



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Rachell Ramalho Correia Thimoteo

**Estudo *in vitro* dos mecanismos de ação antitumoral do composto
LQB-461 em células de leucemia Jurkat**

Rio de Janeiro

2021

Rachell Ramalho Correia Thimoteo

Estudo *in vitro* dos mecanismos de ação antitumoral do composto LQB-461 em células de leucemia Jurkat

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

Orientadora: Prof^ª. Dra. Tatiana de Almeida Simão
Coorientadora: Prof^ª. Dra. Maria da Graça Justo Araujo

Rio de Janeiro

2021

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

T443 Thimóteo, Rachell Ramalho Correia.
Estudo *in vitro* dos mecanismos de ação antitumoral do composto LQB-461 em células de leucemia Jurkat / Rachell Ramalho Correia Thimóteo. - 2020.
157f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Tatiana de Almeida Simão
Coorientadora: Prof.^a Dra. Maria da Graça Justo Araujo

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

1. Leucemia – Teses. 2. Células Jurkat . 3. Apoptose - Teses. 4. Transcriptoma. I. Simão, Tatiana de Almeida. II. Araujo, Maria da Graça Justo. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.155.392-036.12

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Rachell Ramalho Correia Thimoteo

Estudo *in vitro* dos mecanismos de ação antitumoral do composto LQB-461 em células de leucemia Jurkat

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

Aprovada em 10 de agosto de 2021.

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Maria da Graça Justo Araujo

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dra. Tatiana de Almeida Simão (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. André Luiz Mencialha

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Heitor Siffert Pereira de Souza

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Vivian Mary Rumjanek

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu filho Joaquim e ao meu marido Djan, que estão sempre ao meu lado, me oferecendo apoio e estímulo em todos os momentos. O amor de vocês é minha maior motivação, sem ele muitas das minhas realizações acadêmicas não seriam possíveis.

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu filho Joaquim, que é a luz dos meus dias, minha força motivadora e meu bem mais precioso. Agradeço a paciência em dividir desde tão cedo a sua mãe com a ciência.

Ao meu marido Djan, por todo amor, apoio, força e motivação nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Fátima e Francisco, meu irmão Raphael, minha cunhada Maiara, meus primos e primas, tios e tias, enfim, todos os meus familiares, que me ofereceram suporte, força, carinho e motivação. Quero deixar um agradecimento especial à minha mãe pelo cuidado com o meu filho Joaquim enquanto eu me dedicava a este estudo.

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

À minha nova família Thimóteo, qual fui recebida de coração e braços abertos. Minha sogra Vera e meu sogro Djalma, meus tios Mauro e Ane, meu cunhado Daniel que sempre estiveram ao meu lado. O carinho, amor e apoio de todos os novos primos, tios, sogros e sobrinhos foram fundamentais por toda essa caminhada.

Aos amigos, da faculdade, pós-graduação e de vida, pelo companheirismo, apoio e pelos momentos de descontração ao longo do desenvolvimento da tese. Um agradecimento especial à minhas irmãs de coração Alessandra e Karen, que completamos esse ano 28 anos de amizade recheados de muito amor e companheirismo.

Aos amigos de trabalho, à professora Kátia e à Shirley, por toda sua amizade e carinho sempre presentes, a Márcia, Paulinho e Beto, por toda força na correria do dia a dia, a Jennifer, por toda a força e ajuda, a Thayane, Thaíssa, professora Marsen, além de todo o grupo de pesquisa, que sempre tornam o ambiente de trabalho uma segunda casa, com muito carinho, companheirismo e momentos de descontração.

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

Aos professores Dr. Ayres Guimarães Dias, do Instituto de Química da UERJ, e Dr. Paulo Roberto Ribeiro Costa, do Instituto de Pesquisa em Produtos Naturais, da UFRJ, pela

síntese e doação do LQB-461 e discussões sempre oportunas e importantes durante o desenvolvimento deste trabalho. Ao professor André Luiz Mencialha, do Departamento de Biofísica da UERJ, por toda ajuda, disposição e colaboração, sem o seu suporte para realizar os ensaios de transcriptoma não conseguiríamos realizar muitos dos objetivos almejados. Ao Pedro Nicolau Neto, do Programa de Carcinogênese Molecular do INCA pelo auxílio na execução do Transcriptoma, nas discussões de bioinformática e todo aprendizado.

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

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

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

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

Isaac Newton

RESUMO

THIMÓTEO, Rachell Ramalho Correia. **Estudo *in vitro* dos mecanismos de ação antitumoral do composto LQB-461 em células de leucemia Jurkat.** 2021. 175 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2021.

As leucemias se destacam como o principal tipo de câncer infantil no mundo e os atuais tratamentos apresentam fortes efeitos colaterais, havendo ainda possibilidade do desenvolvimento de resistência à terapia. Diversas pesquisas buscam desenvolver novas moléculas híbridas que apresentem melhor eficácia terapêutica. Estudos prévios relacionados à estrutura-atividade antileucêmica *in vitro* de análogos do LQB-278, destacou o LQB-461 (híbrido benzaldeído e cinamoil com injeção de um grupamento nitro) devido à potencialização dos seus efeitos, e aumento de p21, com inibição da proliferação sem induzir morte (2 e 3 μM), ou acompanhado de morte por apoptose (5 μM). Neste contexto, este trabalho avaliou os mecanismos de ação de LQB 461 envolvidos nos seus efeitos citostático e indutor de apoptose em células Jurkat. Para análise dos genes e vias envolvidas nos mecanismos de ação do LQB-461 realizou-se um ensaio de transcriptoma (Microarranjo). A expressão do gene *CDKN1A* (que codifica o p21) se mostrou aumentada, confirmado por PCRq ($p < 0,01$) com 5 μM . Observou-se também aumento ($p < 0,05$) de processos biológicos indutores de apoptose (3 e 5 μM), destacando-se a via intrínseca de apoptose. Através da citometria de fluxo (FACS), demonstrou-se aumento significativo da razão Bax/Bcl-2 nas três concentrações testadas, com alterações de Bax ($p < 0,05$) e Bcl-2 ($p < 0,001$) também observadas por PCRq em algumas concentrações. O tratamento com LQB-461 aumentou ($p < 0,001$) a expressão do receptor Fas e a caspase-3 ativa ($p < 0,001$) com 5 μM , por FACS. Através do transcriptoma, observamos inibição ($p < 0,05$) de processos biológicos de síntese proteica (3 μM), e regulação negativa para mediadores da via do mTOR, principal reguladora da proliferação e tradução de proteínas. Ensaio preliminar por *Western Blotting* (WB) sugerem diminuição da razão mTOR-P/mTOR (3 μM). Pela mesma técnica, o LQB-461 parece aumentar (com 2 e 3 μM) a expressão da proteína S6KP70, indutora de síntese de proteínas, e diminuí-la com 5 μM . No transcriptoma, encontramos expressão diminuída do gene *RPS6KB1*, codificador da isoforma S6K1, ativada pelo mTOR, com LQB-461 a 3 μM e 5 μM . Ainda por WB, a proteína RB1, inibidora da via Akt/mTOR, parece ter sua expressão aumentada em 2 e 3 μM e diminuída em 5 μM . A modulação da autofagia também foi avaliada, por poder promover apoptose, resistência e proliferação. O transcriptoma mostrou aumento ($p < 0,05$) de processos biológicos autofágicos (3 μM) e inibição (5 μM). Observou-se também, por WB, expressão aumentada ($p < 0,05$) do marcador autofágico LC-3, (2 e 3 μM), e diminuída ($p < 0,001$) em 5 μM . Concluindo, o LQB-461 promove um efeito citostático em células Jurkat (3 μM), inibindo a proliferação, através da diminuição da síntese de proteínas. A apoptose não é observada nesta concentração, sugerindo atuação de mecanismos de resistência celular, dentre eles a autofagia. Na maior concentração (5 μM), o LQB-461 parece inibir mecanismos autofágicos, ativando as vias intrínseca e extrínseca de apoptose de forma caspase dependente. O LQB-461 parece atuar em múltiplos mecanismos de ação, destacando-se como uma alternativa promissora no tratamento das leucemias linfocíticas agudas.

Palavras-chave: Proliferação celular. Apoptose. Transcriptoma. Benzaldeído. Cinamalaldeído.

ABSTRACT

THIMÓTEO, Rachell Ramalho Correia. *In vitro* study of the antitumor mechanism of action of compound LQB-461 in leukemia Jurkat cells. 2021. 175 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2021.

Leukemias stand out as the main type of childhood cancer in the world and current treatments have strong side effects, with the possibility of developing therapy resistance. Several researches seek to develop new hybrid molecules that present better therapeutic efficacy. Previous studies related to the *in vitro* antileukemic structure-activity of LQB-278 analogues, highlighted the LQB-461 (benzaldehyde and cinnamoyl hybrid with insertion of a nitro group) due to its potentiated effect and increase of p21, with inhibition of proliferation without inducing death (2 and 3 μM), or accompanied by death by apoptosis (5 μM). In this context, this work evaluated the mechanisms of action of LQB 461 involved in its cytostatic and apoptosis-inducing effects in Jurkat cells. To analyze the genes and pathways involved in the mechanisms of action of LQB-461, a transcriptome assay was performed (Microarray). The expression of the *CDKN1A* gene (which encodes p21) was increased, confirmed by PCRq ($p < 0.01$) with 5 μM . An increase ($p < 0.05$) of apoptosis-inducing biological processes (3 and 5 μM) was also observed, highlighting the intrinsic apoptosis pathway. Through flow cytometry (FACS), a significant increase in the Bax/Bcl-2 ratio was demonstrated at tested concentrations, with changes in Bax ($p < 0.05$) and Bcl -2 ($p < 0.001$) also observed by RT-PCR at some concentrations. Treatment with LQB-461 increased ($p < 0.001$) the expression of Fas receptor and active caspase-3 ($p < 0.001$) with 5 μM , by FACS. Through the transcriptome, we observed inhibition ($p < 0.05$) of biological processes related to protein synthesis (3 μM), and negative regulation for mediators of the mTOR pathway, the main regulator of cell proliferation and protein translation. Preliminary *Western Blotting* (WB) assays suggest a decrease in the mTOR-P/mTOR (3 μM) ratio. By the same technique, LQB-461 seems to increase (with 2 and 3 μM) the expression of the S6KP70 protein, which induces protein synthesis, and decrease it at 5 μM . In the transcriptome, we found reduced expression of the *RPS6KB1* gene, encoding the S6K1 isoform, activated by mTOR, at LQB-461 3 μM and 5 μM . Also by WB, the RB1 protein, which inhibits the Akt/mTOR pathway, seems to have its expression increased at 2 and 3 μM and decreased at 5 μM . Modulation of autophagy was also evaluated, as it can promote apoptosis, resistance and proliferation. The transcriptome showed an increase ($p < 0.05$) of autophagic biological processes (3 μM) and inhibition (5 μM). We also observed, by WB, increased ($p < 0.05$) expression of the autophagic marker LC-3 at 2 and 3 μM , and decreased one at 5 μM ($p < 0.001$). In conclusion, LQB-461 promotes a cytostatic effect in Jurkat cells (3 μM), inhibiting proliferation, by decreasing protein synthesis. Apoptosis is not observed at this concentration, suggesting action of cellular resistance mechanisms, including autophagy. At the highest concentration (5 μM) LQB-461 seems to inhibit autophagic mechanisms, activating the intrinsic and extrinsic apoptosis pathways in a caspase-dependent manner. LQB-461 seems to act in multiple mechanisms of action, standing out as a promising alternative in the treatment of acute lymphocytic leukemia.

Keywords: Cell proliferation. Apoptosis. Transcriptome. Benzaldehyde. Cinnamaldehyde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação espacial das taxas de leucemias ajustadas (População padrão mundial - 1960) de incidência por 100 mil homens e mulheres, estimadas para o triênio 2020-2022 segundo Unidade da Federação, INCA, 2020.....	18
Figura 2 –	Hematopoiese normal.....	19
Figura 3 –	Etapas do tratamento da Leucemia Linfocítica Aguda (LLA)	23
Figura 4 –	Esquema ilustrativo e simplificado das técnicas de hibridização e bioisosterismo	25
Figura 5 –	Estrutura química da terpenila-nitrona LQB-278 e do seu análogo cíclico LQB-461	28
Figura 6 –	Visão geral das vias extrínseca e intrínseca de apoptose	32
Figura 7 –	Resumo ilustrativo dos processos de macroautofagia, microautofagia, e autofagia mediada por chaperonas	35
Figura 8 –	Resumo ilustrativo da indução da proliferação via PI3K/ AKT /mTOR....	39
Figura 9 –	Agrupamento de genes por <i>heatmap</i> do ensaio de microarranjo na investigação dos efeitos do LQB-461 em células Jurkat <i>in vitro</i>	62
Figura 10 –	Seleção de genes com expressão regulada positivamente e negativamente em relação ao controle após o tratamento com o LQB-461.....	63
Figura 11 –	- Representação gráfica da porcentagem dos genes envolvidos na morte celular por apoptose.....	76
Figura 12 –	Esquematização dos genes envolvidos na via intrínseca de apoptose encontrados alterados, pelo ensaio de microarranjo, nos tratamentos das células Jurkat pelo LQB-461.....	77
Figura 13 –	Representação gráfica da porcentagem dos genes envolvidos na proliferação celular.....	80
Figura 14 –	Esquematização dos genes da via do PI3k/AKT/mTOR e síntese de proteínas encontrados alterados no ensaio de microarranjo após tratamento de células Jurkat com o LQB-461	81
Figura 15 –	Representação gráfica percentual dos genes moduladores da autofagia envolvidos com outros possíveis mecanismos de ação do LQB-461 em	

	células Jurkat	84
Figura 16 –	Esquematisação dos genes da autofagia alterados no ensaio de microarranjo após tratamento de células Jurkat com LQB-461	85
Figura 17 –	– Expressão do gene <i>CDKN1A</i> em células Jurkat tratadas com diferentes concentrações de LQB-461	87
Figura 18 –	Expressão do gene <i>CDKN1A</i> em células Jurkat tratadas com diferentes concentrações de LQB-461, por PCRq	88
Figura 19 –	Expressão gênica de <i>Bax</i> e <i>Bcl-2</i> em células Jurkat tratadas com LQB-461, por PCRq	90
Figura 20 –	Expressão das proteínas Bax e Bcl-2 em células Jurkat tratadas com LQB-461, por citometria de fluxo.....	92
Figura 21 –	Relação da expressão das proteínas Bax e Bcl-2 em células Jurkat tratadas com LQB-461, por citometria de fluxo	93
Figura 22 –	Expressão de <i>CD95/TNFRSF6</i> em células Jurkat tratadas com diferentes concentrações de LQB-461, por análise de microarranjo de DNA	94
Figura 23 –	Expressão de <i>CD95/TNFRSF6</i> em células Jurkat tratadas com LQB-461, por PCRq	95
Figura 24 –	Expressão do receptor Fas em células Jurkat tratadas com LQB-461, por citometria de fluxo	97
Figura 25 –	Efeito do tratamento com LQB-461 no tamanho e granulosidade das células Jurkat, por citometria de fluxo	98
Figura 26 –	Análise dos efeitos simultâneos do LQB-461 na indução de apoptose e expressão do receptor Fas na membrana plasmática de células Jurkat, por citometria de fluxo	100
Figura 27 –	– Expressão de caspase-3 ativa em células Jurkat tratadas com LQB-461, por citometria de fluxo	102
Figura 28 –	Razão da expressão mTOR-P/mTOR em células Jurkat tratadas com LQB-461, por <i>Western Blotting</i>	104
Figura 29 –	Expressão da proteína S6KP70 em células Jurkat tratadas com LQB-461, por <i>Western Blotting</i>	105
Figura 30 –	Expressão das isoformas do gene <i>S6kP70</i> em células Jurkat tratadas com diferentes concentrações de LQB-461, por análise de microarranjo de DNA	106

Figura 31 –	Expressão da proteína RB1 em células Jurkat tratadas com LQB-641, por <i>Western Blotting</i>	107
Figura 32 –	- Expressão de genes HDACs, HATs e DNMTs em células Jurkat tratadas com diferentes concentrações de LQB-461, por análise de microarranjo de DNA	109
Figura 33 –	Expressão da proteína LC-3a em células Jurkat tratadas com LQB-461, por <i>Western Blotting</i>	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Categorização funcional positiva dos genes pelo tratamento com LQB-461 a 3 μ M	64
Tabela 2 –	Categorização funcional negativa dos genes pelo tratamento com LQB-461 a 3 μ M	65
Tabela 3 –	Categorização funcional positiva dos genes pelo tratamento com LQB-461 a 5 μ M	67
Tabela 4 –	- Categorização funcional negativa dos genes pelo tratamento com LQB-461 a 5 μ M	68
Tabela 5 -	Categorização funcional dos genes modulados pelo tratamento com LQB-461 com ambas as concentrações de 3 e 5 μ M	69
Tabela 6 –	Categorização funcional positiva dos genes pelo tratamento com LQB-461 em ambas as concentrações de 3 e 5 μ M	70
Tabela 7 –	Categorização funcional negativa dos genes pelo tratamento com LQB-461 em ambas as concentrações de 3 e 5 μ M	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase B
APAF-1	Fator de Ativação de Apoptose 1
APE	Endonuclease purínica apiridínica humana
ATG	Genes relacionados com a autofagia
BH3	Domínio de homologia de Bcl-2
BSA	Albumina bovina
CF	Citometria de fluxo
DEPC	Dietilpirocarbonato
DISCO	Complexo de Sinalização Indutor de Morte.
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNMT	DNA-metil transferase
EndoG	Endonuclease G
ERO	Espécies reativas do oxigênio
Etop	Etoposídeo
FADD	Proteína Associada à Fas com o Domínio da Morte
GDEs	Genes diferencialmente expressos
GO	Gene Ontology
HAT	Atividade Histona Acetilase
HDAC	Atividade Histona Desacetilase
IFM	Intensidade de Fluorescência da Mediana
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LAP	Fagocitose associada à Lc3
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
lncRNAs	RNAs não codificantes longos
MDR	Resistência a múltiplas drogas

MIF	Mediana de intensidade de fluorescência
miRNAs	MicroRNAs
mTOR	Alvo mecanístico da rapamicina
mTORC1	Alvo mecanístico do complexo 1 da rapamicina
mTORC2	Alvo mecanístico do complexo 2 da rapamicina
ncRNAs	RNAs não codificantes
PBS	Salina tamponada com fosfato pH 7,4
PBN	<i>N</i> -fenil- <i>t</i> -butilnitrona
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIP3	Fosfatidil inositol 3 fosfato
PTEN	Homólogo da Fosfatase e Tensina
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
Rapa	Rapamicina
RB1	Retinoblastoma 1
SD	Desvio padrão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SP	Saponina
ssDNA	cDNA de fita simples
TAC	Console de análise de transcriptoma
TdT	Desoxinucleotidil transferase terminal
TGF- β	Fator de transformação do crescimento β
TNFR	Receptores do fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
TSC2	Complexo 2 da Esclerose Tuberosa
UDG	Uracil-DNA glicosilase
WebGestalt	WEB-based Gene set Analysis Toolkit
XIAP	Inibidor de Proteína Apoptótica Ligado ao Cromossomo X

