), pode ser que a maior sensibilidade das células PC3 aos efeitos tóxicos do LQB 118 esteja relacionada à menor expressão de Pgp e baixa expressão de MRP nesta linhagem, em relação à MCF7 ou A549. De fato, a linhagem PC3 apresenta baixa expressão (Lee *et al.*, 2004) e a linhagem celular A549 é classificada no grupo de células que mostram alta expressão de MRP (Nooter *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012), justificando a menor sensibilidade desta última linhagem aos efeitos citotóxicos do LQB 118.

Muitos trabalhos relacionam a atividade farmacológica das naftoquinonas ao metabolismo deste composto, pois as quinonas, no interior das células, são reduzidas pela enzima NAD(P)H quinona oxidoredutase 1 (NQO1), com participação de coenzimas reduzidas (NADH ou NADPH), a hidroquinonas ou a semiquinonas (Dinkova-Kostova e Talalay, 2010). Nesta reação são geradas diversas espécies reativas de oxigênio intermediárias, que participariam do ciclo redox, causando estresse oxidativo, o que resultaria em injúrias ao DNA nuclear, peroxidação de lipídios de membrana, dentre outros danos à célula (Bianchet *et al.*, 2004).

Corroborando os dados da literatura, as três linhagens tumorais testadas na presença do LQB 118 expressam a enzima NQO1 (Planchon *et al.*, 2001; Jamshidi *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). A presença desta enzima nas linhagens tumorais seria capaz de metabolizar o radical naftoquinona do LQB 118 e assim promover danos celulares, resultando na citotoxicidade apresentada pelo composto. Entretanto, acredita-se que não seja somente esta enzima a responsável pelo efeito citotóxico do LQB 118, visto que trabalhos prévios demonstraram que o LQB 118 também apresenta citotoxicidade, embora menos intensa, sobre linhagens leucêmicas que não expressam tal enzima (de Sá Bacelar *et al.*, 2013).

Sabendo-se que o efeito citotóxico do LQB 118 foi mais intenso sobre a linhagem tumoral de próstata, esta foi utilizada como modelo para prosseguir com os estudos farmacológicos e de mecanismo de ação do LQB 118. Para comparar o efeito citotóxico do LQB 118 com um quimioterápico padrão utilizado no tratamento do tumor de próstata, selecionou-se o Paclitaxel para seguir com os estudos (figura 8), e foi possível observar que na concentração de 2,5 µg/mL o LQB 118 apresentou grande efeito citotóxico, sendo este bem maior do que o do Paclitaxel, tanto no tempo de 24 h quanto de 48 h de tratamento. Esta observação é importante, desde que se está comparando o efeito do LQB 118 com o de um quimioterápico já comercializado e usado no tratamento do câncer. O efeito citotóxico demonstrado neste trabalho para o Paclitaxel (3,1 µg/mL e 2,1 µg/mL, em 24 e 48 h, respetivamente) está de acordo com trabalhos na literatura, os quais utilizam a faixa de concentração utilizada entre 0,1 e 10 µg/mL para o Paclitaxel na linhagem celular PC3, sendo o IC_{50} (para o tempo de 48 h) de 7 µg/mL (Takeda *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008). Com base nos resultados apresentados de ARM (MTT), o LQB 118 apresentou citotoxicidade *in vitro* sobre a linhagem PC3 (IC_{50} de 1,85 µg/mL e 1,7 µg/mL, em 24 h e 48 h, respectivamente), similar a do quimioterápico padrão utilizado.

Os quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer, como o Paclitaxel, são eficazes, entretanto apresentam diversos efeitos colaterais, visto que a maioria dos compostos com potencial farmacêutico não apresenta seletividade para células tumorais. A utilização clínica do Paclitaxel induz diversos efeitos colaterais como mielosupressão, neuropatia periférica e inflamação nas mucosas, sendo estes efeitos potencializados por ação do óleo polioxidoetilado (veículo da droga) (Slichenmyer e Von Hoff, 1991; Yared e Tkaczuk, 2012). Diante disto, foi de

fundamental importância realizar ensaios controles de citotoxicidade do DMSO (veículo do LQB 118) sobre as células tumorais de próstata, assim como comparar os efeitos do LQB 118 entre células tumorais e normais, apesar de poucos estudos mostrarem tal comparação (Rocha *et al*, 2006), visto a dificuldade de correlacionar os resultados obtidos a partir de células com comportamentos e necessidades de crescimento tão distintos.

Neste trabalho, utilizou-se uma linhagem celular prostática humana normal de origem epitelial (RWPE-1) para avaliar os efeitos citotóxicos do LQB 118 sobre células normais. Apesar do LQB 118 ter apresentado toxicidade sobre as células RWPE-1, é importante destacar que tal toxicidade foi semelhante à do quimioterápico paclitaxel nas maiores concentrações, e bem menor que a do Paclitaxel nas menores concentrações (Figura 9). É importante destacar que nos testes com as células normais, utilizou-se a mesma concentração celular das culturas com a linhagem tumoral. Além disso, estudos prévios do LQB 118 mostraram baixa sensibilidade das células mononucleares de sangue periférico de doadores saudáveis aos efeitos citotóxicos do LQB 118 (de Sá Bacelar *et al.*, 2013). Estudos preliminares de toxicidade *in vivo* deste composto, com camundongo BALB/c e *Swiss Webster,* também não mostraram sinais de toxicidade (Cunha-Júnior *et al.,* 2011). Por outro lado, o tratamento das duas linhagens celulares com o Paclitaxel mostrou, em 48 h, um efeito citotóxico muito mais intenso na célula normal (aumento de 60% na citotoxicidade, com 2,5 µg/ml) do que na célula tumoral (Figura 10D). Estes resultados sugerem mais uma vez a necessidade da busca por novos compostos quimioterápicos que apresentem menos efeito colateral e maior eficácia no tratamento.

Alguns estudos correlacionam o efeito citotóxico de determinados compostos com a atividade antiproliferativa dos mesmos (Craag e Newman, 2005). Muitos isoflavonóides apresentam efeito inibitório sobre o crescimento celular de várias linhagens tumorais humanas (Le Marchand, 2002; Matsui *et al.*, 2005; Militão *et al.*, 2006), assim como as naftoquinonas (Hsu *et al.*, 2006; Gomathinayagm *et al.*, 2008). O tratamento das células PC3 com o LQB 118 promoveu inibição da proliferação celular a partir das primeiras 12 h de tratamento, e a partir deste tempo, morte das células, de forma muito semelhante ao Paclitaxel (figura 11). Estes resultados corroboram os testes preliminares, indicando que o LQB 118 apresenta atividade antiproliferativa e citotóxica.