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	OBJETIVOS	41
1.1	Objetivos específicos	41
2	MATERIAL	43
2.1	Análogos cíclicos da terpenila nitrona LQB-278	43
2.2	Linhagem celular Jurkat	43
2.3	Reagentes	44
2.4	Equipamentos e softwares	45
2.5	Material descartável e vidrarias especiais	46
3	METODOLOGIA	47
3.1	Tratamento das células Jurkat com o composto LQB-461	47
3.2	Análise do receptor Fas por citometria de fluxo	47
3.3	Análise de apoptose associada à expressão de receptor Fas	48
3.4	Expressão das proteínas Bax e Bcl-2 por citometria de fluxo	49
3.5	Análise da enzima Caspase-3 ativa por citometria de fluxo	50
3.6	Expressão das proteínas mTOR, S6KP70, RB1 e LC-3a por <i>Western Blotting</i>	51
3.6.1	<u>Extração de proteínas</u>	51
3.6.2	<u>Quantificação de proteínas</u>	51
3.6.3	<u>Análise das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida</u>	52
3.7	Análise da expressão gênica (mRNA) de <i>p21</i>, <i>Bax</i>, <i>Bcl-2</i> e <i>Fas</i>	53
3.7.1	<u>Extração de RNA</u>	53
3.7.2	<u>Síntese do DNA complementar (cDNA)</u>	54
3.7.3	<u>Reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-PCR)</u>	55
3.8	Análise do transcriptoma das células Jurkat tratadas com LQB-461 por microarranjo de DNA	57
3.9	Análise de enriquecimento dos dados do Microarranjo pelo software WEB-based Gene set Analysis Toolkit (WebGestalt)	59
3.10	Análise individual dos dados do microarranjo de DNA pela plataforma do Pubmed	60
3.11	Análise estatística	60

4	RESULTADOS	61
4.1	Análise de enriquecimento dos genes diferencialmente expressos por microarranjo	61
4.2	Análise individual dos genes diferencialmente expressos pela técnica de microarranjo de DNA	75
4.3	Efeito do LQB-461 na expressão de <i>CDKN1A</i>	86
4.3.1	<u>Validação do gene <i>CDKN1A</i> após tratamento de células Jurkat com o LQB-461</u>	87
4.4	Validações da ação do LQB-461 na via intrínseca de apoptose através de membros da família BCL-2	89
4.5	Análise da ação do LQB-461 na via extrínseca de apoptose através do receptor Fas	94
4.5.1	<u>Validações da expressão de receptor Fas</u>	95
4.6	Validação da expressão de Caspase-3 ativa após tratamento com LQB-461	101
4.7	Validações da ação do LQB-461 na modulação da proliferação pela via PI3K/AKT/Mtor	103
4.8	Efeito do tratamento com LQB-461 na modulação de mRNAs de vias relacionadas com epigenética	108
4.9	Validações do efeito do tratamento com LQB-461 no processo de autofagia	110
5	DISCUSSÃO	113
	CONCLUSÕES	138
	REFERÊNCIAS	139

INTRODUÇÃO

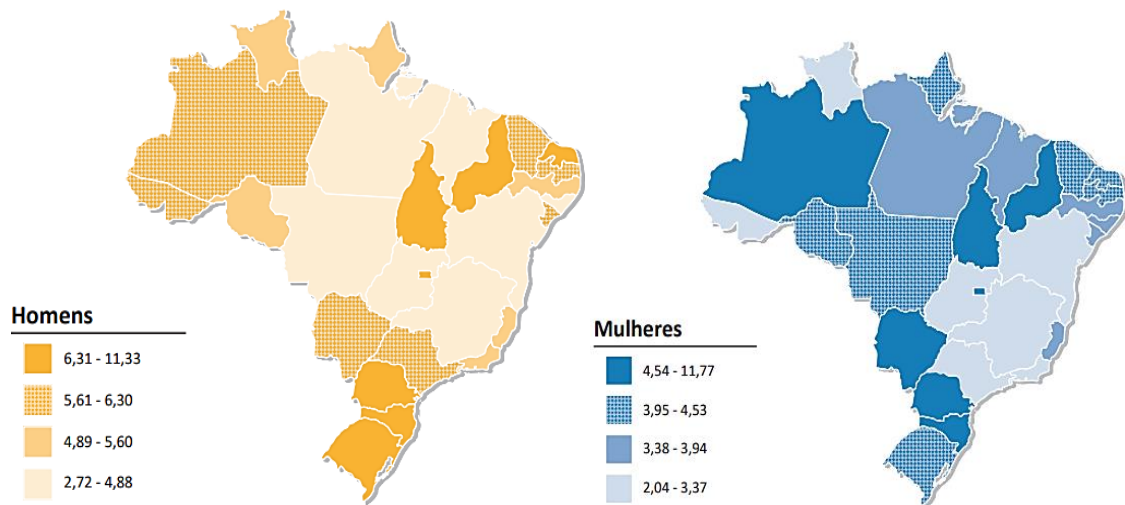
Leucemias

A leucemia é um tipo de câncer que acomete as células precursoras do sangue. Geralmente, as células do sangue que apresentam características leucêmicas são os glóbulos brancos, embora algumas leucemias também tenham início em outros tipos de células sanguíneas (Randhawa e Ferrajoli, 2015; Terwilliger e Abdul-Hay, 2017; Zhao *et al.*, 2018). É o câncer mais comum em crianças e adolescentes, respondendo por um de cada três casos diagnosticados (Zhao *et al.*, 2018), e muito se discute sobre a sua etiologia. Alguns fatores como a síndrome de Down, a exposição à radiação ionizante e exposição a vírus, como o *Epstein-Barr* vírus, estão correlacionados com o aumento de risco de leucemia em crianças (Randhawa e Ferrajoli, 2015; Terwilliger e Abdul-Hay, 2017).

Dados do INCA para cada ano do triênio 2020-2022 indicam o surgimento de quase 11 mil novos casos de leucemia no Brasil, aparecendo entre os 10 tipos de câncer mais incidentes no Brasil e no mundo (INCA, 2020). Na Figura 1, podemos observar a representação espacial das taxas de incidência de leucemias por 100 mil homens/ e mulheres estimadas para o triênio 2020-2022.

A incidência das leucemias aumenta a cada ano, ganhando destaque como principal tipo de câncer infanto juvenil no Brasil e no mundo, correspondendo a cerca de 30% dos tumores malignos que acometem essa faixa etária (0 a 19 anos) (Amitay e Keinan-Boke, 2015; Randhawa e Ferrajoli, 2015; Whitehead *et al.*, 2016; INCA, 2020; Zhao *et al.*, 2018).

Figura 1 - Representação espacial das taxas de leucemias ajustadas (População padrão mundial - 1960) de incidência por 100 mil homens e mulheres, estimadas para o triênio 2020-2022, segundo Unidade da Federação



Fonte: INCA, 2020.

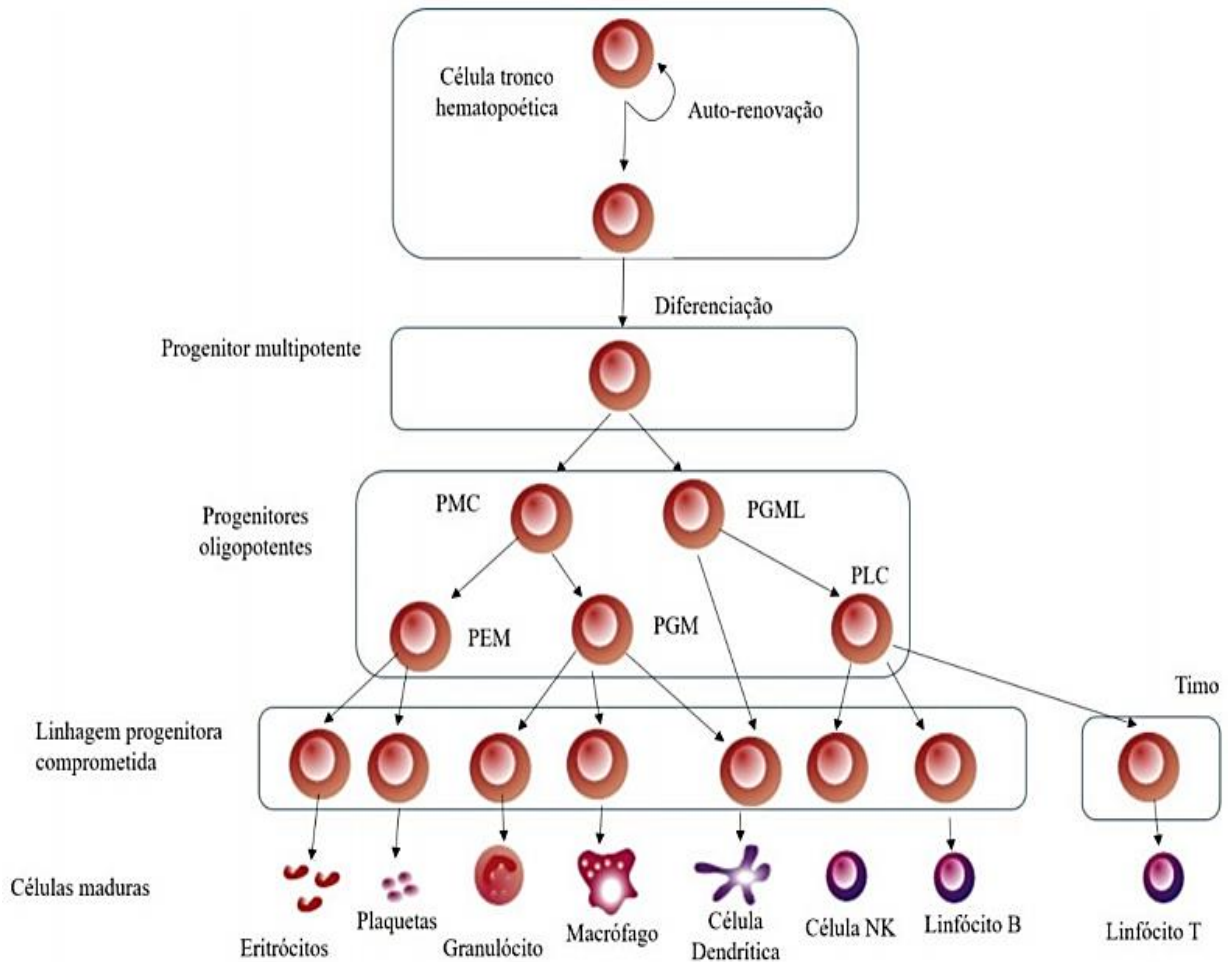
Quanto às suas classificações, as leucemias podem ser divididas pelo tipo de progressão, formas agudas e crônicas, ou pelo tipo de células que acometem, podendo ser do tipo linfocíticas ou mieloblásticas. Referente à progressão, nas formas agudas as células sanguíneas anormais possuem características de células blásticas, com desenvolvimento imaturo, não conseguindo executar suas funcionalidades de forma adequada, podendo levar aos quadros de hipogamaglobulinemia, depleção e disfunção de células T, comprometimento do sistema imune, suscetibilidade a infecções e neutropenia (Randhawa e Ferrajoli, 2015; Zhao *et al.*, 2018). Esse tipo de leucemia possui desenvolvimento rápido, e geralmente exige tratamento imediato (Zhao *et al.*, 2018).

Nas formas crônicas, também existem células com características imaturas, no entanto estas células blásticas possuem maior grau de diferenciação e podem ainda funcionar de forma consideravelmente normal. Dessa forma, a progressão das leucemias crônicas é geralmente mais lenta e o tratamento, ainda que não imediato, pode alcançar uma boa resposta clínica (Zhao *et al.*, 2018).

Em relação ao tipo de célula sanguínea afetada, nas leucemias linfocíticas as alterações malignas acontecem nas células da medula que irão originar os linfócitos. No tipo mielóide, as alterações malignas acometem as células da medula que darão origem aos glóbulos vermelhos, alguns outros tipos de glóbulos brancos e plaquetas (Zhao *et al.*, 2018). Na Figura 2 podemos

observar um exemplo de hematopoiese normal, onde vemos as células tronco mielóides e células tronco linfóides, junto com os progenitores, que se encontram alterados nos tipos de leucemias mieloblásticas e linfocíticas, respectivamente.

Figura 2 – Hematopoiese normal



Legenda: PMC: Progenitor Mielóide Comum; PGML: Progenitor Granulócito/Macrófago/Linfócito; PEM: Progenitor Megacariócito/Eritrócito; PGM: Progenitor Granulócito/Macrófago; PLC: Progenitor Linfócito Comum.

Fonte: Lopes, 2016.

As duas divisões descritas conduzem a um total de quatro subtipos principais e mais frequentes desse tipo de câncer: LLA (leucemia linfocítica aguda), LLC (leucemia linfocítica crônica), LMA (leucemia mielóide aguda) e LMC (leucemia mielóide crônica). Outro ponto de divisão entre os tipos de leucemias são as idades que os pacientes são acometidos, as leucemias infantis e adultas são significativamente diferentes em etiologia, tratamento e sobrevida (Zhao *et al.*, 2018).

Dentre os diferentes tipos de leucemias, a leucemia linfocítica aguda (LLA) merece destaque por ser um tipo agressivo, de rápida progressão, caracterizado pela presença de muitos linfoblastos ou linfócitos tumorais na medula óssea e no sangue periférico (Terwilliger e Abdul-Hay, 2017; Puckett e Chan, 2021).

Dos casos relatados de LLA, 80% dos pacientes são crianças e embora as novas estratégias de tratamento tenham levado a uma melhora significativa nos resultados para pacientes pediátricos, o mesmo não pode ser dito sobre a incidência em adultos, onde apesar de uma alta taxa de resposta ao tratamento quimioterápico, apenas 30 a 40% dos pacientes adultos com LLA alcançam remissão em longo prazo (Terwilliger e Abdul-Hay, 2017).

Tratamento das leucemias

Como discutido anteriormente, as leucemias se destacam por ser o principal tipo de câncer infantil no mundo, apresentando grande relevância e preocupação na área clínica (Couto *et al.*, 2010; Cipolat *et al.*, 2011; Diller, 2011; Amitay e Keinan-Boke, 2015; Randhawa e Ferrajoli, 2015; Barrington-Trimis, 2016; Whitehead *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2018). Muitas das manifestações clínicas das leucemias, como a ineficiência do sistema imune, neutropenia, defeitos da fagocitose celular, disfunção do sistema complemento e hipogamaglobulinemia, resultam da proliferação excessiva de células anormais da medula óssea (Randhawa e Ferrajoli, 2015; Zhao *et al.*, 2018).

Além destas manifestações, devido à redução do número de leucócitos normais na corrente sanguínea e depleção do sistema imune, ocorrem diversos relatos de óbitos por infecções secundárias, causadas por microrganismos oportunistas (Randhawa e Ferrajoli, 2015; Zhao *et al.*, 2018).

O progresso no tratamento da leucemia depende da associação de medicamentos - poliquimioterapia, além de medidas no controle das complicações infecciosas e hemorrágicas (Randhawa e Ferrajoli, 2015; Cancer Research UK, 2016; INCA, 2016b; Jabbour *et al.*, 2016).

A taxa de sobrevivência de pacientes com leucemia aumentou significativamente devido ao avanço nas tecnologias e novas estratégias de tratamento desse tipo de câncer (Amitay e Keinan-Boke, 2015; Whitehead *et al.*, 2016; Pelland-Marcotte *et al.*, 2018). Contudo, mesmo com os tratamentos atuais apresentando relativo sucesso clínico, as consequências imediatas e de longo prazo das leucemias infanto juvenis continuam a gerar um alto custo. Os efeitos

secundários tardios e de longo prazo do tratamento antileucêmico incluem problemas no desenvolvimento neurocognitivo, na saúde mental, na função do sistema endócrino e na saúde geral do paciente (Whitehead *et al.*, 2016).

A poliquimioterapia envolve a aplicação simultânea de diferentes fármacos, com atividade antitumoral já descrita, empiricamente, selecionados em ensaios clínicos, com o objetivo de potencializar o tratamento do câncer. O tratamento com múltiplas drogas garante uma gama mais ampla de interação entre drogas e células cancerígenas com diferentes anormalidades genéticas, atuando em diferentes alvos, além dos dados na literatura mostrarem que essa abordagem é mais eficiente em prevenir ou retardar o desenvolvimento subsequente da resistência aos medicamentos (Falzone *et al.*, 2018).

Nas leucemias, diversos trabalhos comprovam a permanência de células leucêmicas no organismo após o tratamento inicial com a poliquimioterapia (doença residual). Nos tipos linfóides, o tratamento é mais prolongado, podendo durar mais de dois anos, com efeitos colaterais extremamente agressivos (Cancer Research UK, 2016; INCA, 2016b; Kato *et al.*, 2016; Terwilliger e Abdul-Hay, 2017; Puckett e Chan, 2021).

A queda dos leucócitos levando a uma posterior infecção é uma das consequências decorrentes desta abordagem de tratamento. As infecções representam 50 a 60% de todas as mortes em leucemia linfocítica crônica (LLC). Na fase inicial, os pacientes recebem, quase diariamente, transfusões de hemácias e de plaquetas, enquanto a medula óssea não recupera a hematopoiese normal (Randhawa e Ferrajoli, 2015; Cancer Research UK, 2016; INCA, 2016b; Kato *et al.*, 2016).

Como discutido anteriormente, os estudos com LLA tem mostrado grande relevância, por ser um tipo de leucemia agressivo e de rápida progressão. Embora as novas estratégias de tratamento tenham levado a uma melhora significativa, com um bom prognóstico nos resultados para pacientes pediátricos, o prognóstico para o grupo de adultos continua grave (Terwilliger e Abdul-Hay, 2017; Puckett e Chan, 2021).

Na Figura 3 podemos observar um esquema ilustrativo das diferentes fases do tratamento das LLA. O início do tratamento da LLA se dá com a fase de indução, onde existe a associação de fármacos como vincristina, corticosteróides e antraciclina, podendo ser associados ainda outros fármacos, dependendo do caso clínico e idade do paciente (Terwilliger e Abdul-Hay, 2017, Puckett e Chan, 2021).

Após a fase de indução, os pacientes elegíveis podem prosseguir para o transplante de células estaminais, enquanto todos os outros passam para as fases de intensificação /

consolidação e manutenção, que podem variar nos diferentes protocolos, mas que geralmente utilizam fármacos semelhantes à fase de indução (Terwilliger e Abdul-Hay, 2017, Puckett e Chan, 2021).

Na fase de manutenção, que consiste geralmente na administração diária de 6-mercaptopurina, semanal de metotrexato, e de vincristina e de prednisona a cada três meses, podendo haver variações dependendo do quadro clínico. O tratamento pode prolongar-se por anos, como ocorre no caso da LLA (Terwilliger e Abdul-Hay, 2017, Puckett e Chan, 2021).

Figura 3 – Etapas do tratamento da Leucemia Linfocítica Aguda (LLA)



Fonte: Terwilliger e Abdul-Hay, 2017; Puckett e Chan, 2021

Apesar dos avanços no tratamento e melhora da resposta clínica dos pacientes com LLA, as mortes resultantes da toxicidade após a poliquimioterapia continuam a ser um desafio. Dentre os diversos efeitos colaterais que prejudicam a qualidade de vida do paciente, vale destacar a Síndrome de lise tumoral, que ocorre quando a quimioterapia faz com que as células

cancerígenas liberem certos elementos intracelulares, como potássio, cálcio, ácido úrico e fósforo. Estes elementos, em grande número, resultam em toxicidade que muitas vezes pode levar à insuficiência renal (Puckett e Chan, 2021).

Mesmo após o tratamento de manutenção, pacientes de LLA podem apresentar casos de recaída até 21 anos após o início do tratamento. É também importante abordar outras questões associadas ao tratamento do câncer, principalmente quando acometem crianças, como o oferecimento de apoio psicológico ao paciente e à família (Whitehead *et al.*, 2016; Puckett e Chan, 2021).

Visto que os atuais tratamentos antitumorais quimioterápicos ainda se mostrarem agressivos e ainda passíveis de desenvolvimento de resistência pelo, a busca por novas substâncias para o tratamento do câncer continua representando uma vertente importante das pesquisas científicas atuais (Hayakawa *et al.*, 2016; Terwilliger e Abdul-Hay, 2017).

Síntese de novos fármacos

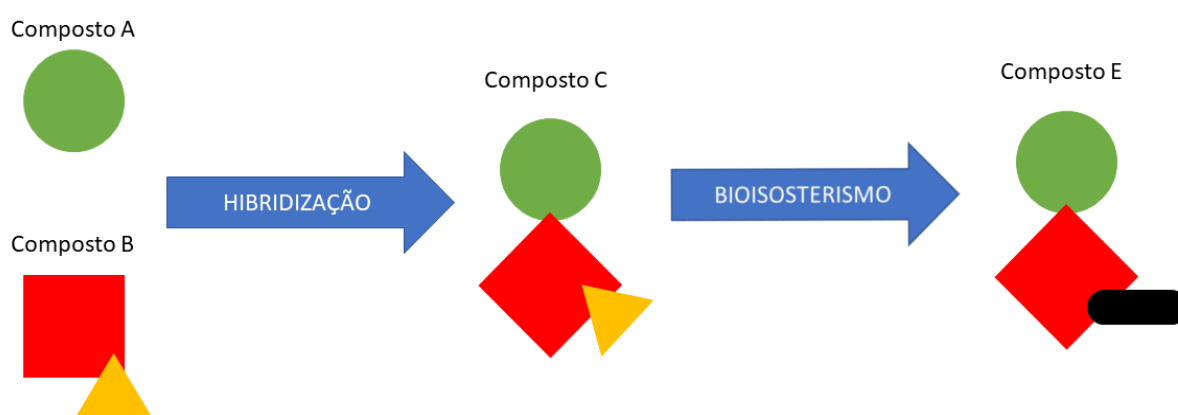
No processo de descoberta de novos fármacos, a modificação molecular consiste na possibilidade de otimização de um protótipo, com estrutura e ação biológica conhecidas, visando manter características essenciais no planejamento molecular, como biodisponibilidade, e a síntese de um novo composto, mais potente e seletivo, e minimizando possíveis efeitos colaterais (Wermuth, 2004; Barreiro e Fraga, 2008; Wermuth, 2008; Nagarsenkar *et al.*, 2016; Horiene e Yuan, 2017; Kerru *et al.* 2017; Yu *et al.*, 2018).

A hibridização molecular está entre as principais estratégias utilizadas em química farmacêutica medicinal, sendo baseada na reunião de duas ou mais subunidades farmacofóricas ou substâncias bioativas diferentes, levando à uma nova substância, híbrida, que poderá conjugar ambas as atividades farmacocinéticas em uma única molécula, ou mesmo apresentar ação farmacológica maior que seus precursores atuando sinergicamente (Wermuth, 2004, Viegas-Junior *et al.*, 2007; Barreiro e Fraga, 2008; Wermuth, 2008; Viegas-Junior *et al.*, 2009; Nagarsenkar *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2016; Kerru *et al.* 2017).

Outra importante ferramenta utilizada na química sintética é o bioisosterismo, que consiste na substituição, em uma determinada molécula bioativa, de átomos ou grupos de átomos por outros que apresentam propriedades físico-químicas similares. Bioisósteros são

úteis para melhorar as propriedades físico-químicas, farmacológicas e farmacodinâmicas/farmacocinéticas de drogas (Wermuth, 2004; Viegas Jr. *et al.*, 2007; Barreiro e Fraga, 2008; Wermuth, 2008; Viegas Jr. *et al.*, 2009; Arabi, 2017). Podemos observar, na Figura 4, exemplos das ferramentas de hibridização e bioisosterismo na síntese de novos fármacos.

Figura 4 – Esquema ilustrativo e simplificado das técnicas de hibridização e bioisosterismo



Legenda: À esquerda temos a síntese do composto C através da hibridização dos compostos A e B. À direita, temos o processo de bioisosterismo através da alteração do grupamento triangular amarelo pelo grupamento cilíndrico preto, formando o composto E.

Fonte: A autora, 2021.

Devido à complexidade de algumas patologias, como o câncer, novos fármacos ou bioligantes que incluam, na mesma molécula, propriedades farmacológicas duplas, têm mostrado na literatura uma melhor eficácia terapêutica, com menor efeito colateral. Estes pró-fármacos gerados por hibridização são capazes de atuarem em alvos biológicos distintos, e geralmente apresentam vantagens farmacocinéticas sobre a administração concomitante de dois fármacos (Barreiro e Fraga, 2008; Bérubé, 2016; Nagarsenkar *et al.*, 2016, Kerru *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2018).

Na literatura, podemos citar diversos híbridos com atividade antitumoral e antileucêmica (Bérubé, 2016; Kerru *et al.*, 2017). Um exemplo são os híbridos de benzimidazóis e chalconas que apresentaram atividade antitumoral em diferentes tipos de câncer, entre eles a leucemia (Kerru *et al.*, 2017). Abd El-Karim e colaboradores (2015)

exploraram a síntese de novos híbridos de pirazol e benzofurano, entre eles destacou-se uma molécula com notável padrão de atividade inibitória do crescimento contra células leucêmicas.

Outro exemplo seria uma série de híbridos de podofilotoxina e isatina, que foram sintetizadas e sua atividade citotóxica avaliada, tanto contra células K562/ADR de leucemia humana resistentes à adriamicina quanto para células K562 de leucemia humana. Todos os híbridos sintetizados apresentaram maior atividade antiproliferativa contra ambas as linhagens leucêmicas do que as drogas etoposídeo e adriamicina, usadas como controle (Kerru *et al.* 2017).

Análogos cíclicos da terpenila nitrona LQB-278

Neste contexto, em colaboração com o nosso grupo de pesquisa, o grupo do Professor Ayres Guimarães Dias, do Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sintetizou, inicialmente, diferentes moléculas híbridas de terpenila-nitronas, nas quais foram associadas a ação antitumoral dos terpenos (Haug *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1995; Burke *et al.*, 1997; Kuttan *et al.*, 2011; Bhalla *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016; Christianson, 2017) com a ação anti-inflamatória e antitumoral do N-Fenil-t-butilnitrona (PBN) (Asanuma *et al.*, 2008; Doblaz *et al.*, 2008; Floyd *et al.*, 2008, 2010).

Os terpenos, também conhecidos como terpenoides ou isoprenoides, constituem a família de produtos naturais mais diversa, química e estruturalmente, já descrita. Exibem uma larga escala de atividades biológicas, com ação antioxidante, anti-inflamatória, quimioprotetora, antiproliferativa e antitumoral em diversos tipos de câncer (Kuttan *et al.*, 2011; Bhalla *et al.*, 2013; Naumann *et al.*, 2013; Afzal *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2016; Christianson, 2017). A ação antitumoral do PBN foi descrita na literatura pela primeira vez por Floyd e Soong (1977) e, desde então, vários estudos relataram suas propriedades antitumorais, (Ramadan *et al.*, 2006; Inoue *et al.*, 2007; Floyd *et al.*, 2010, 2011; Cupelo *et al.*, 2017).

Nosso grupo estudou a relação estrutura-atividade desses compostos híbridos de terpenos e derivados PBN, e revelou que a molécula LQB-278 apresentou ação antileucêmica em linhagem Jurkat (IC₅₀ de 6,7 µM) maior do que os seus precursores geraniol (IC₅₀ > 50 µM) ou PBN (IC₅₀ > 50 µM), além de induzir morte celular por apoptose com aumento de expressão

de p21 e sem apresentar citotoxicidade expressiva em células saudáveis tratadas sob as mesmas condições (Costa *et al.*, 2015).

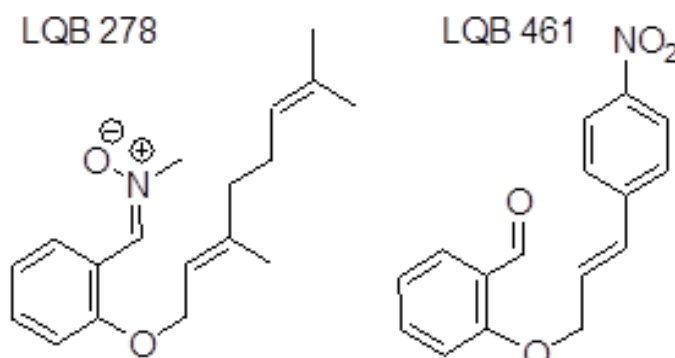
Tendo verificado os resultados promissores relativos à ação anti-leucêmica *in vitro* do LQB-278 (Costa *et al.*, 2015), decidiu-se continuar os estudos buscando gerar moléculas atóxicas para células normais, e cada vez mais ativas sobre as células leucêmicas. Neste sentido, foram sintetizados análogos cíclicos do fragmento terpenila do LQB-278, além de outras modificações estruturais. Também foi utilizado na síntese desses análogos o bioisosterismo, outra estratégia de modificação molecular utilizada em química medicinal, além da hibridização molecular.

Assim, podemos dizer que os análogos cíclicos do LQB-278 são um protótipo oriundo da modificação estrutural de *N*-metilaril nitronas *O*-geraniladas, pelo aumento das restrições conformacionais na cadeia lateral insaturada, através de sua anelação. Este tipo de modificação conformacional na cadeia lateral das *N*-metilaril nitronas permite investigar sua contribuição farmacofórica na atividade biológica. Análogos contendo variações na porção nitrona complementam a avaliação das porções farmacofóricas da molécula.

Cabe ressaltar que todas as moléculas aqui descritas são inéditas e foram preparadas em escalas de multigramas. Entre esses análogos estudados, vale destacar o LQB-461, que além da anelação da cadeia terpênica com inserção de um radical nitro, sofreu uma alteração do grupamento nitrona para aldeído. Em estudos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo, essas modificações estruturais mostraram potencializar a atividade antileucêmica desta nova molécula, demonstrando atividade citostática e antitumoral significativamente maior quando comparado ao LQB-278, com IC₅₀ de 2,8 µM, promovendo aumento de p21 em todas as concentrações testadas e indução de apoptose na maior concentração testada.

A Figura 5 mostra as estruturas químicas do análogo sintetizado LQB-461 e também do LQB-278, para comparação.

Figura 5 – Estrutura química da terpenila-nitrona LQB-278 e do seu análogo cíclico LQB-461



Fonte: A autora, 2021.

Estudos *in vitro* – Ação antitumoral

Os estudos *in vitro* podem não representar de forma plena as interações fisiológicas de um medicamento no organismo como um todo, contudo eles representam uma etapa inicial importante da fase pré-clínica dos estudos farmacológicos (Kepp *et al.*, 2011; Hayakawa *et al.*, 2016). Além disso, comparados aos estudos *in vivo*, os estudos *in vitro* podem apresentar alguns benefícios como baixo custo, avaliação mais direta do desempenho e oferecer benefícios em termos de considerações éticas (Polli, 2008).

Nas últimas décadas, o cultivo de células deixou de ser um simples instrumento de pesquisa para se tornar uma poderosa ferramenta no desenvolvimento da biotecnologia (Kepp *et al.*, 2011; Hayakawa *et al.*, 2016).

Modelos de linhagem celular *in vitro* têm sido amplamente utilizados para o estudo de doenças como o câncer, utilizados para prever a resposta clínica, ajudar a gerar hipóteses farmacológicas para testes adicionais e a identificar novos mecanismos de ação bioquímicos, moleculares e celulares de diferentes fármacos, e fenômenos referentes à carcinogênese, resistência a drogas e citotoxicidade (Kepp *et al.*, 2011; Niu e Wang, 2015; Hayakawa *et al.*, 2016).

Na busca de novos fármacos para o tratamento do câncer, os estudos *in vitro* mostram grande importância em cada fase de desenvolvimento. Mecanismos característicos da célula

tumoral e a importância do microambiente tumoral e do sistema imunológico, no desenvolvimento e progressão do câncer, se tornaram mais elucidados através de pesquisas desenvolvidas utilizando estudos *in vitro* (Niu e Wang, 2015; Hayakawa e colaboradores, 2016).

Também através de estudos *in vitro* é que novos medicamentos e estratégias para o tratamento oncológico foram desenvolvidos, aumentando a eficiência na clínica e a expectativa de remissão e cura dos pacientes. Diversos trabalhos utilizando metodologias *in vitro* conseguem avaliar e prever a capacidade de diversas substâncias quimioterápicas, podendo ser de origem sintética ou natural, na inibição da proliferação da célula tumoral, assim como nos seus mecanismos citotóxicos (Kepp *et al.*, 2011; Niu e Wang, 2015; Hayakawa *et al.*, 2016). Adicionalmente, os estudos *in vitro* permitem avaliar o potencial farmacológico de grande número de substâncias, através de testes denominados “*screening*” ou “rastreamento” farmacológico (Moura *et al.*, 2012; Riss *et al.*, 2013).

De certo, os ensaios *in vitro* possuem limitações quanto às interpretações e extrapolações para os efeitos *in vivo*, mas, por outro lado, possuem grande importância na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, pois sua execução é mais simples, rápida e barata em relação aos testes *in vivo*, além de serem importantes no estudo de potenciais agentes antitumorais em diferentes processos celulares, como proliferação, ciclo celular, morte celular, e mecanismos de ação envolvidos (Polli, 2008; Moura *et al.*, 2012; Niu e Wang, 2015; Hayakawa *et al.*, 2016).

Apoptose

A apoptose é um tipo de morte celular que desempenha uma função importante no desenvolvimento dos tecidos, sendo necessária para a homeostasia celular, controlando o ciclo natural de crescimento e removendo células indesejadas, sem causar dano tecidual. Em outras palavras, podemos dizer que a apoptose é um mecanismo geneticamente programado, criticamente importante para a sobrevivência e homeostase do organismo, responsável por remover células danificadas ou infectadas que podem interferir com a função normal de um tecido, sem causar estresse fisiológico (Ashkenazi, 2015; Onal *et al.* 2016; Dadsena *et al.*, 2021; Obeng, 2021).

Muitos trabalhos também destacaram a importância da apoptose na homeostasia do sistema imunológico, parte integrante do mecanismo de defesa do organismo. Por exemplo, a apoptose atua na regulação de respostas imunes, induzindo a morte das células T e B após suas ações, visto que uma resposta prolongada seria prejudicial ao organismo (Xu *et al.*, 2019).

A apoptose também vai ser responsável por eliminar as células T e B desnecessárias, como células B que não geram anticorpos de alta afinidade por antígenos, as quais estão sujeitas à indução de morte por apoptose. Por último, a citotoxicidade induzida por certos tipos de células (linfócitos T citotóxicos e células *natural killer*) ocorre através da promoção de apoptose. A indução de morte bem coordenada permite que essas células destruam as células alvo mantendo-se intactas (Xu *et al.*, 2019).

A apoptose é controlada por uma rede complexa envolvendo, além do controle gênico, a ação de receptores, enzimas e proteínas reguladoras. Pode ser ativada por duas vias clássicas: extrínseca e intrínseca. A via intrínseca, também conhecida como via mitocondrial, atua no controle do desenvolvimento e na morte associada a agentes genotóxicos. Geralmente é iniciada quando há danos no DNA ou interrupção de fatores de crescimento, sendo regulada por membros da família Bcl-2, resultando na liberação de citocromo C e formação do apoptossomo, um complexo formado entre a caspase 9, APAF-1 (fator de ativação de apoptose 1) e citocromo C, o qual irá ativar a caspase 3, uma caspase efetora (Ashkenazi, 2015; Nagata, 2018; D'Arcy, 2019; Xu *et al.*, 2019).

Podemos dividir os membros da família Bcl-2 em três subfamílias: membros pró-apoptóticos com domínio BH3 (Bim, Bid, Puma, Noxa, Hrk, Bmf e Bad) e proteínas pró-apoptóticas (Bax e Bak), e proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl1, A1 e Bcl-B). Em células saudáveis, a ação indutora de apoptose das proteínas Bax / Bak é inibida por membros da subfamília antiapoptótica, como as proteínas Bcl-2/Bcl-xL (Nagata, 2018; D'Arcy, 2019; Xu *et al.*, 2019; Dadsena *et al.*, 2021; Obeng, 2021).

Em resposta a um estímulo apoptótico, os membros da subfamília com domínio BH3 são transcricionalmente ou pós-transcricionalmente *up*-regulados e induzem um aumento das proteínas pró-apoptóticas ou inibem os membros antiapoptóticos da subfamília Bcl-2 (Nagata, 2018; D'Arcy, 2019; Xu *et al.*, 2019; Dadsena *et al.*, 2021; Obeng, 2021). Esse desequilíbrio resulta em maiores concentrações de proteínas Bax / Bak livres, que formam poros de transição de permeabilidade mitocondrial permitindo assim a liberação do citocromo C e toda a cascata de indução de morte através da via intrínseca de apoptose (D'Arcy, 2019; Dadsena *et al.*, 2021; Obeng, 2021).