A atividade antiproliferativa de diversos compostos está, de uma forma geral, associada à capacidade dos mesmos de interferirem na progressão do ciclo celular. De acordo com a literatura, alguns compostos da família dos pterocarpanos demonstram capacidade em promover interrupção do ciclo celular de células tumorais, principalmente na transição entre as fases G_2 e mitose (Li *et al.*, 2008, Zhao *et al.*, 2009), enquanto as naftoquinonas são capazes de induzir interrupção tanto na fase S quanto em G_2/M (Carvajal *et al.*, 2011; Kretschemer *et al.*, 2012). Outros estudos mostram que isoflavonoides impedem a progressão da fase G_2 para mitose em células PC3 (Kumi-Diaka *et al.*, 2002). Neste trabalho, os resultados mostram que os percentuais de células PC3 não tratadas (cultura controle) em cada fase do ciclo celular estão compatíveis com dados da literatura (Lavhale *et al.*, 2009), validando estes resultados (figura 12). O tratamento com o LQB 118 foi capaz de promover o acúmulo de células nas fases S e G_2/M, com redução significativa do número de células na fase G_1 (figura 13). Diante deste resultado, poderíamos inferir que tanto o radical naftoquinona, quanto o radical pterocarpano do composto LQB 118 podem estar envolvidos na promoção da interrupção do ciclo celular. Tem sido relatado que a interrupção do ciclo celular na fase G_2 impede o reparo no dano ao DNA das células, forçando-as a entrarem em apoptose. Desta forma o ponto de restrição em G_2 emerge como atrativo alvo terapêutico para tratamento do câncer (Bucher e Britten, 2008). Neste mesmo experimento foi possível observar a interrupção do ciclo celular de células PC3, especificamente na fase G_2/M, quando tratadas com Paclitaxel, resultado que também está de acordo com dados da literatura (Cassinelli *et al.*, 2002; Killilea *et al.*, 2007).

Existem diversos mecanismos que podem influenciar a progressão do ciclo celular como, por exemplo, alterações na expressão de fatores de crescimento (Keep *et al.*, 2011), de ciclinas e de inibidores do ciclo celular (Hsiao *et al.*, 2009; Xiong *et al.*, 2009). As células PC3, quando tratadas com LQB 118 por 24 e/ou 48 h, apresentaram redução na expressão do RNA mensageiro do fator de transcrição c-Myc (figura 14). A supressão deste gene em linhagens tumorais é de suma importância, visto que encontra-se superexpresso em vários de tipos de câncer (Wolfer e Ramaswamy, 2011; Sodir e Evan, 2011) e regula, em associação com outros genes, diversas funções celulares, dentre elas, a proliferação, a diferenciação, a angiogênese, a apoptose e a metástase (Wolfer e Ramaswamy, 2011; Sodir e Evans, 2011). Diante destas inúmeras funções do c-Myc e da

diferença de expressão em células normais e tumorais, o c-Myc torna-se um possível candidato a alvo terapêutico (Sodir e Evan, 2011).

Além destas propriedades do c-Myc, o gene promotor da ciclina D1 apresenta região responsiva ao c-Myc (Brenner *et al.*, 2005; White e Dalton, 2005). Portanto, ocorrendo inibição da expressão de mRNA do c-Myc é possível que se observe redução na expressão do mRNA da ciclina D1, que de fato ocorreu após o tratamento das células PC3 com LQB 118 (figura 15). Apesar da redução na expressão da ciclina D1 estar associada à interrupção do ciclo celular na fase G_1, alguns autores também correlacionam a redução desta ciclina à interrupção do ciclo celular na fase G_2/M (Kumaravel *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012). Peng e colaboradores (2010) observaram que extrato de cocoa, obtido de *Camellia sinensis,* promove interrupção no ciclo celular de células PC3 na fase G_2/M, além de observar redução em diversas ciclinas, dentre elas a ciclina D1 e aumento na expressão de inibidores do ciclo celular. Efeito similar foi verificado ao utilizar o composto lupeol sobre linhagens de tumor de próstata (Saleem *et al.*, 2009). Desta forma, a expressão diminuída de ciclina D1 nas células PC3, induzida pelo LQB 118, pode estar associada a alterações na expressão de inibidores do ciclo celular, como por exemplo, membros da família $p21^{CIP1}$. Estes inibidores são importantes reguladores do ciclo celular tanto na fase G_1 quanto na fase G_2/M (Baus *et al.*, 2003) e realizam, principalmente, a inibição do complexo ciclina D1/Cdk (Weiss *et al.*, 2000).

De Souza Reis e colaboradores (2012) verificaram em células leucêmicas que o LQB 118 promove inibição da translocação do NFκB para o núcleo, mantendo sua sublocalização no citoplasma. Uma consequência deste evento é a redução da transcrição de mRNA da ciclina D1, visto que o gene promotor da ciclina D1 também apresenta sítio de ligação para o NFκB, além do NFκB agir aumentando a estabilidade do complexo ciclina D1/Cdk4,6 (Kim *et al.*, 2012). Pode ser que estes mecanismos de ação do LQB 118, envolvendo a inibição do NFκB, também possam estar ocorrendo na ação antitumoral sobre a linhagem PC3 estudada neste trabalho.

Devido ao fato da formação do complexo ciclina B1/Cdk1 ser necessário para a progressão da fase G_2 para a fase M (Coudreuse e Nurse, 2010), outro possivel mecanismo de ação mediado pelo LQB 118, para inibir a proliferação da linhagem tumoral de próstata PC3, pode ser uma redução na formação deste complexo ciclinaB1/Cdk, desde que o LQB 118 reduz a expressão do mRNA da ciclina B1

(figura 16). Por outro lado, considerando que o efeito do LQB 118 também pode estar relacionado ao estresse oxidativo, pela presença do radical quinona em sua estrutura, a geração de espécies reativas de oxigênio também poderia causar danos ao DNA e promover interrupção do ciclo celular no ponto de restrição em G_2/M.

É importante salientar que as alterações observadas na expressão dos mRNAs do c-Myc e das ciclinas, após o tratamento com o controle positivo (Paclitaxel), corroboram os resultados descritos na literatura. Segundo Piñeiro e colaboradores (2010), o tratamento com Paclitaxel e análogos de taxol promove aumento na expressão do fator de transcrição c-Myc, resultado também obtido neste trabalho, com a linhagem PC3, após 48 h de tratamento. Já em relação às ciclinas, o Paclitaxel reduziu os níveis de ciclina D1 neste trabalho, efeito este também já descrito na literatura (Liu *et al.*, 2010), e que pode estar relacionado à capacidade do Paclitaxel em impedir a ativação da enzima AKT e do fator de transcrição NFκB (Bava *et al.*, 2011). Os resultados deste trabalho mostram redução na expressão do gene da ciclina B1 (figura 16), efeito também já demonstrado na literatura, o que está associado à indução da degradação desta ciclina e indução da apoptose (Wang *et al.*, 2010).