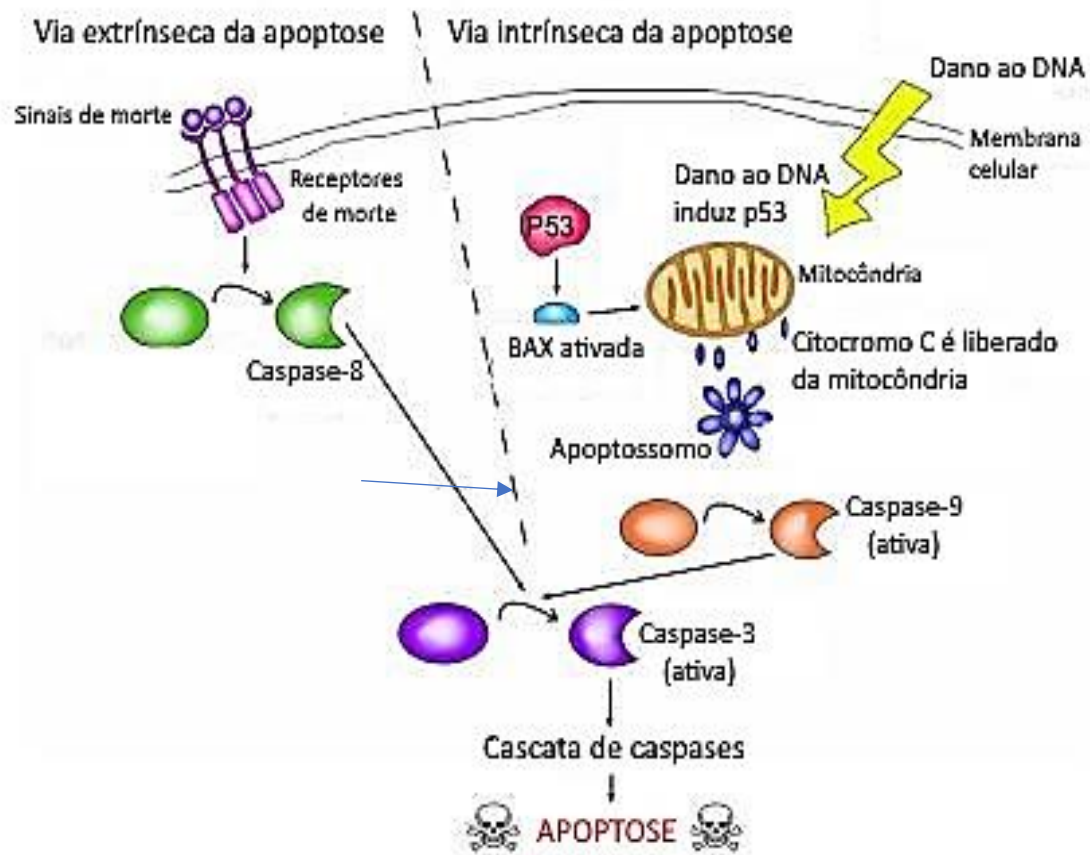
Outras proteínas pró-apoptóticas também podem ser liberadas a partir dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial, incluindo Smac/Diablo (segundo ativador mitocondrial de caspase / proteína de ligação-IAP direta com baixo pI), a serina-protease Omi/HtrA2, endonuclease G (EndoG) e fator de indução de apoptose (AIF) (D'Arcy, 2019; Xu *et al.*, 2019).

Outra via clássica de apoptose, a via extrínseca, é mediada por um subgrupo de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), uma superfamília que inclui TNFR, Fas e TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF). São sintetizados como proteínas de membrana de tipo II, com uma estrutura homotrimérica que, quando clivados da membrana, podem gerar uma forma solúvel. Com o domínio de morte oligomerizado, Fas recruta FADD (proteína de domínio de morte associada à Fas), procaspase 8 e uma proteína semelhante à procaspase 8, chamada c-FLIP. O complexo formado por Fas, FADD, procaspase 8 e c-FLIP é chamado DISC (complexo de sinalização indutor de morte). O FasL é clivado por uma metaloproteinase denominada ADAM10, enquanto o receptor de TNF- α é predominantemente clivado e liberado por ADAM17 (uma desintegrina e metaloproteinase) ou TACE (enzima conversora de TNF- α) (Ashkenazi, 2015; Nagata, 2018; D'Arcy, 2019; Xu *et al.*, 2019; Dadsena *et al.*, 2021; Obeng, 2021).

Dependendo se a célula possui o inibidor de proteína apoptótica ligado ao cromossomo X (XIAP), o complexo DISC pode desencadear duas respostas: a caspase 8 é fortemente ou suficientemente ativada por este complexo, ativando diretamente a procaspase 3; a outra forma seria a ação de clivagem de Bid pela caspase 8, sendo Bid um membro da família Bcl-2 com domínio BH3, e o Bid clivado (tBid) induzindo a liberação de citocromo C das mitocôndrias, ativando a via da caspase 9-caspase 3, como descrito anteriormente para a via intrínseca de morte (Ashkenazi, 2015; Nagata, 2018; D'Arcy, 2019; Xu *et al.*, 2019; Dadsena *et al.*, 2021; Obeng, 2021). Este exemplo mostra um *cross-talk* entre as duas vias de ativação de apoptose, aparentemente distintas, ilustrando a complexidade das inter-relações nos diferentes processos envolvidos na regulação da morte celular (Nagata, 2018).

A Figura 6 mostra de forma resumida, as vias intrínseca e extrínseca de ativação da apoptose, bem como moléculas chave, importantes para uma resolução eficiente desse mecanismo de morte celular programada.

Figura 6 – Visão geral das vias extrínseca e intrínseca de apoptose



Legenda: Na via extrínseca, os sinais de morte se ligam aos receptores de morte na superfície da membrana celular, clivando pró-caspase 8 em caspase 8, sua forma ativa, que cliva a pro-caspase 3 em caspase 3. Na via intrínseca, danos ao DNA induzem a expressão de p53, ativando a proteína Bax, que induz a liberação de citocromo C da mitocôndria. APAF-1 e o citocromo C liberado combinam-se para formar um complexo chamado apoptossomo, que converte pró-caspase 9 em caspase 9 (ativa). Esta caspase ativada converte pró-caspase 3 em caspase 3 (ativa), conhecida como caspase efetora, conduzindo a várias alterações na célula, resultando em apoptose. Fonte: Samarasinghe, B; Hallmarks of Cancer 3: Evading Apoptosis, Scientific American Blog Network, 2013.

Fonte: <https://www.ewg.org/research/hallmarks-cancer/evading-apoptosis> retirado em outubro de 2019. Modificado em outubro de 2019.

Enquanto um nível excessivo de morte celular pode resultar em doenças como Alzheimer, Parkinson ou Artrite Reumatoide, a proliferação celular descontrolada pode resultar no desenvolvimento de doenças como o câncer (D'Arcy, 2019). Sendo a apoptose o principal tipo de morte celular programada induzida quando há danos ao DNA, sua desregulação pode conduzir ao acúmulo de células com erros e/ou instabilidade em seu material genético, e contribuir para o desenvolvimento tumoral (Ouyang *et al.*, 2012; Ashkenazi, 2015; D'Arcy,

2019; Xu *et al.*, 2019; (Ashkenazi, 2015; Nagata, 2018; D'Arcy, 2019; Xu *et al.*, 2019; Dadsena *et al.*, 2021; Obeng, 2021).

Na literatura, diversos trabalhos mostram a desregulação de diversos fatores relacionados a apoptose na célula tumoral, como super-expressão de c-myc, regulação negativa da proteína pró-apoptótica Bax e super-expressão de Bcl-2 (Elmore, 2007; Cotter, 2009; Ouyang *et al.*, 2012; Ashkenazi, 2015; D'Arcy, 2019; Xu *et al.*, 2019).

É importante destacar que, diferente do processo de morte por necrose, que pode induzir inflamação, a apoptose acontece sem liberação do conteúdo intracelular ao final do processo, e sem indução de inflamação, não estabelecendo lesão local durante a eliminação celular. As principais características morfológicas de apoptose são o encolhimento citoplasmático, a fragmentação do DNA e do núcleo, a condensação da cromatina nuclear, a dilatação do retículo endoplasmático e a formação de “corpos apoptóticos”. Os “corpos apoptóticos” são reconhecidos e englobados por células fagocíticas próximas e digeridos em lisossomos (Portt *et al.*, 2011; Ashkenazi, 2015; Baig *et al.*, 2016; D'Arcy, 2019; Xu *et al.*, 2019).

Desta forma, a indução de apoptose é o processo de morte celular induzido mais estudado como alvo terapêutico para o tratamento do câncer. A identificação das vias de sinalização de apoptose, juntamente com o aumento do conhecimento sobre seus mecanismos, levou à descoberta de novos medicamentos com esse alvo (Hongmei, 2012; Ashkenazi, 2015; Baig *et al.*, 2016; D'Arcy, 2019; Xu *et al.*, 2019; Dadsena *et al.*, 2021; Obeng, 2021).

Autofagia

A autofagia é um evento essencial para a manutenção das organelas celulares e para a homeostase energética. Muitos aspectos dos fenômenos fisiológicos são influenciados pela autofagia, e sua desregulação está relacionada com doenças como neurodegeneração, câncer, doenças metabólicas, doenças cardiovasculares e distúrbios inflamatórios (Lee, 2018).

A autofagia pode ser caracterizada com um processo catabólico lisossômico pelo qual as células degradam e reciclam componentes tanto exógenos, como vírus e bactérias, como endógenos, como organelas danificadas, proteínas mal enoveladas e várias macromoléculas (Antunes *et al.*, 2018).

Pode ser dividida em três processos: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas e macroautofagia, conforme ilustrado na Figura 7. Na microautofagia, o envolvimento do componente alvo é feito de forma direta nas invaginações da membrana endossomal / lisossomal. Na macrofagia mediada por chaperonas, ocorre a reciclagem de proteínas solúveis que apresentem exposta a sequência de aminoácidos (KFERQ), a qual é reconhecida pela proteína do tipo chaperona hsc70; sendo internalizadas por ligação a receptores lisossomais (LAMP-2A). Uma vez estabilizado, o multímero Lamp2A serve como um complexo de translocação pelo qual o substrato é desdoblado e translocado para o lúmen lisossomal. (Fulda, 2017; Antunes *et al.*, 2018, Lee, 2018).

Por fim, na macroautofagia, os constituintes citoplasmáticos são englobados dentro de vesículas de dupla membrana chamadas autofagossomos, que posteriormente se fundem com os lisossomos formando autolisossomos, onde o componente alvo é degradado ou reciclado, sendo estes geralmente açúcares, nucleosídeos / nucleotídeos, proteínas e lipídios, que podem ser redirecionados para novas rotas metabólicas de manutenção celular (Fulda, 2017; Antunes *et al.*, 2018, Lee, 2018).

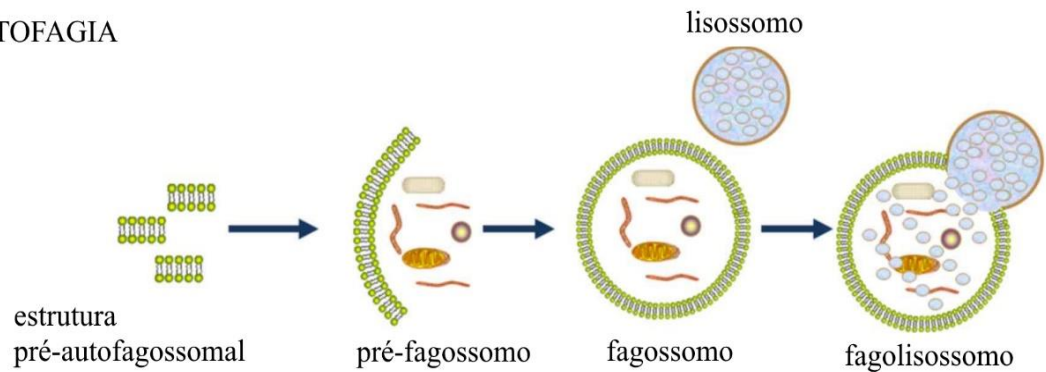
O mecanismo molecular que controla o processo autofágico é regulado por genes específicos (genes ATG) e por diferentes complexos proteicos, regulados pela ativação ou inativação de vias de resposta ao estresse celular (Antunes *et al.*, 2018; Lee, 2018; Yu *et al.*, 2018). Para inicialização da via clássica de autofagia, a ativação do complexo ULK1 (ULK1 / 2, Atg13, FIP200 e Atg101) sinaliza a nucleação do autofagossomo, sob o controle do complexo PI3K III (PI3KIII, Beclina-1, Atg14 / Barkor, Vps15 e Ambra-1). A ativação deste complexo induz a produção de PIP3 (fosfatidil inositol 3-fosfato), que por sua vez recruta outras proteínas Atg para formar o fagóforo autofágico (Antunes *et al.*, 2018; Lee, 2018; Yu *et al.*, 2018).

Posteriormente, há o recrutamento de ATG12-ATG5 e da proteína LC-3 ao fagóforo, permitindo que sua expansão e fechamento formem o autofagossoma maduro. Este processo leva à conversão da proteína solúvel LC3-I para a forma LC3-II, associada à membrana, especificamente nas membranas interna e externa do autofagossomo (Antunes *et al.*, 2018; Lee, 2018; Yu *et al.*, 2018).

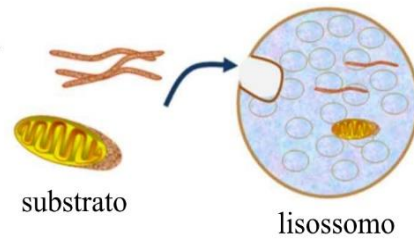
Além disso, o LC3-II pode interagir com proteínas adaptadoras, como p62, que direcionam o alvo ao fagossomo para posterior degradação nos lisossomos, que é o passo final da autofagia (Antunes *et al.*, 2018; Lee, 2018; Yu *et al.*, 2018).

Figura 7 – Resumo ilustrativo dos processos de macroautofagia, microautofagia, e autofagia mediada por chaperonas

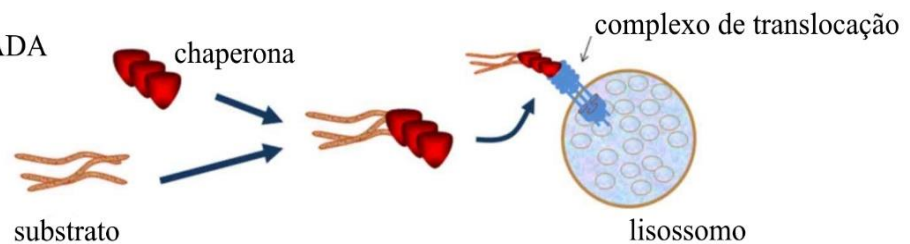
MACROAUTOFAGIA



MICROAUTOGAFIA



AUTOFAGIA MEDIADA POR CHAPERONAS



Legenda: Na macroautofagia há a formação do fagossomo que sofrerá fusão com o lisossomo formando o fagolisossomo onde ocorrerá a degradação do substrato. Na microautofagia, o substrato é degradado diretamente no lisossomo. Na autofagia mediada por chaperonas, a chaperona se ligará o substrato e na membrana lisossomal irão formar o complexo de translocação que iniciará a degradação do mesmo. Na microautofagia e na autofagia mediada por chaperonas não há a formação de fagossomo ou fagolisossomo como ocorrem na macroautofagia.

Fonte: Yu *et al.*, 2017.

A autofagia pode ocorrer em níveis basais, sob condições fisiológicas, em processos naturais de homeostase, e também pode ocorrer em resposta a estímulos de estresse, como hipóxia, privação nutricional ou danos no DNA causados por agentes citotóxicos, como poliquimioterápicos (Fulda, 2017; Antunes *et al.*, 2018).

Diversos trabalhos descrevem medicamentos quimioterápicos induzindo a autofagia, embora principalmente associada à uma resposta citoprotetora, onde as células tumorais buscam resistir ao estresse celular causado pelos agentes citotóxicos (Fulda, 2017).

Há também casos de indução de morte celular induzida por autofagia. Por exemplo, o quimioterápico TMZ pertencente à classe das drogas alquilantes, que provocam danos no DNA durante sua duplicação, induzindo morte celular por apoptose, mostrou desencadear o recrutamento de LC-3 para membranas envolvidas na autofagia. A inibição farmacológica da autofagia pela 3-metiladenina resultou na redução da formação de autofagossomos e atenuou a citotoxicidade mediada pelo TMZ, assim como o silenciamento dos elementos centrais da sinalização da autofagia, como Beclina-1 (Fulda, 2017).

Outros estudos também destacam a importância da autofagia na supressão tumoral através do gene *BECNI*, que codifica a proteína Beclina-1, em diferentes modelos celulares. *BECNI* é encontrado frequentemente suprimido monoalelamente em câncer de ovário, mama e testicular. Além disso, camundongos com perda alélica de *BECNI* apresentaram uma deficiência parcial de autofagia e eram propensos ao desenvolvimento de hepatocarcinoma e tumores de pulmão em idade avançada (Antunes *et al.*, 2018).

Assim, a autofagia pode estar relacionada tanto à prevenção e ao combate às células tumorais, estando relacionada à indução de morte e presente na ação de diversos quimioterápicos, quanto a mecanismos de adaptação, sobrevivência e resistência da célula tumoral ao estresse causado por um agente antitumoral. Esses efeitos estão relacionados a um quadro mais amplo de genes e proteínas ligados a vias que irão definir o efeito anti ou pró-tumoral da autofagia (Fulda, 2017; Antunes *et al.*, 2018).

Desta forma, tendo em vista os efeitos descritos dos derivados PBN e cinamoil na atividade antitumoral, através da indução de apoptose e modulação do processo autofágico (Yan *et al.*, 2007; Kishino *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2013; Lan *et al.*, 2015; Maiuthed *et al.*, 2017; Dutta e Chakraborty, 2018; Roy *et al.*, 2019), além dos resultados promissores relativos à atividade antileucêmica do LQB-461 em células Jurkat, obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, mostrou-se interessante aprofundar os estudos quanto ao mecanismo de morte induzido por esta molécula, assim como possíveis alterações promovidas na autofagia celular.

Proliferação

A proliferação celular é um processo fundamental que garante a homeostase e permite que haja o desenvolvimento de um organismo (Matson e Cook, 2017). Existem diversos mecanismos que participam nesse processo, desde uma fina regulação, feita através de ciclinas e quinases dependente de ciclinas que controlam a progressão do ciclo celular, até vias de sinalização que induzem toda uma maquinaria de produção de proteínas que irão permitir o crescimento e a proliferação celular (Matson e Cook, 2017; Mirabilii *et al.*, 2018; Paquette *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

Dentre os diferentes mecanismos que atuam na proliferação, a via do mTOR (alvo mamífero da rapamicina) desempenha um papel crucial na coordenação do equilíbrio entre o crescimento e a morte celular, atuando como um regulador central da proliferação e sobrevivência, em resposta ao estado nutricional, a fator de crescimento e sinais de estresse (Paquette *et al.*, 2018).