Diversos trabalhos têm enfatizado a importância da ciclina B1 na proliferação celular e indução de morte. A formação do complexo ciclina B1/Cdk1 permite a fosforilação de substratos, como, por exemplo, a survivina, que favorece a entrada da célula em mitose (Gavet e Pines, 2010, de Souza Reis *et al.,* 2012). A survivina pertence à família de proteínas anti-apoptóticas e promove a inibição da caspase 9. A relação entre a survivina e a ciclina B1 reside no fato desta ciclina estar associada à sua Cdk, a cdc2, e este complexo promover a fosforilação da proteína survivina, estabilizando-a e aumentando sua meia-vida, impedindo a apoptose e favorecendo a progressão do ciclo celular (Fortugno *et al.*, 2002). Segundo de Souza Reis e colaboradores (2012), o LQB 118 foi capaz de inibir a ação da survivina em linhagens leucêmicas, tal qual o tratamento feito com o RNA de interferência (iRNA) para esta proteína. Portanto, a diminuição dos níveis de mRNA da ciclina B1, observada neste estudo com o tratamento pelo LQB 118, deve resultar na inibição da survivina, também mediada pelo LQB 118 (de Souza Reis *et al.*, 2012), o que favorece a interrupção do ciclo celular e a indução de apoptose dessas células.

Além desses efeitos, interrupção prolongada do ciclo celular na fase G_2/M, favorece a fosforilação (mediada pela Cdk1) de membros anti-apoptóticos da família

Bcl-2, bloqueando sua função anti-apoptótica (Terrano *et al.*, 2010; Harley *et al.*, 2010). Estudos de silenciamento da ciclina B1 com iRNA sugerem a ausência da ciclina B1 para explicar a inibição da proliferação celular e indução de morte em linhagens celulares tumorais derivadas de mama (Androic *et al.*, 2008). Portanto, desvendar possíveis mecanismos de ação semelhantes a esses, principalmente em tumores de próstata, que adquirem resistência à apoptose, é fundamental, e a identificação de compostos capazes de induzir morte por apoptose nestas células é altamente desejado (Liu *et al.*, 2010).

A morte de células por apoptose ocorre com frequência em consequência da interrupção do ciclo celular (Ocker e Höpfner, 2012). Neste trabalho, observou-se que as células PC3 não tratadas com LQB 118 ou paclitaxel apresentaram viabilidade celular compatível com trabalhos já descritos (Seo *et al.*, 2011; Aghej *et al.*, 2012), e que após terem sido tratadas com LQB 118 por 48 h, estas sofreram o processo de morte celular por apoptose. Este fenômeno foi demonstrado pela presença de fosfatidilserina na camada externa da membrana plasmática (marcação com anexina V-FITC) (figura 17), visualização de fragmentação internucleossomal de DNA em gel de agarose (figura 18) e condensação da cromatina, visualizada por microscopia de fluorescência, através da coloração dos núcleos com DAPI (figura 19). A indução de apoptose nas células tumorais de próstata pelo tratamento com LQB 118 foi mais intensa do que com o Paclitaxel, na mesma concentração, como demonstrado pelas diferentes técnicas utilizadas. Dados da literatura mostram, através da condensação da cromatina, que o composto β-lapachona (naftoquinona) é capaz de induzir apoptose em células PC3 após 24 h de tratamento (Kumi-Diaka *et al.*, 2004).

Alguns mecanismos que podem estar envolvidos na indução de morte por apoptose de células PC3, pelo tratamento com LQB 118, são a interrupção do ciclo celular na fase G_2/M (ponto de restrição em G_2) (Gavet e Pines, 2010) e o estresse oxidativo causado pelas espécies reativas geradas no metabolismo do radical quinona (via NQO1) do LQB 118, as quais promoveriam danos ao DNA. Outro possível mecanismo seria por indução de estresse no retículo endoplasmático, levando à liberação de cálcio para o citosol e ativação da caspase-12, como já descrito em células leucêmicas K562 tratadas com LQB 118 (de Sá Bacelar *et al.*, 2013).

Outro dado importante que indica o LQB 118 como uma potencial droga antitumoral é mostrado a partir de experimentos realizados por Kumi-Diaka e colaboradores (2004), os quais mostraram que a associação do isoflavonóide genistein com a naftoquinona β-lapachona, induz sinergismo nos efeitos citotóxico, anti-proliferativo e de indução de apoptose em células PC3. Estudos prévios de colaboradores da Universidade Federal do Rio de Janeiro demonstraram a ação citotóxica de pterocarpanos sintéticos sobre linhagens leucêmicas, porém com significativos efeitos colaterais (Netto *et al.*, 2009). O lapachol, radical naftoquinona presente na estrutura do LQB 118, apresenta atividade citotóxica, já descrita na literatura, contra vários agentes patogênicos como leishmania, bactérias e vírus, além de destacado efeito antitumoral (Hussain *et al.*, 2007). Entretanto, devido a sua atividade antitumoral, é considerado um candidato ideal para possíveis modificações sistemáticas, com o objetivo de compreender a relação estrutura-atividade e assim, eventualmente desenvolver análogos com melhor atividade (Hussain *et al.*, 2007).

Portanto, os resultados apresentados neste trabalho demonstram os efeitos citotóxico e anti-proliferativo do composto sintético LQB 118, e sugerem que seu efeito anti-proliferativo esteja relacionado com a redução dos níveis de mRNA do fator de transcrição c-Myc, o que pode ter contribuído para a redução dos níveis de mRNA da ciclina D1 e ciclina B1. Possivelmente, por ativação do radical naftoquinona do LQB 118 pela NQO1, danos ao DNA podem ter sido causados, impedindo a progressão do ciclo celular e promovendo a apoptose. Além disso, a baixa citotoxicidade do LQB 118 sobre as células normais de próstata (RWPE-1), demonstrada neste trabalho, somado à ausência de toxicidade sobre células mononucleares *in vitro* e em modelos *in vivo,* descrito por outros autores (de Sá Bacelar et al., 2013; da Cunha-Júnior et al., 2011), tornam o LQB 118 uma droga em potencial a ser utilizada futuramente no tratamento do câncer.

Em suma, o LQB 118 é capaz de interromper a proliferação de células tumorais prostáticas (PC3), através de alterações na expressão de mRNA de genes envolvidos no ciclo celular, assim como induzir a morte destas células por apoptose.

10 **CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- O LQB 118 induz efeito citotóxico, de maneira tempo e concentração dependente, nas linhagens de tumores sólidos testadas, tendo as células tumorais de próstata (PC3) apresentado maior sensibilidade à substância em estudo;

- O LQB 118 apresenta citotoxicidade sobre células normais prostáticas de origem epiteliais (RWPE-1), porém com intensidade bem menor do que a observada com o quimioterápico Paclitaxel;

- O LQB 118 inibe a proliferação de células PC3, interrompendo o ciclo celular na fases S e G2/M;

- A interrupção do ciclo celular destas células pelo LQB 118 resulta, entre outros fatores, da redução na expressão gênica do mRNA dos genes do c-Myc, ciclina D1 e ciclina B1, proteínas estas envolvidas na regulação do ciclo celular;

- O efeito citotóxico do LQB 118 sobre a linhagem tumoral de próstata estudada está relacionado à indução de morte por apoptose.

REFERÊNCIAS

Aghej M, Karami-Tehrani F, Panjehpour M, Salami S, Fallahian F. Adenosine induces cell-cycle arrest and apoptosis in androgen-dependet and –independent prostate cancer cell lines. LNcap-FGC-10, DU-145 and PC3. Prostate. 2012;72:361 375.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. Biologia Molecular da célula. 5ª ed. Editora Artmed; 2009.

Almeida VL, Leitão A, Reina LCB, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MTP. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. Quim Nova. 2005;28:118-129.

Amati B, Brooks MW, Levy N, Littlewood TD, Evan GI, Land H. Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. Cell. 1993;72:233–245.

Androic I, Krämer A, Yan R, Rödel F, Gätje R, Kaufmann M, Strebhardt K, Yuan J. Targeting cyclin B1 inhibits proliferation and sensitizes breast cancer cells to taxol. BMC Cancer. 2008;8:391-402.

Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. Life Sci. 2005;78:431-441.

Baus F, Gire V, Fisher D, Piette J, Dulić V. Permanent cell cycle exit in G2 phase after DNA damage in normal human fibroblasts. EMBO J. 2003;22:3992-4002.

Bava SV, Sreekanth CN, Thulasidasan AK, Anto NP, Cherivan VT, Pulivappadamba VT, Menon SG, Ravichandran SD, Anto RJ. Akt is upstream and MAPKs are downstream of NF-κB in paclitaxel-induced survival signaling events, wich are down-regulated by curcumin contributing to their synergism. Int J. Biochem. Cell Biol. 2011;43:331-341.

Belizário JE, Alves J, Occhiucci JM, Garay-Malpartida M , Sesso A. A mechanistic view of mitochondrial death decision pores. Braz J Med Biol Res. 2007;40:1011-1024.

Bello D, Webber MM, Kleinman HK, Wartinger DD, Rhim JS. Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18. Carcinogenesis. 1997;18:1215-1223.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. Biotechnol. Annu Rev. 2005;11:127-157.

Berthet C, Kaldis P. Cell-specific responses to loss of cyclin-dependent kinases. Oncogene. 2007;26:4469-4477.

Bianchet MA, Faig M, Amzel LM. Structure and mechanism of NAD[P]H:quinine acceptor oxidoreductase (NQO). Methods Enzymol. 2004;382:144-174.
Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. Pharmacol Ther .2001;90:157–177.

Bosland MC. The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis. J. Nat. Cancer Inst. Monogr. 2000;27:39-66.

Brenner C, Deplus R, Didelot C, Loriot A, Viré E, De Smet C, Guitierrez A, Danovi D, Bernard D, Boon T, Pelicci PG, Amati B, Kouzarides T, de Launoit Y, Di Croce L, Fuks F. Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. EMBO J. 2005;24:336–346.

Bucher N, Britten CD. G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. Br J Cancer. 2008;98:523–528.

Cape JL, Bowman MK, Kramer DM. Computation of the redox and protonation properties of quinones: towards the prediction of redox cycling natural products. Phytochemistry 2006;67:1781–1788.

Carvajal D, Kennedy S, Boustani A, Lazar M, Nguyen S, DiCesare JC, Sheaff RJ. Induction of cell death by a novel naphtoquinone containing a modified anthracycline ring system. Chem Biol Drug Des. 2011;78:764-777.

Cascón A, Robeldo M. MAX and MYC: a heritable breakup. Cancer Res. 2012;72:3119-3124.

Cassinelli G, Lanzi C, Supino R, Pratesi G, Zuco V, Laccabue D, Cuccuru G, Bombardelli E, Zunino F. Cellular bases of the antitumor activity of the novel taxane IDN 5109 (BAY59-8862) on hormone-refractory prostate cancer. Clin Cancer Res. 2002;8:2647-2654.

Chen Y, Hu L. Design of anticancer prodrugs for reductive activation. Med Res Rev 2009;29:29-64.

Chrzan BG, Bradford PG. Phytoestrogens activate estrogen receptor β1 and estrogenic responses in human breast and bone cancer cell lines. Mol Nutr Food Res. 2007;51:171–177.

Cole MD, Henriksson M. 25 years of the c-Myc oncogene. Semin Cancer Biol. 2006; 16:241.

Cotterman R, Jin VX, Krig SR, Lemen JM, Farnham PJ, Knoeofler PS. N-Myc regulates a widespread euchromatic program in the human genome partially independent of its role as a classical transcription factor. Cancer Res. 2008;68:9654–9662.

Coudreuse D e Nurse P. Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. Nature. 2010;468:1074-1079.

Craag GM, Newman DJ. Plants as source of anticancer agents. J. Ethnopharm. 2005;100:72-79.

da Cunha-Júnior EF, Pacienza-Lima W, Ribeiro GA, Netto CD, do Canto-Cavalheiro MM, da Silva AJ, Costa PR, Rossi-Bergmann B, Torres-Santos EC. Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphtopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. J. Antimicrob Chemother. 2011;66:1555-1559.

Dalmau, SR, Freitas CS, Savino W. Upregulated expression of fibronectin receptors underlines the adhesive capability of thymocytes to thymic epithelial cells during the early stages of differentiation: Lesson from sublethally irradiated mice. Blood. 1999;93:974-990.

de Sá Bacelar T, da Silva AJ, Costa PR, Rumjanek VM. The pterocarpanquinone LQB 118 induces apoptosis in tumor cells through the intrinsic pathway and the endoplasmic reticulum stress pathway. Anticancer Drugs. 2013;24:73-83.

de Souza Reis FR, de Faria FC, Castro CP, de Souza PS, Vasconcelos FD, Bello RD, da Silva AJ, Costa PR, Maia RC. The therapeutical potential of a novel pterocarpanquinone LQB-118 to target inhibitor of apoptosis proteins in acute myeloid leukemia cells. Anticancer Agents Med. Chem. 2012 Epub ahead of print.

Dewich PM, Iso-flavonoids, in: J.B. Harborne (Ed.), The Flavonoids: Advances in Research Since 1980, Chapman and Hall, London, 1988, 125–204.