A ligação de fatores de crescimento a seus receptores específicos desencadeia uma cascata de eventos que levam ao aumento da atividade de quinases, como a proteína quinase B, também conhecida como AKT, e a quinase regulada por sinal extracelular (ERK). Essas quinases promovem o aumento de mTOR, um complexo serina / treonina quinase, que ativa a síntese de proteínas através de alvos como a proteína 1 de ligação a 4E (4EBP1) e a proteína ribossômica S6 quinase/p70 (S6KP70) (Mirabilii *et al.*, 2018; Paquette *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

7 Ambos 4EBP1 e p70 são as proteínas ativadas pela via de sinalização PI3K/Akt, contudo a fosforilação e ativação de S6KP70 possui relação direta com ativação de mTOR1 e leva ao aumento da síntese protéica e à ativação da proliferação celular (Mirabilii *et al.*, 2018; Paquette *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

O mTOR pode ser dividido em dois complexos distintos, os alvos mecanístico do complexo 1 e 2 da rapamicina (mTORC1 e mTORC2, respectivamente). Ambos são estimulados através de fatores de crescimento, mas mTORC1 possui uma relação mais intrínseca com os mecanismos de proliferação celular, estando geralmente desregulado no câncer, participando na progressão da doença (Paquette *et al.*, 2018).

Na literatura, diversos trabalhos relatam que a atividade aumentada de ambos os complexos, mTORC1 e mTORC2, desempenha um papel crítico na leucemogênese,

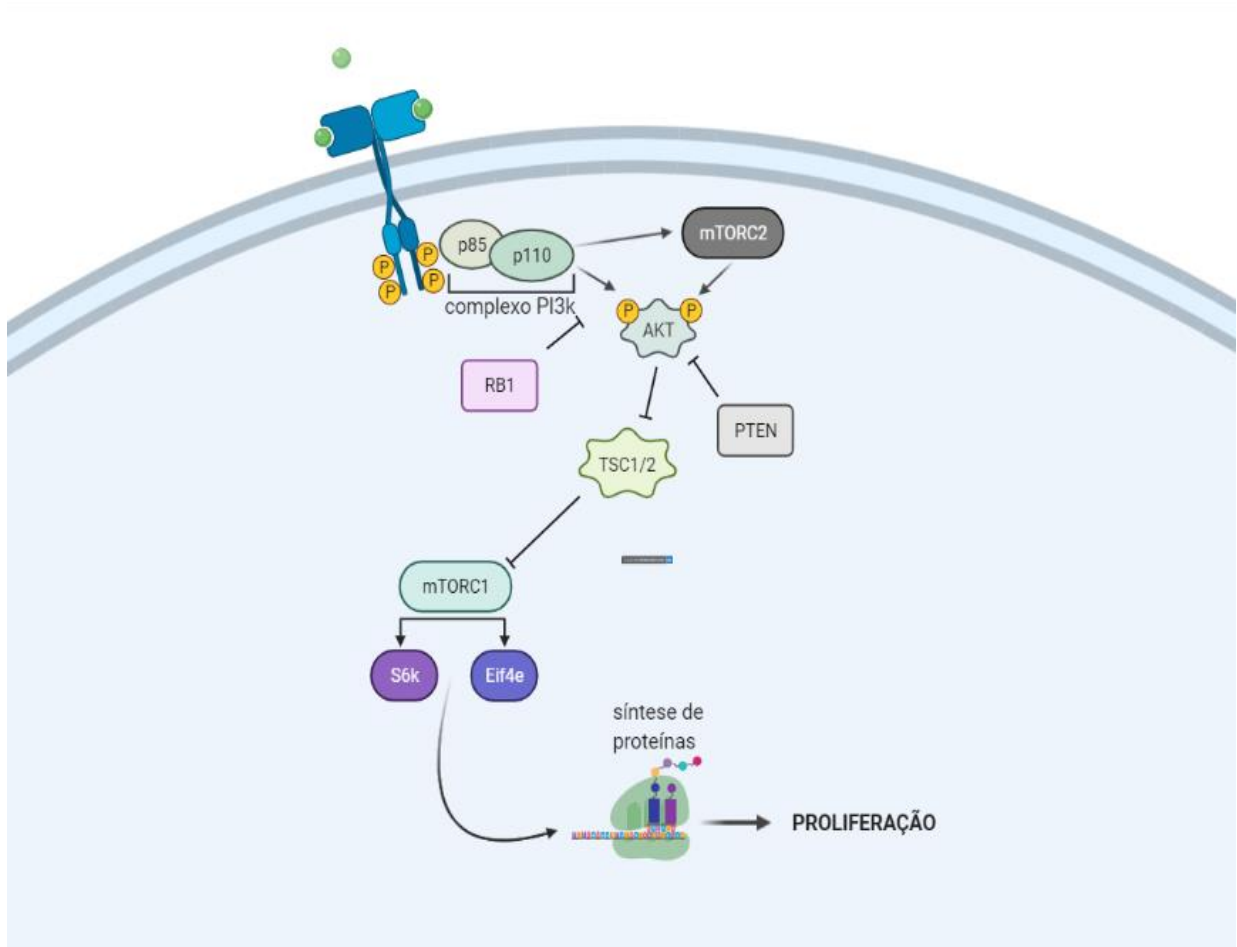
participando nas fases de iniciação e propagação. A ativação constitutiva de mTOR é frequentemente encontrada em pacientes com leucemia, contribuindo para a quimiorresistência e progressão da doença (Mirabilii *et al.*, 2018).

A via PI3K/Akt/mTOR é de grande importância no desenvolvimento das leucemias, especialmente nas leucemias linfocíticas agudas de células T (LLA-T), um subtipo de LLA que atinge os linfócitos T. A LLA-T é uma doença agressiva, com casos frequentes de recidivas após o tratamento quimioterápico. Em pacientes de LLA-T, geralmente a via PI3K/Akt/mTOR é encontrada constitutivamente ativa, impactando num pior prognóstico, em resposta ao tratamento quimioterápico (Xie *et al.*, 2017; Mirabilii *et al.*, 2018).

Além disto, PTEN (Homólogo da Fosfatase e Tensina) e RB1 (Retinoblastoma 1), dois dos principais reguladores negativos da via PI3K/AKT/mTOR, são frequentemente encontrados sub-expressos em diferentes tipos de câncer, inclusive PTEN encontra-se mutado na LLA-T, favorecendo a hiperativação da via do mTOR e consequente promoção da proliferação (Xie *et al.*, 2017; Mirabilii *et al.*, 2018).

Na Figura 8 podemos encontrar em esquema explicativo da ativação da via PI3K/AKT/mTOR induzindo a síntese de proteínas e consequentemente a proliferação.

Figura 8 - Resumo ilustrativo da indução da proliferação via PI3K/AKT/mTOR



Legenda: A ligação de fatores de crescimento a seus receptores específicos promove a fosforilação e a ativação do complexo PI3K. Este complexo fosforila e ativa a AKT e o complexo mTORC2, este último sendo também um ativador de AKT. A AKT ativada inibe o complexo TSC1/2 que, por sua vez, inibe o complexo mTORC1. TSC1/2 inativo irá permitir que o complexo mTORC1 permaneça ativo e induza o aumento de proteínas como 4EBP1 e p70, importantes mediadoras da síntese proteica. Vemos também a atuação de PTEN e RB1, dois importantes inibidores desta via.

Fonte: Figura criada através do Biorender.com com base na literatura (Xie *et al.*, 2017, Mirabilii *et al.*, 2018; Paquette *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

Além do papel na proliferação, mTOR foi identificado participando dos processos de autofagia e apoptose (Mirabilii *et al.*, 2018; Paquette *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018). Descrito como um modulador chave da autofagia por mais de uma década, desregulações da via do mTOR foram implicadas em uma variedade de distúrbios patológicos, incluindo o câncer. Estes estudos demonstraram que a inibição de mTORC1 aumenta a autofagia, enquanto a ativação de mTORC1 reduz esse processo. Também já foi descrito que mTORC2 suprime indiretamente a autofagia por meio da ativação de mTORC1 (Paquette *et al.*, 2018).

Com relação à apoptose, diversos trabalhos mostram que o aumento da expressão de mTOR promove a sobrevivência de células tumorais, modulando diversas moléculas relacionadas à esta via, incluindo membros da família Bcl-2. Foi demonstrado que a ativação da via PI3K/Akt/mTOR diminui a eficácia mimética de BH3 (domínio de homologia de Bcl-2) em células cancerosas, regulando positivamente os membros da família Bcl-2 anti-apoptóticos. O bloqueio simultâneo das vias PI3K/mTOR e Bcl-2 demonstrou ter atividade antileucêmica promissora, tanto em linhagens celulares leucêmicas, como amostras primárias e modelos de xenoinxertos (Mirabilii *et al.*, 2018; Paquette *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

Desta forma, a inibição da via do mTOR pode não apenas promover a diminuição da proliferação, mas também impactar nos processos autofágico e apoptótico, promovendo a apoptose em células tumorais, incluindo células leucêmicas (Mirabilii *et al.*, 2018; Paquette *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

Além disto, o mTOR também possui um papel crucial no controle do metabolismo celular e homeostase energética em células normais e tumorais. As mitocôndrias são o principal local de produção de energia celular na forma de ATP, estando intimamente envolvidas em processos como proliferação, diferenciação, sobrevivência ou morte celular. Estudos já demonstraram a ligação entre a sinalização de mTORC1 e a função mitocondrial elevada, encontrada em fibroblastos embrionários de camundongo (MEFs), onde a ativação genética de mTORC1 (pela depleção de TSC2) mostrou induzir o aumento da biogênese mitocondrial e metabolismo oxidativo (Linke *et al.*, 2017; Sridharan e Basu, 2020).

Assim, o estudo desta via possui papel fundamental no desenvolvimento de terapias eficazes para o tratamento das leucemias. Ao longo dos anos, várias pequenas moléculas que têm como alvo a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR mostraram potencial eficácia terapêutica em neoplasias hematológicas, isoladamente ou em combinação com drogas quimioterápicas (Mirabilii *et al.*, 2018).

1 OBJETIVO GERAL

Avaliar mecanismos celulares e moleculares de ação do LQB-461 sobre linhagem leucêmica linfocítica Jurkat, relativos aos aspectos envolvidos no efeito citostático e indutor de apoptose.

1.1 Objetivos específicos

- a) Rastrear, através da análise global de genes alterados no ensaio de microarranjo, as vias alteradas que sinalizem possíveis efeitos do LQB-461 em células Jurkat;
- b) Selecionar e posteriormente validar genes, relacionados à via de indução de morte por apoptose, proliferação e autofagia, encontrados alterados no ensaio de microarranjo, após tratamento de células Jurkat com o LQB-461;
- c) Analisar a expressão do gene *CDKN1* (codifica o p21), independente de p53, em após tratamento de células Jurkat com o LQB-461;
- d) Avaliar a participação de alterações na via da PI3K/AKT no efeito inibidor do LQB-461 sobre a proliferação de células Jurkat, através do estudo da expressão de intermediários desta via, como mTOR e S6KP70;
- e) Estudar o envolvimento da via extrínseca de apoptose no efeito observado em células Jurkat, após tratamento com LQB-461, através da expressão do receptor Fas na membrana;
- f) Estudar o envolvimento da via intrínseca de apoptose no efeito observado em células Jurkat, após tratamento com o LQB-461, através da expressão de proteínas da família Bcl-2, como a proteína antiapoptótica Bcl-2 e proteína pró-apoptótica Bax.
- g) Analisar a ativação da caspase-3, induzida pelo LQB-461 em células Jurkat;

- h) Avaliar a expressão de importantes reguladores da autofagia, como a proteína LC-3, após tratamento de células Jurkat com o LQB-461;
- i) Avaliar, por microarranjo, o efeito do LQB-461 na expressão de enzimas envolvidas no controle epigenético, em células Jurkat;
- j) Relacionar os resultados obtidos com os encontrados na análise global de genes alterados no microarranjo.

2 MATERIAL

2.1 Análogos cíclicos da terpenila nitrona LQB-278

O LQB-461 foi sintetizado no Laboratório de Química Orgânica, do Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), sob a responsabilidade do Professor Dr. Ayres Guimarães Dias, em parceria com o Laboratório de Química Bioorgânica (LQB), no Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais (IPPN), no Centro de Ciências da Saúde, na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob a responsabilidade do Professor Dr. Paulo Roberto Ribeiro Costa. O LQB-461 foi gentilmente fornecido por estes pesquisadores para os ensaios farmacológicos na UERJ, em colaboração, após verificação de sua pureza por cromatografia e ressonância magnética nuclear (RMN). As amostras liofilizadas eram solubilizadas em DMSO (100 mM), aliqüotadas e mantidas a 20°C, ao abrigo da luz.

2.2 Linhagem celular Jurkat

Para o estudo *in vitro* de possíveis mecanismos de ação do LQB-461 utilizou-se a linhagem de leucemia linfoblástica Jurkat, de linfócito T humano com desenvolvimento agudo, Clone E6-1, comprada do Banco de Células do Rio de Janeiro, que se encontra criopreservada em nitrogênio líquido no Departamento de Bioquímica da UERJ, Rio de Janeiro. Após o descongelamento, as células Jurkat foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 70 mg/L de penicilina G potássica e 100 mg/L de estreptomicina, o que chamamos de meio completo, e mantidas a 37°C e atmosfera úmida com 5% de CO₂, com duas ou três passagens por semana. As células foram mantidas em cultura até a vigésima passagem, quando uma nova alíquota de células era descongelada.

2.3 Reagentes

Meio RPMI 1640, e sulfato de estreptomicina, Invitrogen, EUA. Penicilina G potássica, Fontoura-Wyerth, Brasil. Soro Fetal Bovino (SFB), Vitrocell, Brasil. PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ e 1,5 mM KH₂PO₄). Anexina V marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC,) tampão de ligação para Anexina (eBioScience, EUA). Anticorpo anti-receptor Fas (CD95) humano, marcado com alofocianina (APC) (PC anti-human CD95 (Fas)); anticorpo purificado anti-Bax humano; anticorpo purificado anti-Bcl-2 humano; anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com alofocianina (APC); e anticorpo anti Caspase-3 humana ativa marcado com FITC (FITC Rabbit anti Caspase-3 humana ativa), da BioLegend. Permeabilizante de membrana Facs lising (BD Biosciences, EUA). Azul de tripan (Sigma Chemical Co, EUA). Chip de microarranjo GeneChip™ Human Genome U133A 2.0 Array (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA). Primer para o gene p21 (Bioneer). Primers para os genes *BAX*, *BCL-2* e *FAS* (IDT) GoTaq® RT-PCR Master Mix (Promega). WT Expression Kit (Ambion), Superscript II RT (Termofisher); Trizol (Termofisher). Random primer (Promega). Tampão de lise RIPA (TRIS-HCl 50 mM pH7,5; 1% Nonidet p40; 0,25% Deoxicolato de sódio; 0,1% SDS), contendo inibidores de proteases (Mini Complete, Roche). Kit para método colorimétrico Pierce® Bicinchoninic acid assay (BCA) protein assay (Thermo scientific, EUA). Albumina bovina (BSA) (Sigma). Tampão de amostra (12,5% de Tris pH 6,8 a 0,5 M; 40% de Glicerol; 0,2 g de SDS; 5% de β-Mercaptoetanol, 4% de azul de bromofenol a 0,05%, em água deionizada). Padrão de massa molecular (Kaleidoscope prestained Standards Cat. 161-0324 BioRad). Poliacrilamida, marca Sigma). Tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM Glicina; 0,1% de SDS). Tampão de transferência (25 mM de Tris; 192 mM de glicina; metanol 20%). Amido Black (metanol 40%, ácido acético 10%, Amido Black 0,1%). Solução de TBS/T (10 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; Tween-20 0,05%). Anticorpos purificados policlonais rabbit anti-mTOR humano, mouse anti-mTOR fosforilado humano e rabbit anti-RB1 humano, da BioLegend, anticorpo monoclonal mouse anti-P70[S6KP70] humano (BD Biosciences) e anticorpo policlonal rabbit anti-LC-3 humano (Sigma). Kit ECL Advanced *Western Blotting* Detection (GE, São Paulo, Brasil). Anticorpo anti-β-tubulina humana (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA). Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma, Saint Louis, EUA). *Beads* magnéticas (Nucleic Acid Binding Beads, Ambion®, Life Technologies™, USA). RNase H (Invitrogen, EUA). Tampão de

fragmentação da enzima Uracil-DNA Glycosylase (UDG), enzima endonuclease purínica apiridínica humana (APE), tampão da desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) (5x concentrado) e reagente de marcação de DNA, oligonucleotídeo B2 Controle (Affymetrix), controles de hibridação eucarióticos 20X (bioB, bioC, bioD, cre) (Affymetrix), tampão de hibridação, tampão A, tampão B, tampão SAPE. Filme fotográfico (Amersham Hyperfilm™ ECL - GE Healthcare), solução de revelação (Carestream dental). Solução de fixação (Carestream dental). Padrão proteico padrão (*Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards*, cat #1610375 – Biorad). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.4 Equipamentos e softwares

Balança analítica, modelo B200, Micronal, Brasil. Banho-maria De Leo & Cia, Ltda, Brasil. Câmaras de fluxo laminar, modelo FLV, série 301, Trox do Brasil, Ltda e modelo VLFS, série FL4761, Veco, Brasil. Centrifuga clínica Universal II, Hettich, Brasil. Espectrofotômetro de microplacas universal, modelo μ Quant, Bio-Tek Instruments Inc., EUA. Estufa com incubadora de CO₂, Sanyo, EUA. Microcentrífuga Eppendorf, modelo 5418, Eppendorf, Brasil. Microcentrífuga refrigerada, modelo 5417 R, Eppendorf, Brasil. Microscópio invertido, com contraste de Fase, modelo CK2: Olympus, Japão. Centrifuga, modelo 5702R, Eppendorf, Brasil. Citômetro Gallios, Beckman Coulter, Brasil. Software GraphPad 5.0. Software Summit 4.3v. Termociclador Veriti (Applied Biosystems); Estação fluídica GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix); Scanner GeneArray® Scanner 7G (Affymetrix), Software Affymetrix® Expression Console™; Software R / Bioconductor; NanoDrop (Uniscience), Rotor-gene (Qiagen). Espectrofotômetro EON (BioTek). Software SoftMax® data acquisition and analysis (Molecular Devices, EUA). Cuba de eletroforese vertical (S600 – Amersham). Software ImageJ. Termociclador Veriti (Applied Biosystems).

2.5 Material descartável e vidrarias especiais

Câmara de Neubauer, BOECO, Alemanha. Lamínulas (13 mm), Perfecta. Garrafas para cultura de células de 25 cm³ e 75 cm³; tubo Falcon 15 e 50 mL; placas de cultura de fundo chato com tampa, de 96 poços estéreis (Corning, EUA). Microplaca de 96 poços de fundo plano (Greiner Bio-one, Brasil). Membranas esterilizantes tipo GSW 02500 e 04700 de 0,22 µm, Millipore Corporation, EUA. Tubos tipo eppendorf, Axygen, EUA. Ponteiras de 10, 20, 100, 200 e 1000 µL com e sem barreira; microtubos de fundo cônico estéreis 0,2 mL; 0,5 mL e 1,5 mL (Axygen). Seringa de insulina U-100 (27,5G/1/2"). Membrana de nitrocelulose (GE, São Paulo, Brasil). Filme fotográfico especificação.

3 METODOLOGIA

3.1 Tratamento das células Jurkat com o composto LQB-461

As células (1×10^5 /mL) foram incubadas em estufa de CO₂ (em garrafas de cultura de 75 cm²) na presença de LQB-461 (2, 3 e/ou 5 μM) com 0,01% de DMSO (concentração de DMSO contida da diluição mais concentrada e, portanto, padronizada em todos os poços), a 37°C por 72 h em atmosfera úmida a 5% de CO₂. Culturas controle sem DMSO, com DMSO 0,01% e com etoposídeo 0,1 μM também foram realizadas sob as mesmas condições de incubação com LQB-461. O etoposídeo é um fármaco utilizado tradicionalmente no tratamento de diversos tipos de câncer (Montecucco *et al.*, 2015).

A fim de avaliar, sob as mesmas condições experimentais, diferentes aspectos relativos ao mecanismo de ação do LQB-461, este mesmo protocolo de tratamento das células Jurkat foi submetido previamente a todas as metodologias de estudo realizadas neste trabalho (citadas a seguir).

3.2 Análise do receptor Fas por citometria de fluxo

Após o tempo de tratamento das células com o LQB-461, a contagem celular de cada ponto experimental foi determinada em câmara de Neubauer, com azul de tripan, por microscopia óptica, para determinação da viabilidade celular. O equivalente a 5×10^5 células de cada condição experimental estudada foi separada em um tubo Falcon de 15 mL. Após centrifugação (400 x g, 3 min) foram adicionados 500 μL de PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ e 1,5 mM KH₂PO₄) para lavagem das células, e feita nova centrifugação (400 x g, por 3 min). Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 50 μL de PBS para ressuspender as células, as quais foram marcadas com 0,1 μL do anticorpo anti-receptor de Fas (anti-human CD95(Fas)-APC) durante 30 min a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas com 200 μL de PBS, centrifugadas (400 x g, por 3 min), ressuspensas em 500 μL de PBS e analisadas (vinte e cinco mil eventos) no citômetro de fluxo Gallios. A fluorescência

associada ao anticorpo foi detectada pelo canal FL6. Os resultados foram analisados utilizando-se o software Summit 4.3v, e estão expressos pela mediana de intensidade de fluorescência detectada em cada ensaio, descontada da fluorescência basal da célula não marcada.

3.3 **Análise de apoptose associada à expressão de receptor Fas**

Após o tempo de tratamento das células com o LQB-461, a contagem celular de cada ponto experimental foi determinada em câmara de Neubauer, com azul de tripan, para determinação da viabilidade celular. O equivalente a 5×10^5 células de cada condição experimental estudada foi separada em um tubo Falcon de 15 mL. Após centrifugação (400 x g, 3 min), foram adicionados 500 μ L de PBS para lavagem das células e feita nova centrifugação (400 x g, por 3 min). Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas com 50 μ L de PBS e incubadas com 0,1 μ L do anticorpo anti-receptor de Fas (anti-human CD95(Fas)-APC) durante 30 min a 4°C (no gelo). Após a marcação do receptor de Fas, foram adicionados 200 μ L de PBS a cada ensaio e as células foram centrifugadas novamente para lavagem (400 x g, por 3 min). Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas com 50 μ L de tampão de ligação (do kit de marcação com Anexina V), e marcadas com Anexina-V-FITC (2,5 μ L), que identifica a exposição de fosfatidilserina na membrana celular. Após 15 min de incubação, foram adicionados 200 μ L de tampão de ligação e as células foram lavadas novamente (400 x g, por 3 min). Após descarte do sobrenadante, foram adicionados 500 μ L de tampão de ligação e as células foram analisadas (vinte e cinco mil eventos) no citômetro de fluxo de Gallios. A fluorescência da Anexina-V-FITC foi determinada no canal FL1 e a do receptor Fas-APC no canal FL6. As populações foram separadas e analisadas pelo gráfico FS x SSC, que representam tamanho e granulosidade celular, respectivamente. Os resultados foram analisados utilizando-se o software Summit 4.3v, e estão expressos em porcentagem líquida de fluorescência do anticorpo marcado, isto é, a fluorescência de cada condição de cultura, dada em porcentagem nos histogramas de fluorescência obtidos em cada canal, foi descontada do percentual de fluorescência basal da célula não marcada.

3.4 Expressão das proteínas Bax e Bcl-2 por citometria de fluxo

Após o tempo de tratamento das células com o LQB-461, a contagem celular de cada condição experimental foi determinada em câmara de Neubauer, com azul de tripan, por microscopia óptica, para avaliação da viabilidade celular. O equivalente a 5×10^5 células de cada condição experimental estudada foi separado em um tubo Falcon de 15 mL. Após centrifugação a $400 \times g$, 3 min, para retirada do meio de cultura e descarte do sobrenadante, foram adicionados 500 μL de PBS para lavagem das células. Entenda-se por lavagem das células a adição de determinada solução para a suspensão das mesmas, neste caso o PBS, seguido de centrifugação a $400 \times g$, por 3 min, e descarte do sobrenadante. Este termo deverá aparecer em outras metodologias também. Após esta lavagem das células foram adicionados 100 μL por tubo, do permeabilizante *Facs lising* diluído 10 x em água ultrapura (MilliQ), com incubação por 10 min a temperatura ambiente. Após este período, as células foram lavadas com 100 μL de PBS com 5% SFB e 0,1 % de saponina (PBS-SFB-SP) para retirada do excesso de permeabilizante. Após descarte do sobrenadante, foram então adicionados 25 μL de anticorpo purificado anti-Bax (diluição 1: 100) ou anti-Bcl-2 (diluição 1: 100), diretamente sobre o sedimento celular, com os tubos no gelo, protegidos pela luz, e deixados incubar por 30 min. Após nova lavagem das células com PBS-FCS-SP, as células foram marcadas com 100 μL do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo-APC (diluição 1:20), adicionado diretamente ao sedimento celular, e incubadas durante 30 min em banho de gelo, protegidas da luz. As diluições dos anticorpos foram feitas em PBS-FCS-SP. Após a incubação com o anticorpo secundário, as células foram lavadas com 500 μL de PBS e suspensas em 500 μL de PBS. As amostras marcadas separadamente com anti-Bax e anti-Bcl-2 foram analisadas no Citômetro de fluxo Gallios, sendo adquiridos 25.000 eventos por amostra, e a fluorescência do APC, fluorocromo presente no anticorpo secundário, foi lida no canal FL6. Os resultados foram analisados utilizando-se o software Summit 4.3v, e estão expressos em porcentagem líquida de fluorescência do anticorpo marcado, isto é, a fluorescência de cada condição de cultura, dada em porcentagem nos histogramas, foi descontada do percentual de fluorescência basal da célula não marcada.

3.5 Análise da enzima Caspase-3 ativa por citometria de fluxo

Após o tempo de tratamento das células com o LQB-461, as células foram contadas e o equivalente a $0,5 \times 10^6$ células de cada condição experimental estudada foi separado em um tubo Falcon de 15 mL. As células foram lavadas duas vezes com PBS (suspensas no PBS, centrifugadas a $400 \times g$, 3 min, com posterior descarte do sobrenadante) e tratadas por 10 min a temperatura ambiente com 100 μL de *Facs lising* diluído 10 x em água MilliQ, para permeabilização das células. Após este período, as células foram lavadas com 100 μL de PBS com 5% de SFB. Foram então adicionados 5 μL de solução (diluição 1:10) de anticorpo anti Caspase-3 ativa humana-FITC), diretamente sobre o sedimento celular e os tubos foram incubados por 30 min em banho de gelo, protegidos da luz. Após a incubação, as células foram lavadas com 500 μL PBS, suspensas novamente em 500 μL de PBS e analisadas no citômetro de fluxo Gallios, sendo adquiridos 25.000 eventos por amostra, e a fluorescência detectada no canal FL1. Os resultados foram analisados utilizando-se o software Summit 4.3v, e estão expressos em porcentagem líquida de fluorescência do anticorpo marcado, isto é, a fluorescência de cada condição de cultura, dada em porcentagem nos histogramas, foi descontada do percentual de fluorescência basal da célula não marcada.

3.6 Expressão das proteínas mTOR, S6kP70, RB1 e LC-3a por *Western Blotting*

3.6.1 Extração de proteínas

Após tratamento das células Jurkat com o LQB-461, o extrato total de proteínas celular foi obtido através de lise celular por tratamento das células com 100 μ L do tampão de lise RIPA (composição descrita no item 3.3), contendo inibidores de proteases. Visando promover a lise de membranas celulares e liberação de proteínas, as células no tampão RIPA foram homogeneizadas com ponteira, e deixadas por 15 min no gelo. Logo em seguida, os lisados celulares foram coletados, passados em seringa de insulina para a quebra do DNA e centrifugados a 14.000 x g, em microcentrífuga refrigerada, por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante onde se encontra as proteínas extraídas foi coletado e armazenado a -20°C, o precipitado com degradados celulares foi desprezado.

3.6.2 Quantificação de proteínas

Foi realizada pelo método colorimétrico Pierce® Bicinchoninic acid assay (BCA) protein assay, segundo o protocolo descrito pelo fabricante. Primeiramente foram misturadas 50 partes do reagente A (BCA em tampão bicarbonato) com uma parte do reagente B (sulfato de cobre 4%). Em uma microplaca de 96 poços de fundo plano, foi construída a curva padrão de soroalbumina bovina (BSA), para as concentrações finais de 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL, o “branco” (SDS 1%) e as amostras (10 μ L / poço). Em seguida, em cada poço, foram adicionados 200 μ L da mistura dos reagentes A e B, seguido de incubação a 37° C por 30 min, em estufa. A leitura das absorvâncias de luz nos diferentes poços foi realizada em espectrofotômetro de microplacas EON, no comprimento de onda de 562 nm. Os resultados foram analisados pelo software SoftMax® data acquisition and analysis, e expressos em mg/ml, utilizando-se uma curva padrão de soroalbumina bovina.

3.6.3 Análise das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida

Para esta análise, os lisados proteicos celulares totais de cada ensaio (15 µg) foram misturados separadamente, com 25% do seu volume de tampão de amostra (composição descrita no item 3.3) e fervidos por 10 minutos em banho seco. As amostras e o padrão proteico (item 3.3) de massa molecular foram aplicados em gel de poliacrilamida, composto por um gel de empilhamento a 6% e um gel de separação a 12%. Em relação ao padrão de peso molecular, foram aplicados 5µL conforme especificação do fabricante, e em relação ao volume das amostras houve variação entre elas devido a concentração de cada uma, sendo que os volumes variaram de 10 a 15µL. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (composição descrita no item 3.3), sob voltagem constante de 100V, em cuba de eletroforese vertical ou até a saída do corante do gel de corrida (aproximadamente 2 h).

Finalizada a corrida, o gel foi submetido à transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (composição descrita no item 3.3). A transferência foi realizada *overnight* sob voltagem constante de 20V em câmara fria, aproximadamente 4°C. As membranas foram coradas com solução de Amido Black (composição descrita no item 3.3) para a confirmação da transferência proteica, posteriormente, descorada por lavagens com solução de TBS/T (composição descrita no item 3.3).

As membranas foram bloqueadas com solução TBS/T com 5% de BSA por 1 hora e incubadas separadamente *overnight* com anticorpos policlonais anti-mTOR, anti-mTOR fosforilado, anti-RB1, anti-S6KP70 e Anti-LC-3 na diluição de 1:500 em solução de bloqueio (TBS/T com 5% de BSA). Após esta incubação, as membranas foram lavadas com TBS/T e logo em seguida, foram incubadas por 1 hora com anticorpo anti-mouse IgG conjugado a peroxidase, diluído 1:10.000 em TBS-T com 5% de BSA. A fluorescência foi identificada utilizando o kit ECL Advanced *Western Blotting* Detection e a revelação foi feita com auxílio de filme fotográfico, solução de revelação e solução de fixação (composições descritas no item 3.3).

Após a revelação, a membrana foi submetida à um processo para remoção química do anticorpo, através de incubação com NaOH 0,2 M, sob agitação por 5 minutos. A membrana foi novamente bloqueada por 1 hora com TBS/T contendo 5% de leite desnatado e então foi realizado uma nova incubação *overnight* com o anticorpo para β-tubulina na diluição de 1:1.000. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS/T uma vez e incubada com anticorpo

secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma, Saint Louis, EUA) diluído 1:5.000 em tampão de bloqueio. A revelação foi realizada da mesma maneira como descrito anteriormente. A análise densitométrica das bandas, contendo as proteínas, foi realizada utilizando-se o software ImageJ. Os resultados encontram-se expressos como dados brutos de densidade (proteína RB1, S6KP70 e LC3) ou na forma de razão de duas densidades brutas, como são mostrados os resultados da expressão de mTOR fosforilado (ativado) e mTOR total.

Após obtida a densidade dos pixels, é realizada a comparação entre os valores obtidos referentes as amostras estimuladas com a densidade da banda referente ao controle experimental não estimulado.

3.7 **Análise da expressão gênica (mRNA) de *p21*, *Bax*, *Bcl-2* e *Fas***

Após o tempo de tratamento das células com o LQB0461, a contagem celular de cada condição experimental foi determinada em câmara de Neubauer, com azul de tripan, por microscopia óptica, para determinação da viabilidade celular. O equivalente a $0,5 \times 10^6$ células de cada condição experimental estudada foi separado em um tubo Falcon de 15 mL. As células foram centrifugadas (400 x g, 3 min), e lavadas com 500 μ L de PBS (ressuspensas, centrifugadas na mesma condição anterior e o sobrenadante descartado).

3.7.1 Extração de RNA

Após descartado o sobrenadante as células (1×10^5 /mL) foram homogeneizadas em 1 mL de TRIzol® e incubadas durante 5 min a temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio, as amostras foram agitadas durante 15 s em vórtex e incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente. Depois desta incubação, as células foram centrifugadas (10.000 rpm) durante 15 min em microcentrífuga a 4°C, sendo formadas duas fases, e uma interfase. Na fase superior encontramos a fase aquosa contendo o RNA, de coloração translúcida, na fase inferior de coloração rósea encontramos precipitados orgânicos como proteínas e lipídeos, interfase encontramos, de coloração leitosa e fina espessura encontramos o DNA. A Fase aquosa, contendo o RNA total foi transferida para outro tubo, ao

qual foi adicionado 0,5 mL de isopropanol. Cada amostra foi então agitada e incubada durante 10 min à temperatura ambiente, centrifugada (12.000 rpm/ min) e o sobrenadante foi rejeitado. O sedimento, contendo o RNA total foi então lavado duas vezes com etanol a 75% (v/v), centrifugado a 10.000 rpm por 5 min e solubilizado em 20 µL de água tratada com 0,1% (v/v) de dietilpirocarbonato (DEPC).

A concentração de RNA nas amostras foi determinada a partir da leitura da absorvância das mesmas em espectrofotômetro Nanodrop, no comprimento de onda de 260 nm, utilizando 1,0 µL de RNA das amostras. Para avaliar possível contaminação desse material (ex: trizol, proteínas), os comprimentos de onda 230 nm e 280 nm também foram utilizados. As amostras que obtiveram razões das absorvâncias 260/280 e 260/230 acima de 1,7 foram consideradas adequadas para dar continuidade aos experimentos.

3.7.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de cDNA, o RNA extraído foi processado de acordo com as instruções do fabricante Thermofisher (RT com *superscript 2*). No *mix* de reação, para o volume de RNA contendo 500 ng de cada amostra, foram adicionados 150 ng de *Random primer*, DNTPs (1 µL a 10 mM), e água (ultrapura desionizada autoclavada) para compor o volume final dos 12 µL. As incubações e reações deste ensaio foram realizadas em termocicladora, onde o *mix* de reação foi aquecido a 65°C por 5 min, depois imediatamente colocado no gelo, quando foram adicionados 4 µL de tampão da primeira cadeia 5x concentrado e 2 µL de ditiotreitól para incubação a 25°C por 2 min. Depois disso, a enzima *Superscript II RT* foi adicionada para incubação a 25°C por 10 min e depois uma incubação adicional a 42°C por 50 min (em termocicladora). Para desativar a enzima, as amostras foram aquecidas em termocicladora por 15 min a 70°C.

3.7.3 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-PCR)

As reações de PCR quantitativa (RT-PCR) foram realizadas na plataforma *Rotor-gene*. Em cada reação foram adicionados 5 µL de tampão GoTaq® RT-PCR *Master Mix*, 0,3 µL de cada um dos oligonucleotídeos específicos da reação (10 µM), 1,0 µL de cDNAs diluídos 1:10 e 3,4 µL de água desionizada autoclavada. As reações ocorreram com a seguinte ciclagem: 40 ciclos a 95°C, por 15 s, e 60°C por 60 s, com captura subsequente de fluorescência.

Para a quantificação dos resultados e determinação da eficiência específica dos *primers* de oligonucleotídeos para cada gene, uma curva de expressão padrão foi estabelecida usando uma diluição seriada de cDNA de culturas controles, isto é, cultura de células Jurkat não tratadas com LQB-461 ou etoposídeo, apenas com o DMSO 0,01%. Após a amplificação dos produtos, foi realizada a análise da curva de dissociação (curva de *melting*).

A diferença entre as médias (de três experimentos) do gene de interesse e o gene de referência, *GAPDH*, foi calculada pelo programa Microsoft Excel 2010 e o valor de quantificação relativa foi expresso como $2^{-\Delta Cq}$ (Livak e Schmittgen, 2001). As sequências dos *primers* da reação de RT-PCR são:

*GAPDH*_SENSE: 5' -GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC - 3'

*GAPDH*_ANTIENSENSE: 5' -TGG TGA AGA CGC CAG TGG A- 3'

*β-ACTINA*_SENSE: 5' -CCAGATCATGTTTGAGACCTT- 3'

*β-ACTINA*_ANTIENSENSE: 5' -CGGAGTCCATCACGATGCCAG- 3'

*FAS*_SENSE: 5' -GGCATCTGGACCCTCCTACCTCTG- 3'

*FAS*_ANTIENSENSE: 5' -CCTTGGAGTTGATGTCAGTCACTTGG- 3'

*BCL-2*_SENSE: 5'-GGTGGGGTCATGTGTGTGG- 3'

*BCL-2*_ANTIENSENSE: 5' -CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC- 3'

*BAX*_SENSE: 5' -CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG- 3'

*BAX*_ANTIENSENSE: 5' -CCAGCCCATGATGGTTCTGAT- 3'.