Dinkova-Kostova AT, Talalay P. NAD(P)H:quinona acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. Arch Biochem Biophys. 2010;501:116-123.

Dixon RA, Summer LW. Legume natural products: Understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. Plant Physiol 2003;131:878–885.

Duvoix A, Delhalle S, Blasius R, Schnekenburger M, Morceau F, Fougère M, Henry E, Galteau MM, Dicato M, Diederich M. Effect of chemopreventive agents on gluthathione S-transferase P1-1 gene expression mechanisms via activating protein 1 and nuclear factor KappaB inhibition. *Bioch Pharmacol.* 2004;68:1101-1111.

Duyao, M.P., Buckler, A.J., Sonenshein, G.E. Interaction of an NF-κB-like factor with a site upstream of the c-myc promoter. Proc Natl Acad Sci USA. 1990;87:4727-4731.
Emori T, Kitamura K, Okazaki K. Nuclear Smad7 overexpressed in mesenchymal cells acts as a transcriptional corepressor by interacting with HDAC-1 and E2F to regulate cell cycle. Biol Open. 2012;15:247-260.

Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. Nature. 2001;411:343-348.

Fernandez PC, Frank SR, Wang L, Schroeder M, Liu S, Greene J, Cocito A, Amati B. Genomic targets of the human c-Myc protein. Genes Dev. 2003;17:1115-1129.

Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, Padgett KM, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. J Cell Sci 2002;115:575–585.
Frand AR, Cuozzo JW, Kaiser CA. Pathways for protein disulphide bond formation.Trends Cell Biol. 2000;10:203-210.

Futreal PA, Kasprzyk A, Birney E, Mullikin JC, Wooster R, Stratton MR. Cancer and genomics. Nature. 2001; 409:850-852.

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU,Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012.Cell death Difer. 2012;191:107-120.

Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan NG, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredesen DE, Brenner C, Castedo M, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, De Laurenzi V, De Maria R, Deshmukh M, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Flavell RA, Fulda S, Garrido C, Golstein P, Gougeon ML, Green DR, Gronemeyer H, Hajnóczky G, Hardwick JM, Hengartner MO, Ichijo H, Jäättelä M, Kepp O, Kimchi A, Klionsky DJ, Knight RA, Kornbluth S, Kumar S, Levine B, Lipton SA, Lugli E, Madeo F, Malomi W, Marine JC, Martin SJ, Medema JP, Mehlen P, Melino G, Moll UM, Morselli E, Nagata S, Nicholson DW, Nicotera P, Nuñez G, Oren M, Penninger J, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Prehn JH, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rizzuto R, Rodrigues CM, Rubinsztein DC, Rudel T, Scorrano L, Simon HU, Steller H, Tschopp J, Tsujimoto Y, Vandenabeele P, Vitale I, Vousden KH, Youle RJ, Yuan J, Zhivotovsky B, Kroemer G. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotic. Cell Death Differ. 2009;16:1093-1107.

Galluzzi L, Joza N, Tasdemir E, Maiuri MC, Hengartner M, Abrams JM, Tavernarakis N, Penninger J, Madeo F, Kroemer G. et al. No death without life: vital functions of apoptotic effectors. Cell Death Differ. 2008;15:1113-1123.

Gan HK, Kaye AH, Luwoe RB. The EGFRvIII variant on glioblastoma multiforme. J Clin Neurosci. 2009;16:748-754.

Gardner L, Lee L, Dang C. Myc oncogene. In: Bertino JR, editors. Encyclopedia of cancer. 2nd ed. Orlando: Academic Press; 2002.

Gavet O, Pines J. Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. J Cell Biol. 2010;189:247-259.

Giard DJ, Aaronson AS, Todaro GJ, Arnstein P, Kersev JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. J Natl Cancer Inst. 1973;51:1417-23.

Golias, C.H., Charalabopoulos, A., Charalabopoulos, K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. Int J Clin Pract. 2004;58:1134-1141.

Gomathinayagm R, Mardhatillah F, Kumar R, Akbarsha MA, Damodaran C. Anticancer mechanism of plumbagin, a natural compound, on non-small cell lung cancer cells. 2008;28:785-792.

Gonzaga IM, Soares-Lima SC, de Santos PT, Blanco TC, de Reis BS, Quintella DC, de Oliveira IM, de Faria PA, Kruel CD, Andreollo NA, de Simão TA, Pinto LF. Alterations in epidermal growth fator receptors 1 and 2 in esophageal squamous cell carcinomas. BMC Cancer. 2012;12:569-579.

Goodman e Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica, 12ª edição, Ed. Mcgrawhill Interamericana, 2012.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Apoptosis: Programmed Cell Death. Revista Brasileira de cancerologia. 2007;53:335-343.

Guimarães CA, Linden R. Programmed cell death. Apoptosis and alternative deathstyles. Eur. J. Biochem. 2004;271:1638-1650.

Gupta S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. Int J Oncol. 2003;22:15-20.

Harbone JB, Mabry JJ, Mabry H. The flavonoids, Chapman and Hall, London, 1975.

Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interaction that progressively block Rb functions as cells move through G1. Cell. 1999;98:859-869.

Harley ME, Allan LA, Sanderson HS, Clarke PR. Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1-cyclin B1 initiates its Cdc20-dependent destruction during mitotic arrest. EMBO J. 2010;29:2407-20.

Harper, J.W. A phosphorylation-driven ubiquitination switch for cell-cycle control. Trends Cell Biol. 2002;12:104-107.

Hsiao, Y.P., Huang, H.L., Lai, W.W., Chung, J.G., Yang, J.H. Antiproliferative effects of lactic acid via the induction of apoptosis and cell cycle arrest in a human keratinocyte cell line (HaCaT). J Dermatol Sci. 2009;54:175-84.

Hsu YL, Cho CY, Kuo PL, Huang YT and Lin CC. Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) induces apoptosis and cell cycle arrest in A549 cells through p53 accumulation via c-Jun NH2-terminal kinase-mediated phosphorylation at serine 15 *in vitro* and *in vivo*. J Pharmacol and Exp Ther. 2006;318:484-494.

Huang L, Fullas F, McGiviney RJ, Brown DM, Wani MC, Wall ME, Tucker JC, Beecher CW, Pezzuto JM, Kinghirn AD. A new prenylated flavonol from the root of Ptelostemon purpureus. J Nat Prod. 1996;59:290-292.

Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. J Surg Res. 2007;139;143-156.

Hussain H, Krohn K, Ahmad VU, Miana GA, Greem IR. Lapachol: an overview. Arkivoc. 2007;2:145-171.

INCA, Ministério da Saúde (Brasil). Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2012.

INCA, Ministério da Saúde (Brasil). Programa nacional de controle do câncer de próstata: Documento de consenso. Rio de Janeiro, 2002.