*P21*_SENSE: 5'-GTTCCCTTGTGGAGCCGGAGC-3'

*P21*_ANTIENSENSE: 5'-GGTACAAGACAGTGACAGGT-3'

3.8 Análise do transcriptoma das células Jurkat tratadas com LQB-461, por microarranjo de DNA

Analisamos o perfil de expressão gênico global das células através da técnica de microarranjo de DNA, utilizando três experimentos independentes para cada grupo de amostras. A preparação das amostras para a análise de microarranjo de DNA foi realizada com a utilização do *WT Expression Kit*, conforme recomendação da Affymetrix, (Gene Chip Expression Analysis Technical Manual - USA). O RNA total de cada amostra foi convertido em cDNA dupla-fita. Para tanto, 3,0 µL da solução de RNA contendo 100 ng do pool de RNA de cada condição experimental foram adicionados em um microtubo contendo 2,0 µL do controle Poly-A e 5,0 µL do *mix* para síntese da primeira fita de cDNA. Os tubos contendo cada uma das reações foram incubados no termociclador Veriti, com as seguintes condições: 1 h à 25°C; 1 h à 42°C e 2 min à 4°C. Após este processo, os tubos foram colocados no gelo e a síntese da segunda fita de cDNA foi realizada, formando um cDNA dupla-fita, conforme descrito a seguir. Após a adição de 50,0 µL do *Second-Strand Mix* em cada uma das reações, os microtubos foram incubados no termociclador Veriti, para síntese da segunda fita, nas seguintes condições: 1 h à 16°C; 10 min à 65°C e 2 min à 4°C.

Para a síntese do RNA complementar (cRNA) biotilado, o volume total do cDNA sintetizado foi utilizado em uma reação de transcrição *in vitro*, contendo solução tampão (*GeneChip® HT Hybridization, Wash, and Stain Kit*) e enzima para a transcrição *in vitro*. A reação ocorreu incubando-se a mistura de reagentes por 16 h a 40°C no termociclador Veriti. Após o final do processo, o cRNA foi purificado utilizando *beads* magnéticas (Nucleic Acid Binding Beads). Antes de proceder com a nova síntese de cDNA, a eficiência da reação foi verificada através de quantificação no espectrofotômetro NanoDrop, com absorvância das amostras determinadas no comprimento de onda de 260 nm. As reações foram consideradas eficientes quando a concentração de cRNA foi maior ou igual a 455 ng/µL.

O segundo ciclo de síntese de cDNA foi realizado com cRNA purificado e oligonucleotídeos randômicos, com incubação de 5 min a 70°C, 5 min a 25°C e 2 min a 4°C. No produto da reação foi adicionado tampão e enzima, ambos fornecidos pelo kit (*GeneChip® HT Hybridization, Wash, and Stain Kit*) e posteriormente incubados por 10 min a 25°C, 90 min a 42°C, 10 min a 72°C e 2 min a 4°C. Para hidrolizar o RNA na amostra, a RNase H foi adicionada à mistura, a qual foi submetida a incubação por 45 min a 37°C, 5 min a 95°C e 2

min a 4°C. O produto do segundo ciclo de cDNA foi então purificado utilizando *beads* magnéticas. A síntese e purificação de cRNA foi realizada utilizando etanol no lugar do isopropanol, fornecendo um cDNA simples fita (ssDNA), que foi quantificado para avaliar a eficiência da reação no espectrofotômetro NanoDrop, com absorvância da amostra determinada no comprimento de onda de 260 nm.

Para hibridação, os cRNA de cada amostra foram fragmentados com tampão de fragmentação da enzima Uracil-DNA Glycosylase (UDG), enzima endonuclease purínica apiridínica humana (APE) e água para completar o volume final. Essa mistura foi posteriormente incubada por 60 min a 37°C, 2 min a 95°C e 2 min a 4°C. O tamanho dos fragmentos foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 1%. Antes da fragmentação as bandas devem ser equivalentes a 0,5 kb e, após a fragmentação devem ser equivalentes a fragmentos de 35 a 200 bases. A primeira marcação foi realizada com os produtos da fragmentação, tampão da desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) (5x concentrado) e reagente de marcação de DNA, incubando-se por 60 min a 37°C, 10 min a 70°C e 2 min a 4°C.

Para cada amostra foi utilizado um *chip* de microarranjo *Human gene 1.0 ST* (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA), que avalia mais de 14.500 genes humanos. Os microarranjos foram previamente equilibrados a temperatura ambiente. Uma mistura de reação para cada amostra foi preparada contendo água ultrapura em quantidade suficiente para 100,0 µL, 27,0 µL da reação ssDNA fragmentada, 1,7 µL de oligonucleotídeo B2 Controle (Affymetrix), 5,0 µL de controles de hibridação eucarióticos 20X (bioB, bioC, bioD, cre) (Affymetrix), 50,0 µL de tampão de hibridação 2X e 7,0 µL de DMSO. No termociclador, essa mistura foi aquecida a 99°C por 5 min e logo em seguida resfriada a 45°C por 5 min. Os microtubos contendo as misturas de reação foram centrifugados por 5 min na velocidade de 12.000 x g, para remover qualquer material insolúvel. O sobrenadante foi removido dos microtubos e substituído pela mistura de reação clarificada (*GeneChip® HT Hybridization, Wash, and Stain Kit*). Os microarranjos foram acondicionados em caixas do tipo *rotisserie* em forno de hibridação a 45°C e hibridados por 17 h com rotação de 60 rpm. Todos os processos de lavagem e coloração foram feitos na estação fluídica GeneChip® Fluidics Station 450 de acordo com a seguinte programação: 10 ciclos de 2 mixes/ciclo com tampão A a 30°C, 6 ciclos de 15 mixes/ciclo com tampão B a 50°C, tampão SAPE por 5 min a 35°C, 10 ciclos de 4 mixes/ciclo com tampão A a 30°C, solução de anticorpo por 5 min a 35°C, tampão SAPE por 5 min a 35°C e 15 ciclos de 4 mixes/ciclo com tampão A a 35°C.

Para a leitura óptica dos chips *Human gene 1.0 ST*, os arranjos de sonda foram lidos em scanner GeneArray® Scanner 7G (Affymetrix), equipado com laser de íon argônio, programado segundo as instruções do fabricante. A captura das imagens e análise inicial das hibridações foi feita com o software Affymetrix® Expression Console™ e os arquivos gerados foram salvos em formato *.cel.

Os dados obtidos na aquisição dos sinais de fluorescência presentes nos arquivos *.cel foram normalizados e sumarizados utilizando o software Expression Console (Affymetrix). Em relação ao microarranjo, após a normalização e sumarização, os dados foram analisados no software Transcriptome Analysis Console.

3.9 Análise de enriquecimento dos dados do Microarranjo pelo software WEB-based Gene set Analysis Toolkit (WebGestalt)

Visando identificar vias de sinalização ou processos biológicos associados ao perfil de expressão induzido pelo tratamento das nossas células com o LQB-461, realizamos uma análise de enriquecimento de dados do microarranjo. Para esta análise foi estabelecido como parâmetro a seleção de genes com aumento ou diminuição de expressão igual ou superior a 30% em relação ao controle não tratado, baseados nos valores de *Fold-Change*. O cálculo de *Fold-Change* (\log_2) é realizado através da razão das médias dos valores obtidos do controle e do tratado, contudo também podem ser comparados dois tratamentos entre si.

Para o critério de seleção discutido anteriormente, foram avaliados 1010 genes com expressão alterada após o tratamento com o LQB-461. A categorização funcional foi realizada com base nos termos do Gene Ontology (GO), utilizando o software WEB-based Gene set Analysis Toolkit (WebGestalt). Foram consideradas enriquecidas as principais 50 categorias para cada termo do GO baseado no valor de p ajustado para múltiplos testes (adjP <0,05).

3.10 Análise individual dos dados do microarranjo de DNA pela plataforma do Pubmed

Além da análise de enriquecimento, foi realizada uma análise na literatura de cada um dos genes selecionados no tópico anterior. No estudo individual desses genes foram considerados os efeitos anteriormente descritos da ação do LQB-461 (Thimoteo, 2017) e seus possíveis mecanismos de ação, como parâmetro de investigação, sendo também, desta forma, realizada uma pesquisa avançada na plataforma Pubmed, onde as palavras chaves câncer, apoptose, autofagia e proliferação foram cruzadas para a atualização do estudo literário. Essa pesquisa foi realizada entre o período de março de 2020 até setembro de 2020. O cálculo de *Fold-Change* (\log_2) foi realizado através da razão das médias dos valores obtidos do controle e do tratado. Os valores de *fold change* foram convertidos em porcentagem.

3.11 Análise estatística

A análise de diferença de expressão nos resultados obtidos foi realizada pelo *software GraphPad Prism 5.0*. Para tanto, foi realizado um teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os valores de expressão gênica das amostras de cada grupo são paramétricos, isto é, apresentaram uma distribuição normal. Em seguida, para análise de variância entre amostras de foi aplicado o teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey para análise de significância. As diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas. A categorização funcional do microarranjo foi realizada com base nos termos do Gene Ontology (GO), utilizando o software WEB-based Gene set Analysis Toolkit (WebGestalt). Foram consideradas enriquecidas as principais 50 categorias para cada termo do GO baseado no valor de p ajustado para múltiplos testes ($\text{adj}P < 0,05$).

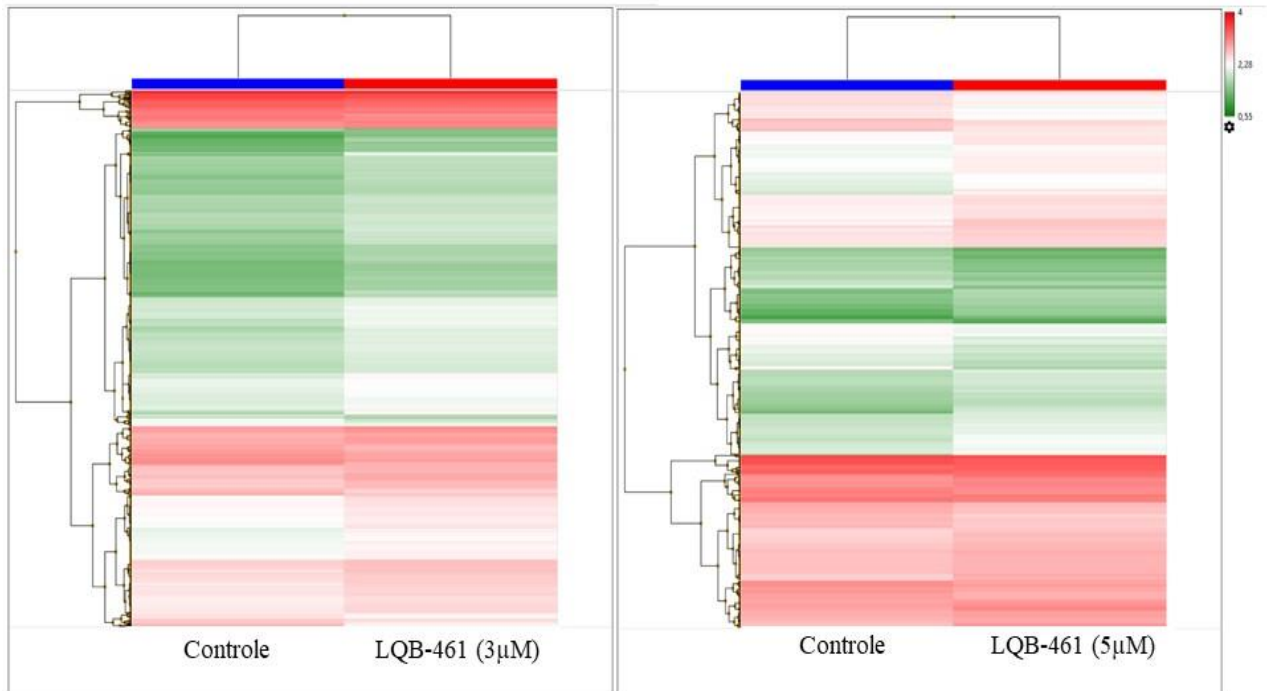
4 RESULTADOS

4.1 Análise de enriquecimento dos genes diferencialmente expressos por microarranjo

A determinação de possíveis genes diferencialmente expressos (GDEs) na comparação de células Jurkat, tratadas e não tratadas com diferentes concentrações de LQB-461, foi realizada de acordo com critérios já descritos na metodologia (item 4.13). Encontramos o número total de 4621 genes modulados pelo LQB-461 a 3 μ M, em que 87,5 % foram regulados positivamente (4044 genes) enquanto apenas 12,5 % foram regulados negativamente (577 genes), comparados ao controle não tratado, sinalizando um perfil de maior indução de expressão gênica do que inibição.

Ainda sobre o mesmo critério de avaliação, encontramos um total de 1310 genes no tratamento a 5 μ M, dos quais 62,8 % foram regulados positivamente (823 genes) e 37,2 % negativamente (487 genes). Apesar de também mostrar maior porcentagem de genes superexpressos em relação aos subexpressos, essa diferença foi menos acentuada. Podemos observar agrupamento de genes por *heatmap* na Figura 9.

Figura 9 – Agrupamento de genes do ensaio de microarranjo, por *heatmap*, na investigação dos efeitos do LQB-461 em células Jurkat *in vitro*

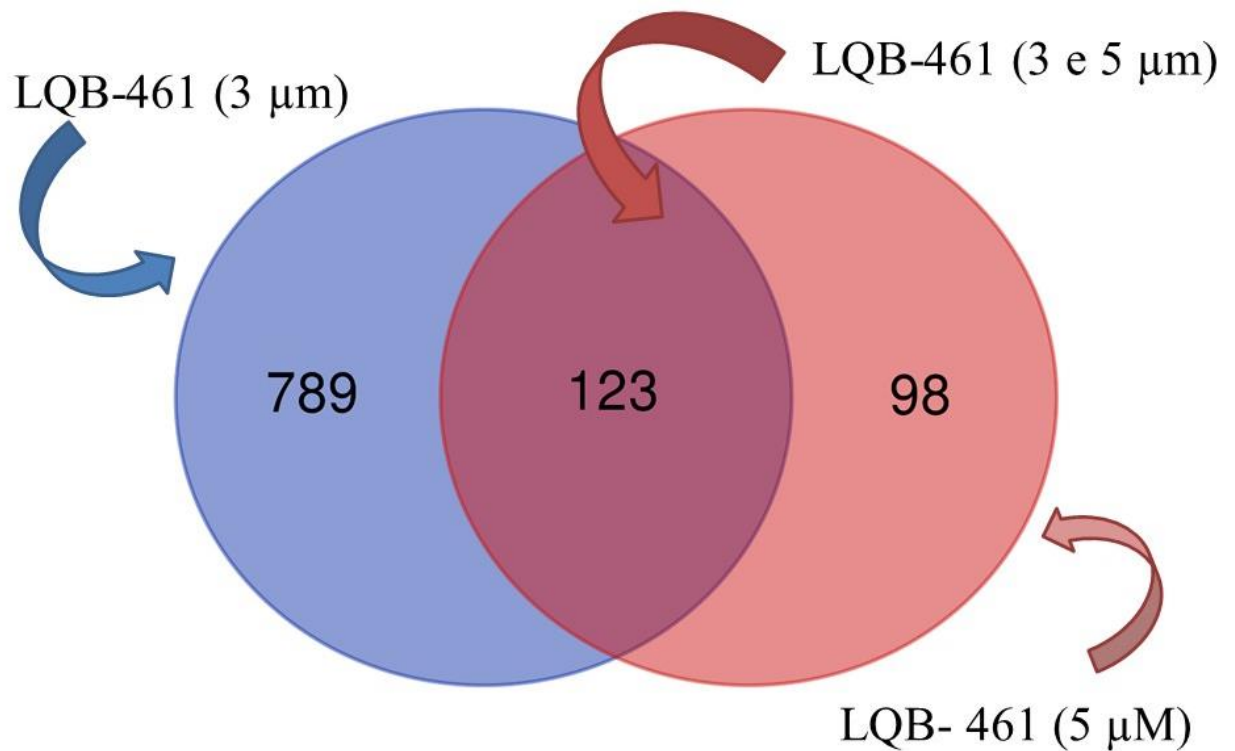


Legenda: O padrão de variação de cores, leva em consideração a expressão para cada gene. Tons verdes indicam genes superexpressos, e tons de vermelho, subexpressos. As células ($1 \times 10^5/\text{mL}$) foram incubadas na presença ou ausência (controle) de diferentes concentrações de LQB-461 ($3 \mu\text{M}$, figura à esquerda, e $5 \mu\text{M}$, figura à direita) por 72 h a 37°C , e a expressão gênica foi avaliada por análise de microarranjo. Os dados representam os resultados de um pool de três experimentos independentes. Os dados foram analisados no software Transcriptome Analysis

Fonte: A autora, 2021.

Visando realizar uma análise de enriquecimento de dados direcionada aos genes com maior alteração na sua expressão, quando comparados os tratados com o controle, foi estabelecido o limite de 30% na seleção de genes com expressão acima ou abaixo em relação ao controle. Na Figura 10, podemos observar um gráfico desta seleção, totalizando 1010 genes, modulados positivamente ou negativamente em relação ao controle, após o tratamento com o LQB-461. Do total, 789 genes se mostraram alterados apenas na concentração de $3 \mu\text{M}$, 98 genes alterados somente na concentração de $5 \mu\text{M}$ e 123 genes modulados em ambas as concentrações de tratamento utilizadas.

Figura 10 – Seleção de genes com expressão regulada positivamente e negativamente em relação ao controle após o tratamento com o LQB-461



Legenda: Foi estabelecido como parâmetro a seleção de genes com aumento ou diminuição de expressão igual ou superior a 30% em relação ao controle.

Fonte: Os dados foram analisados e o gráfico foi construído através do programa Excel e Power point.

Os dados dos 1010 genes anteriormente selecionados foram submetidos à análise de enriquecimento. Foram feitas análises considerando os GDEs entre controle e tratado à 3 μM; entre controle e tratado à 5 μM; entre controle e os GDEs comuns aos dois tratamentos (interseção) e entre controle e todos os GDEs somando os dois tratamentos. As Tabelas 1 e 2 mostram a categorização funcional para a seleção de genes modulados positivamente e negativamente, respectivamente, quando as células são tratadas por 72 h com 3 μM do LQB-461.