Irish JM, Hovland R, Krutzik PO, Perez OD, Bruserud O, Gjertsen BT, Nolan PP. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in câncer cells. Cell. 2004;118:217-228.

Jamshidi M, Bartkova J, Greco D, Tommiska J, FAgerholm R, Aittomäki K, Mattson J, Villman K, Vrtel R, Lukas J, Heikkilä P, Blomqvist C, Bartek J, Nevanlinna H. NQO1 expression correlates inversely with NFκB activation in human breast cancer. Breast cancer Res. Treat. 2012;132:955-968.

Jiang J, Sugimoto Y, Liu S, Chang H, Park K, Kulp S, Lin Y. The inhibitory effects of gossypol on human prostate cancer cells-PC3 are associated with transforming growth factor beta1(TGF1) signal transduction pathway. Anticancer Res. 2004;24: 91-100.

Jiang S, Zu Y, Fu Y, Zhang Y, Efferth T. Activation of the mitochondrial-driven pathway of apoptosis in human PC-3 prostate cancer cells by a novel hydrophilic paclitaxel derivative 7-xylosyl-10-deacetylpaclitaxel. Inter. J. Oncol. 2008;22:103-111.

Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). Invest Urol. 1979;17:16-23.

Kay JG and Grinstein S. Sensing Phosphatidylserine in Cellular Membranes. 2011;11:1744-1755.

Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J, Kroemer G. Cell death assays for drug discovery. Nature Reviews. 2011;10:221-237.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinects. Br J Cancer. 1972;26:239-257.

Killilea AN, Downing KHM, Killilea DW. Zinc Deficiency reduces paclitaxel efficacy in LNCaP prostate cancer cells. Cancer Lett. 2007;258:70-79.

Kim B, Kim SH, Jeong SJ, Sohn EJ, Jung JH, Lee MH, Kim SH. Brazilin induces apoptosis and G2/M arrest via inactivation of histone deacetylase in multiple myeloma U266 cells. J Agric Fodd Chem. 2012;60:9882-9889.

Kim H, Casta A, Tang X, Luke CT, Kim AL, Bicker DR, Athar M, Christiano AM. Loss of hairless confers susceptibility to UVB-induced tumorigenesis via disruption of NF-kappaB signaling. PLoS One. 2012;7:e39691.

Kretschemer N, Rinner B, Deutsch AJA, Lohberger B, Knausz H, Kunert O, Blunder M, Boechzelt H, Chaider H, Bauer R. Naphtoquinones from Onosma paniculata induce cell-cycle arrest and apoptosis in melanoma cells. J. Nat. Prod. 2012;75:865-869.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclarute Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendation of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Differ. 2009, 16: 3-11.

Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RCJr, Gansler TS, Holland JF, Frei IIIE. Cancer Medicine. 6th Edition, Hamilton (canadá), BC Decker Inc, 2003.
Kumaravel M, Sankar P, Rukkumani R. Antiproliferative effect of na analog of curcumin bis-1,7-(2-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione in human breast cancer cells. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2012;16:1900-1917.

Kumi-Diaka F. Chemosensitivity of human prostate cancer cells PC3 and LNCaP to genistein isoflavone and beta-lapachone. Biol. Cell. 2002;94:37-44.

L/Bcl-2 phosphorylation acts as a functional link coupling mitotic arrest and apoptosis. Mol Cell Biol. 2010;30:640-656.

Lavhale MS, Kumar S, Mishra SH, Sitasawad SL. A novel triterpenoid isolated from root bark of Alianthus excels Roxb (Tree of heaven), AECHL-1 as a Potential Anti-cancer Agent. PLoS One. 2009;4: e5365.

Le Marchand L. Cancer preventive effects of flavonoids – a review. Biomed and Pharmacotherp. 2002;56:296-301.

Lee JH, Cheong J, Park YM, Choi YH. Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by beta-lapachone in human prostate carcinoma cells. Pharmacol Res. 2005;51:553-60.

Lee JTJr, Steelman LS, McCubrey JA. Phosphatidylinositol 3'-kinase activation leads to multidrug resistance protein-1 expression and subsequent chemoresistance in advanced prostate cancer cells. Cancer Res. 2004;64:8397-404.

Leonti M, Casu L, Gertsh J, Bonsignore L, Floris C, Casu M, Cottiglia F. A pterocarpan from the seeds of *Bituminaria morisiana*. J Nat Med. 2010;64:354-357.

Li B, Xu H, Li Z, Yao M, Xie M, Shen H, Shen S, Wang X, Jin Y. Bypassing multidrug resistance in human breast cancer cell with lipid/polymer particle assemblies. Int. J Nanomedicine. 2012;7:187-197.

Li CJ, Averboukh L, Pardee AB. Beta-Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. J Biol Chem. 1993; 268:22463-22468.

Li CJ, Li YZ, Pinto AV, Pardee AB. Potent inhibition of tumor survival in vivo by beta-lapachone plus taxol combining drugs impose different artificial checkpoints. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999;96:13369-13374.

Li YZ, Li CJ, Pinto AV, Pardee AB. Release of mitochondrial cytochrome c in both apoptosis and necrosis induced by beta-lapachone in human carcinoma cells. Mol Med. 1999;5:232-239.

Li Z, Li J, Mo B, Hu C, Liu H, Qi H, Wang X, Xu J. Genistein induces G2/M cell cycle arrest via stable activation of ERK1/2 pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells. Cell Biol Toxicol. 2008;24:401-409.

Li ZM, Liu ZC, Guan ZZ, Zhu XF, Zhou JM, Xie BF, Feng GK, Zhu ZY, Jiang WQ. Inhibition of DNA primase and induction of apoptosis by 3,3´-diethyl-9-methylthia-carbocyanine iodide in hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells. World Gastroenterol. 2004;10:514-520.

Linard MCF, Oliveira MM, Sampaio MRP. A Lapachol Derivative Active against Mouse Lymphocytic Leukemia P-388. J Med Chem. 1975;18:1159-1161.

Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. Cell Mol Life Sci 2001;58:931–959.

Liu CJ, Deavours BE, Richard SB, Ferrer JL, Blount JW, Huhman D, Dixon RA, Noel JP. Structural basis for dual functionality of isoflavonoid O-methyltransferases in the evolution of plant responses. Plant Cell. 2006;18:3656-3669.

Liu F, Yu G, Wang G, Liu H, Wu X, Wang Q, Liu M, Liao K, Wu M, Cheng X, Hao H. An NQO-1initiated and p53-independent apoptotic pathway determines the anti-tumor effect of tanshinone IIA against non-small cell lung cancer. PLoS One. 2012;7:e42138.

Liu H, Liu Y, Liu Y, Xu A, Young CYF, Yuan H, Lou H. A novel anticancer agent, retigeric acid B, display proliferation inhibition phase arrest and apoptosis activation in human prostate cancer cells. Chem Biol Inter. 2010;188:598-606.

Liu SY, Song SX, Lin L, Liu X. Molecular mechanism of cell apoptosis by paclitaxel and pirarubicin in a human osteosarcoma cell line. Chemotherapy. 2010;56:101-107.

Ludwig-Galezowska AH, Flanagan L, Rehm M. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain, a multifunctional modulator of cell death. J Cell Mol Med. 2011;15:1044-1053.

Lutz W, Leon J, Eilers M. Contributions of Myc to tumorigenesis. Biochim Biophys Acta. 2002;1602:61-71.

Lynch JH, Batuello JT, Crawford ED, Gomella LG, Kaufman J. Petrylak DP, Joel AB. Therapeutic strategies for localized prostate cancer. Rev. Urol. 2001;2:39-48.
Ma YE, Hendershot LM. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat*. 2004;28:51-65.

Malumbres M., Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. Trends Biochem Sci. 2005;30:630-641.

Marconett CN, Morgenstern TJ, San Roman AK, Sundar SN, Singhal AK, Firestone G. BZL 101, a phytochemical extract from the Scutellaria barbata plant, disrupts proliferation on human breast and prostate cancer cells trhough distinct mechanisms dependent on the cancer cell phenotype. Cancer Biol and Therp. 2010;4:397-405.

Matsui J, Kiyokawa N, Takenouchi H, Taguchi T, Suzuki K, Shiozawa N, Saito M, Tang WR, Katagiri YU, Okita H, Fugimito, J. Dietary bioflavonoids induces apoptosis in human leukemia cells. Leuk. Res. 2005;29:573-581.

McGowan CH.Regulation of the eukaryotic cell cycle. Prog Cell Cycle Res. 2003;5:1-4.

Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. Nature Reviews Cancer. 2008; 8:976–990.

Mi Q, Lantvit D, Reyes-Lim E, Chai H, Zhao W, Lee IS, Sánchez SP, Ngassapa O, Farnsworth NR, Cordell GA, Kinghorn AD, Pezzuto JM. Evaluation of the potetion cancer chemotherapeutic efficacy of natural product isolates employing *in vivo* hollow fiber tests. J Nat Prod. 2002;65:842-850.

Militão GC, Pinheiro SM, Dantas IN, Pessoa C, de Moraes MO, Costa-Lotufo LC, Lima MA, Silveira ER. Bioassay-guided fractionation of pterocarpans from roots of *Harpalyce brasiliana* Benth. Bioorg Med Chem. 2007;15:6687-6691.

Militão GCG, Dantas INF, Pessoa C, Falcão MJC, Silveira ER, Lima MAS, Curi R, Lima T, Moraes MO, Costa-Lotufo LV. Induction of apoptosis by pterocarpans from Platymiscium floribundum in HL-60 human leukemia cells. 2006;78:2409-2417.

Morrison WB. Inflammation and cancer: a comparative view. J Vet Intern Med. 2012;26:18-31.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol. Methods. 1983;65:55-63.

Murata IC, Itoigawa M, Nakao K, Kumagai M, Kaneda N, Furukawa H. Induction of apoptosis by isofl avonoids from the leaves of *Millettia taiwaniana* in human leukemia HL-60 cells. Planta Med. 2006;72:424–429.

Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. Cell. 2004;116:221-234.

Netto CD, da Silva AJ, Salustiano EJ, Bacelar TS, Rica IG, Cavalcante MC, Rumjanek VM, Costa PR. New Pterocarpanquinones: synthesis, antineoplasic activity on cultured human malignant cell lines and TNF-a modulation in human PBMC cells. Bioorg Med Chem 2010;18:1610–1616.

Netto CD, Salustiano EJS, Castro CP, da Silva AJM, Rumjanek VM, Costa PRR. (+)-3,4-Dihydroxy-8-9-methylenedioxypterocarpan and derivatives: Cytotoxic effects on human leucemia cell lines. Europ J Med Chem (short communication). 2009; 44:9920-925.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J. Nat. Prod. 2007;70:461–477.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products of therapeutic importance. Compr. Nat. Prod. II 2010;2:623–650.

Nooter K, Westerman AM, Flens MJ, Zaman GJR, Scheper RJ, van Wingerden KE, Burguer H, Oostrum R, Boersma T, Sonneveld P, Gratama JW, Kok T, Eggermont AMM, Bosman FT, Sloter G. Expression of multidrug resistance- associated protein (MRP) gene in human cancers. Eur. J Cancer. 1999;35:664-671.

Ocker M, Höpfner M. Apoptosis-modulating drugs for improved cancer therapy. Eur Surg Res. 2012;48:111-120.

Pardee A. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. 1974;71:1286-1290.

Park MT, Lee SJ. Cell cycle and cancer. Journal of Biochemistry and Mol. Biol. 2003; 36:60-65.

Peng L, Khan N, Afaq F, Ye C, Mukhtar H. *In Vitro* and *In Vivo* Effects of Water Extract of White Cocoa Tea (*Camellia ptilophylla*) Against Human Prostate Cancer. Pharm Res. 2010;27:1128–1137.

Perdiguero E, Nebreda AR. Regulation of Cdc25C activity during the meiotic G2/M transition. Cell Cycle. 2004;3:733-737.

Pereira DG. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. Quim Nova. 2007;30:171-177.

Pereira MF, Martino, T, Dalmau SR, Alabano RM, Férézou JP, Costa SS, Coelho, MG, Sabino, KG. Terpenic subfractions of Pterodon pubescens induces apoptosis of K562 leukmic cells by modulating gene expression. Oncol Rep. 2011;25:215-221.

Piñeiro D, González VM, Salinas M, Elena MM. Analysis of the protein expression changes during taxol-induced apoptosis under translation inhibition conditions. Mol Cell Biochem. 2010;345:131-144.

Planchon SM, Pink JJ, Tagliarino C, Bornman WG, Varnes ME, Boothman DA: β-Lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells: Involvement of NQO1/xip3 Experimental Cell Research. 2001;267:95-06.

Polanski Z, Homer H, Kubiak JZ. Cyclin B in mouse oocytes and embryos: importance for human reproduction and aneuploidy. Results Probl Cell Differ. 2012;55:69-91.

Robbins & Cotran. Patologia: bases patológicas das doenças. 8ª ed. Editora Elsevier – Campus; 2012.

Robinson DN. Cell division: Biochemically controlled mechanism. Curr Biol. 2001;11: 737-740.

Rocha DD, Militão GC, Veras ML, Pessoa OD, Silveira ER, Alves AP, de Moraes MO, Pessoa C, Costa-Lotufo LV. Selective cytotoxicity of withaphysalins in myeloid leukemia cell lines versus peripheral blood mononuclear cells. Life Sci. 2006;79:1692-1701.

Sacco JJ, Coulson JM, Claque MJ, Urbé S. Emerging roles of deubiquitinases in cancer-associated pathways. IUBMB Life. 2010;62:140-157.

Saleem M, Murtaza I, Witkowsky O, Kohl. AM. Lupeol Triterpene, A Novel Diet-based Microtubule Targeting Agent: Disrupts Survivin/cFLIP Activation in Prostate Cancer Cells Biochem Biophys Res Commun. 2009;388:576–582.

Sánchez C, Mendoza P, Contreras HR, Vergara J, McCubrey JA, Christian Huidobro, Castellón EA. Expression of multidrug resistance proteins in prostate câncer is related with cell sensitivity to chemotherapeutic drugs. Prostate. 2009;69:1448-1459.

Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. Science 1999;283:1488–1493.

Seo J, Kim BS, Chun Sym Park YK, Kang KS, Kwon TG. Apoptotic effects of genistein, biochanin-A and apigenin on LNCaP and PC3 cells by p21 through transcriptional inhibition of polo-like kinase-1. J Korean Med Sci. 2011;26:1489-1494.

Sharifi N. The 5α-androstanedione pathway to dihydrotestosterone in castration-resistant prostate cancer. J Investig Med. 2012;60:504–507.

Shi Y. A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. Nat Struct Biol. 2001;8: 394–401.

Shiau AK, Massari ME, Ozbal CC. Back to basics:label-free technologies for small molecule screening. Comb. Chem. High Throughput Screen. 2008;11:231-237.

Slichenmyer WJ and Von Hoff DD: Taxol: a new and effective anti-cancer drug. Anticancer Drugs. 1991;2:519-530.

Sodir NM, Evan GI. Finding cancer's weakest link. Oncotar. 2011;2:1307-1313.

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. J. Natl Cancer Inst. 1973;51:1409-1416.

Stone KR, Micky DD, Wunderli H, Mickey GH, Pailson DF. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU145). Int J Cancer. 1978;21:274-281.

Swanton C. Cell-cycle targeted therapies. Lancet Oncol. 2004;5:27-36.
Takeda M, Mizokami A, Mamiya K, Li YQ, Zhang J, Keller ET, Namiki M. The establishment of two paclitaxel-resistant prostate cancer cell lines and the mechanisms of paclitaxel resistance with two cell lines. Prostate. 2007;67:955-967.

Talluri S, Dick FA. Regulation of transcription and chromatin structure by pRB: here, there and everywhere. Cell Cycle. 2012;11:3189-3198.

Tanagho, Emil A., McAninch Jach W. Urologia Geral de Smith- 16ª ed.- Barueri, SP: Manole, 2007; 406-414.

Terrano DT, Upreti M, Chambers TC. Cyclindependent kinase 1-mediated Bcl-xL/BCL-2 phosphorylation acts as a functional link coupling mitotic arrest and apoptosis. Mol Cell Biol. 2010;30:640-656.

Traish AM, Morgentaler A. Epidermal growth factor receptor expression escapes androgen regulation in prostate cancer: a potencial molecular switch for tumor growth. Br. J cancer Ther. 2009;101:1949-1956.

Ullmannová V, Stockbauer P, Hradcova M, Soucek J, Haskovec C. Relationship between cyclin D1 and $p21^{Waf1/Cip1}$during differentiation of human myeloid leukemia cell lines. Leuk Res. 2003;27:1115-1123.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell Prolif. 2003;36: 131-149.

Vickers AJ, Roobol MJ, Lilja H. Screening for Prostate Cancer: Early Detection or Overdetection? Annu Rev Med. 2012;63:161–170.

Wang K, Ohnuma S. Chain-length determination mechanism of isoprenyl diphosphate synthases and implications for molecular evolution. Trends Biochem Sci 1999;24:445-451.

Wang T, Lv JH, Zhang XF, Li CJ, Han X, Sun YJ. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects MCF-7 breast cancer cells from paclitaxel-induced apoptosis by decreasing the stability of cyclin B1. Int J Cancer. 2010;126:362-370.

Weiss, R.H., Joo, A., and Randour, C. p21Waf1/Cip1 is an assembly factor required for PDGF-induced vascular smooth muscle cell proliferation. J. Biol. Chem. 2000; 275:10285–10290.

White J, Dalton S. Cell cycle control of embryonic stem cells. Stem Cell Rev. 2005; 1:131–138.

WHO. [homepage na Internet]. National Cancer Institute. [acesso em 2012 Nov 13] Disponível em: www.cancer.gov.

WHO. [homepage na Internet]. National Cancer Institute. [acesso em 2013 Jan 20] Disponível em: http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/prostate/page2

Wolfer A, Ramaswamy S. MYC and Metastasis. Cancer Res. 2011; 71: 2034-2037.

Xiong, H., Su, W.Y., Liang, Q.C., Zhang, Z.G., Chen, H.M., Du, W., Chen, Y.X., Fang, J.Y. Inhibition of STAT5 induces G1 cell cycle arrest and reduces tumor cell invasion in human colorectal cancer cells. Lab Invest. 2009;89:717-725.

Yang XG, Bao YL, Huang YX, Sun LG, Zhang YW, Yu CL, Wu Ym Li YX. 6-[(1-naphtylmethyl)sulfanyl]-9H-purine induces G2/M phase arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. Eur J Pharmacol. 2012;695:27-33.

Yared JA, Tkaczuk KH. Update on taxane development: new analogs and new formulations. Drug Des. Devel. Ther. 2012;6:371-384.

Yokoyama A, Okabe-Kado J, Sakashita A, Maseki N, Kaneko Y, Hino K, Tomoyasu S, Tsuruoka N, Kasukabe T, Honma Y. Differentiation inhibitory factor nm23 as a new prognostic factor in acute monocytic leukemia. Blood. 1996;88:3555-3561.

Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yuri D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor

necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to ER stress. J Biol Chem. 2001;276:13935-13940.

Zhang G, Fang L, Zhu L, Zhong Y, Wang PG, Sun D. Syntheses and Biological Activities of 3'-Azido Disaccharide Analogues of Daunorubicin against Drug-Resistant Leukemia. J Med Chem. 2006;49:1792-1799.

Zhang HS, Postigo AA, Dean DC. Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4, TGFb and contact inhibition. Cell. 1999;97:53-61.

Zhao R, Xiang N, Domann FE, Zhong W. Effects of selenite and Genistein on G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human prostate cancer cells. Nutr. Cancer. 2009; 61:397-407.

Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. News Physiol Sci. 2004;19:124-128.