Tabela 1 - Categorização funcional positiva dos genes pelo tratamento com LQB-461 a 3 μ M

Descrição	Valor de P
percepção sensorial de estímulo químico	0.0000015548
detecção de estímulos envolvidos na percepção sensorial	0.0000054547
detecção de estímulo químico	0.0000062533
resposta à gonadotrofina	0.00074889
processo catabólico de drogas	0.0027969
sinalização de proteína quinase B	0.0035101
processo metabólico de íon amônio	0.0058373
produção de interleucina-1	0.0088235
regulação do desenvolvimento da vasculatura	0.0089447
resposta ao estímulo por xenobiótico	0.010031
processo metabólico de composto hidroxil orgânico	0.011798
organização para projeção de membrana	0.012740
resposta celular ao estímulo biótico	0.014384
resposta ao interferon-alfa	0.014394
regulação da resposta inflamatória	0.016090
via de sinalização do receptor de serotonina	0.018152
modificação lipídica	0.019515
processo de cofator catabólico	0.019887
regulação da quimiotaxia	0.020415
remodelação de tecido	0.021939
ativação de células natural killer	0.026599
regulação positiva da resposta a estímulos externos	0.026955
adesão célula-substrato	0.028617
regulação negativa da resposta a estímulos externos	0.030606
processo catabólico lipídico	0.033778
produção de citocinas da superfamília do fator de necrose tumoral	0.034130
regulação negativa da locomoção	0.035451
quimiotaxia celular	0.039919
desenvolvimento de tecido biomineral	0.042343

processo celular envolvido na reprodução em organismos multicelulares	0.043208
secreção de citocinas	0.048471
processo apoptótico de células epiteliais	0.048817

Análise através do programa *WEB-based Gene set Analysis Toolkit* (WebGestalt), com a categorização funcional com base nos termos do *Gene Ontology* (GO) onde foram consideradas enriquecidas as principais 50 categorias para cada termo do GO, baseado no valor de p ajustado para múltiplos testes (adjP <0,05).

Tabela 2 - Categorização funcional negativa dos genes pelo tratamento com LQB-461 a 3 μ M

Descrição	Valor de P
iniciação traducional	0.0000052281
localização da proteína no retículo endoplasmático	0.0000053631
Direcionamento de proteína	0.0000069727
estabelecimento da localização da proteína na membrana	0.000026209
processo catabólico de RNA	0.000059733
tradução citoplasmática	0.000085278
processamento ncRNA	0.00065902
resposta ao fator inibidor de leucemia	0.0014335
reparo de excisão de base	0.0014542
processo metabólico de rRNA	0.0015911
biogênese do complexo ribonucleoproteico	0.0020752
reparo de excisão de nucleotídeo	0.0027194
diversificação somática de receptores imunológicos	0.0054240
indução de tolerância	0.0082035
controle de qualidade de proteína para proteínas mal enoveladas ou sintetizadas de forma incompleta	0.0095305
regulação da expressão gênica, epigenética	0.011435
regulação da resposta imune inata	0.012347
modificação de peptidil-cisteína	0.023176
produção de interferon tipo I	0.023578
regulação positiva da resposta de defesa	0.024342

imunidade mediada por mastócitos	0.027358
resposta ao fator de crescimento epidérmico	0.028447
processo catabólico de proteína proteassomal	0.030437
alongamento traducional	0.030630
organização da subunidade do complexo ribonucleoproteico	0.037501
transcrição por RNA polimerase I	0.040256
ativação de mastócitos	0.040256
poliubiquitinação de proteína	0.043296
sinalização de I-kappaB quinase / NF-kappaB	0.043296
regulação do processo metabólico de lipídios	0.047528
monoubiquitinação de proteína	0.048081

Análise através do programa *WEB-based Gene set Analysis Toolkit (WebGestalt)*, com a categorização funcional com base nos termos do *Gene Ontology (GO)* onde foram consideradas enriquecidas as principais 50 categorias para cada termo do GO, baseado no valor de p ajustado para múltiplos testes (adjP <0,05).

Com os resultados obtidos nas Tabelas 1 e 2 podemos observar que a análise de enriquecimento sinalizou ($p < 0,05$) a regulação positiva de 32 diferentes processos biológicos e a regulação negativa de 31 processos biológicos após o tratamento de células Jurkat com LQB-461 (3 μ M).

Também foi realizada a análise de enriquecimento dos genes regulados após o tratamento na maior concentração testada do LQB-461, 5 μ M. As Tabelas 3 e 4 mostram a categorização funcional para a seleção de genes positivamente e negativamente regulados nesta concentração, onde observamos que o LQB-461, após 72 h de incubação, ativou ($p < 0,05$) 40 processos biológicos e inibiu 23 processos ($p < 0,05$), quando comparado ao controle, respectivamente.

Tabela 3 - Categorização funcional positiva dos genes pelo tratamento com LQB-461 a 5 μ M

Descrição	Valor de P
detecção de estímulos envolvidos na percepção sensorial	1,00E-04
percepção sensorial de estímulo químico	8,69E-04
detecção de estímulo químico	5,58E-03
resposta aos níveis de nutrientes	0.0013909
processo metabólico de espécies reativas de nitrogênio	0.0020251
regulação da atividade do fator de transcrição de ligação ao DNA	0.0028292
migração de leucócitos	0.0037234
transporte de aminoácidos modificado	0.0038200
processo metabólico celular de aminoácidos modificado	0.0041221
resposta ao agente antineoplásico	0.0044836
resposta ao interferon-gama	0.0050077
regulação dos níveis de neurotransmissores	0.0065275
Sinalização de TOR	0.0070639
resposta a substância tóxica	0.0075271
resposta celular ao estímulo biótico	0.0077609
resposta ao carboidrato	0.0078881
homeostase de carboidratos	0.0090952
transporte de composto de enxofre	0.0095868
processo celular biossintético de aminoácidos modificados	0.010055
resposta a amina	0.010533
processo metabólico de espécies reativas de oxigênio	0.012196
resposta ao estímulo xenobiótico	0.013973
processo metabólico secundário	0.018229
quimiotaxia celular	0.018442
resposta à radiação	0.018834
processo metabólico de pigmentos	0.023421
resposta à cetona	0.026522
cascata ERK1 e ERK2	0.027223
resposta ao peptídeo	0.028262
transporte de derivados de carboidratos	0.028401

resposta à molécula de origem bacteriana	0.028651
resposta celular a estímulos externos	0.030123
processo metabólico de composto hidroxil orgânico	0.030358
adesão célula-célula homotípica	0.032195
processo metabólico de ácidos graxos	0.033200
resposta celular à droga	0.033200
proliferação de fibroblastos	0.034561
regulação da quimiotaxia	0.036365
ativação de células natural killer	0.037819
resposta ao fator inibidor de leucemia	0.042917

Análise através do programa *WEB-based Gene set Analysis Toolkit (WebGestalt)*, com a categorização funcional com base nos termos do *Gene Ontology (GO)* onde foram consideradas enriquecidas as principais 50 categorias para cada termo do GO, baseado no valor de p ajustado para múltiplos testes (adjP <0,05).

Tabela 4 - Categorização funcional negativa dos genes pelo tratamento com LQB-461 a 5 µM

Descrição	Valor de P
iniciação traducional	0.0012617
imunidade mediada por neutrófilos	0.0015784
ativação de granulócitos	0.0016474
processamento ncRNA	0.0024151
localização de proteínas no retículo endoplasmático	0.0046267
processo metabólico secundário	0.010014
Processo catabólico de RNA	0.010500
regulação do processo metabólico da amida celular	0.016365
Direcionamento de proteína	0.019193
tradução citoplasmática	0.020666
desenvolvimento pós-embrionário	0.021620
processo metabólico de rRNA	0.023737
biogênese do complexo ribonucleoproteico	0.026116
modificação de DNA	0.032117
regulação pós-transcricional da expressão gênica	0.033915
modificação de proteínas por remoção de pequenas proteínas	0.037863
regulação da organização do citoesqueleto	0.038027

hidrólise de ligação fosfodiéster de ácido nucleico	0.038209
organização da membrana mitocondrial	0.040431
estabelecimento da localização da proteína na membrana	0.042123
processo catabólico lipídico	0.045094
organização do citoesqueleto de microtúbulos envolvida na mitose	0.046160
processo metabólico de composto de glicosila	0.048798

Análise através do programa *WEB-based Gene set Analysis Toolkit (WebGestalt)*, com a categorização funcional com base nos termos do *Gene Ontology (GO)* onde foram consideradas enriquecidas as principais 50 categorias para cada termo do GO, baseado no valor de p ajustado para múltiplos testes (adjP <0,05).

Com o objetivo de averiguar quais processos biológicos foram modulados em ambas concentrações testadas do LQB-461, foi realizada também uma análise de enriquecimento destes genes comuns, cujos resultados podem ser vistos na Tabelas 5.

Tabela 5 - Categorização funcional dos genes modulados pelo tratamento com LQB-461 com ambas as concentrações de 3 e 5 μ M

Descrição	P Value
percepção sensorial de estímulo químico	0.000022343
detecção de estímulos envolvidos na percepção sensorial	0.000024326
detecção de estímulo químico	0.00012191
regulação da atividade do fator de transcrição de ligação ao DNA	0.0097189
resposta celular a estímulos externos	0.023217
proliferação de fibroblastos	0.029826
processamento ncRNA	0.031508
resposta ao carboidrato	0.036113
resposta ao álcool	0.036541
resposta ao fator inibidor de leucemia	0.037104
organização da estrutura extracelular	0.042020
processo apoptótico de células epiteliais	0.042564

Análise através do programa *WEB-based Gene set Analysis Toolkit (WebGestalt)*, com a categorização funcional com base nos termos do *Gene Ontology (GO)* onde foram consideradas enriquecidas as principais 50 categorias para cada termo do GO, baseado no valor de p ajustado para múltiplos testes (adjP <0,05).

Na Tabela 5 observamos que a análise de enriquecimento do grupo de genes alterados, positivamente e negativamente, em ambas as concentrações do LQB-461, sinalizou 12 processos biológicos modulados de forma significativa ($p < 0,05$). Buscando aprofundar a análise dos processos biológicos modulados pelo LQB-461, foi feita uma nova análise de enriquecimento dos genes obtidos da interseção, analisando separadamente os genes positivamente e negativamente modulados em ambas as concentrações. Podemos observar na Tabela 6 os processos biológicos que são modulados positivamente em ambas as concentrações de 3 μM e 5 μM , enquanto na Tabela 7 encontramos os processos regulados negativamente.

Tabela 6 - Categorização funcional positiva dos genes pelo tratamento com LQB-461 em ambas as concentrações de 3 e 5 μM

Descrição	Valor de P
percepção sensorial do olfato	7,11E-03
percepção sensorial de estímulo químico	0.0000025833
detecção de estímulos envolvidos na percepção sensorial	0.0000028699
detecção de estímulo químico envolvido na percepção sensorial do olfato	0.0000046261
detecção de estímulos químicos envolvidos na percepção sensorial	0.000010879
Via de sinalização do receptor acoplado à proteína G	0.000013543
detecção de estímulo químico	0.000018571
detecção de estímulo	0.000027612
ligação de vírion mediada por receptor à célula hospedeira	0.000066857
percepção sensorial	0.000081715
processo do sistema nervoso	0.00010918
ligação do vírion à célula hospedeira	0.00029836
adesão do simbiote à célula hospedeira	0.00043614
adesão do simbiote ao hospedeiro	0.00078771
conjunto de matriz extracelular	0.0016415
regulação negativa do processo apoptótico das células endoteliais	0.0029772
regulação da atividade do fator de transcrição de ligação ao DNA	0.0037868
regulação negativa do processo apoptótico de células epiteliais	0.0051637
regulação do processo apoptótico de células endoteliais	0.0075998

regulação positiva da proliferação de fibroblastos	0.0081993
processo apoptótico de células endoteliais	0.0091370
organização da matriz extracelular	0.012592
estabelecimento da barreira celular de Sertoli	0.013047
Processamento e apresentação de antígenos de células T	0.013047
membrana para encaixe de membrana	0.013047
especificação de somito	0.013047
desenvolvimento de esclerótomo	0.013047
transporte de aminoácidos de enxofre	0.015636
regulação da locomoção envolvida no comportamento locomotor	0.015636
migração de células-tronco hematopoéticas	0.015636
transporte de glutamina	0.015636
regulação positiva da secreção de ácido araquidônico	0.015636
Transporte de L-serina	0.015636
regulação do processo apoptótico de células epiteliais	0.016938
formação de sulco de clivagem	0.018219
regulação negativa do processo apoptótico de células dendríticas	0.018219
desenvolvimento de almofada de gordura	0.018219
fusão da membrana do vírus com a membrana plasmática do hospedeiro	0.018219
fusão de membrana envolvida na entrada viral na célula hospedeira	0.018219
fusão de membrana multiorganismo	0.018219
regulação positiva da atividade GTPase	0.019875

Análise através do programa *WEB-based Gene set Analysis Toolkit (WebGestalt)*, com a categorização funcional com base nos termos do *Gene Ontology (GO)* onde foram consideradas enriquecidas as principais 50 categorias para cada termo do GO, baseado no valor de p ajustado para múltiplos testes (adjP <0,05).

Tabela 7 - Categorização funcional negativa dos genes pelo tratamento com LQB-461 em ambas as concentrações de 3 e 5 μ M

Descrição	Valor de P
processamento ncRNA	0.000028172
processo metabólico do ncRNA	0.00012487

Processamento de RNA	0.00084667
Direcionamento de proteína	0.0011493
Direcionamento de proteína cotraducional dependente de SRP para a membrana	0.0011648
proteína cotraducional direcionada à membrana	0.0012641
Direcionamento de proteína para ER	0.0014744
estabelecimento da localização da proteína no retículo endoplasmático	0.0015854
processo catabólico de mRNA transcrito nuclear, decadência mediada por nonsense	0.0018494
localização de proteínas no retículo endoplasmático	0.0024014
estabelecimento da localização da proteína para organela	0.0024524
regulação positiva do desenvolvimento do mesoderma	0.0027421
regulação da via de sinalização nodal envolvida na determinação da assimetria esquerda / direita	0.0027421
regulação da via de sinalização nodal envolvida na determinação da assimetria esquerda / direita do mesoderma lateral	0.0027421
fosforilação de proteína SMAD de parceiro comum	0.0032897
processo metabólico do composto de selênio	0.0032897
processo catabólico composto aromático	0.0035555
regulação positiva do potencial pós-sináptico inibitório	0.0038370
modulação do potencial pós-sináptico inibitório	0.0038370
via de sinalização nodal envolvida na determinação da assimetria esquerda / direita	0.0038370
regulação da transcrição do promotor da RNA polimerase II envolvido na determinação da simetria esquerda / direita	0.0038370
via de sinalização nodal envolvida na determinação da assimetria esquerda / direita do mesoderma lateral	0.0038370
processo catabólico de composto orgânico cíclico	0.0041141
regulação positiva da via de sinalização do receptor de ativina	0.0043841
regulação da via de sinalização nodal	0.0043841
determinação da assimetria esquerda / direita na mesoderme lateral	0.0043841
proteína direcionada para a membrana	0.0044194

iniciação traducional	0.0045588
morfogênese embrionária do intestino anterior	0.0049309
morfogênese da mesoderme paraxial	0.0049309
processamento de rRNA	0.0050875
processo catabólico de mRNA transcrito nuclear	0.0052865
processo catabólico xenobiótico	0.0054774
morfogênese anterior	0.0054774
especificação do eixo dorsal / ventral	0.0054774
processamento primário de miRNA	0.0054774
processo metabólico de rRNA	0.0069489
processo metabólico do ácido alfa-linolênico	0.0071155
Montagem do complexo de proteína SMAD	0.0071155
processo catabólico hormonal	0.0076609
regulação negativa da expressão gênica	0.0098597

Análise através do programa *WEB-based Gene set Analysis Toolkit (WebGestalt)*, com a categorização funcional com base nos termos do *Gene Ontology (GO)* onde foram consideradas enriquecidas as principais 50 categorias para cada termo do GO, baseado no valor de p ajustado para múltiplos testes (adjP <0,05).

Com os resultados apresentados na Tabela 6 observamos que em ambas as concentrações de LQB-461 houve modulação positiva ($p < 0,05$) de 41 processos biológicos em relação ao controle. Da mesma forma, podemos constatar na Tabela 7 que 41 processos biológicos foram modulados negativamente ($p < 0,05$) por ambas as concentrações testadas do LQB-461 em células Jurkat.

Na análise realizada com o programa *WebGestalt*, podemos observar que o LQB-461 promoveu, em ambas as concentrações, aumento significativo da indução de processos apoptóticos ou a estes relacionados. Na Tabela 1, onde temos a ação do LQB-461 na concentração de 3 μ M, encontramos o aumento da produção de citocinas da superfamília do fator de necrose tumoral e resposta ao interferon-alfa, ambos os processos relacionados à indução de apoptose (Miura *et al.*, 2015; Jarry *et al.*, 2017; Sobrido-Cameán *et al.*, 2018). Além desses processos, também encontramos ativado ($p < 0,05$) o processo apoptótico de células epiteliais, indicando a importância desse tipo de morte no mecanismo de ação do LQB-461.

Na Tabela 3, que apresenta os processos biológicos que aumentaram significativamente na concentração de 5 μM , encontramos os processos metabólicos relacionados a espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, e vias ERK1 e ERK2.

Quando analisamos os dados da Tabela 6, que apresenta a análise de enriquecimento realizado com os dados selecionados dos genes regulados positivamente em ambas as concentrações (3 e 5 μM) do LQB-461, também encontramos um grande número de processos alterados significativamente relacionados à apoptose ($p < 0,05$).

Diversos processos biológicos relacionados à proliferação também foram sinalizados na análise de enriquecimento, realizada com os dados obtidos do ensaio de microarranjo, com resultados estatisticamente significativos. Dentre os processos modulados negativamente destacamos, na concentração de 3 μM (Tabela 2), a iniciação traducional ($p < 0,001$), localização da proteína no retículo endoplasmático ($p < 0,001$), direcionamento de proteína ($p < 0,001$), estabelecimento da localização da proteína na membrana ($p < 0,001$), tradução citoplasmática ($p < 0,001$) e alongamento traducional ($p < 0,05$). Isto indica a inibição global de tradução proteica na condição estudada.

Os mesmos processos biológicos, com exceção do alongamento traducional, na concentração de 5 μM (Tabela 4) foram inibidos, como iniciação traducional ($p < 0,01$), localização de proteínas no retículo endoplasmático ($p < 0,01$), direcionamento de proteína ($p < 0,05$), tradução citoplasmática ($p < 0,05$) e estabelecimento da localização da proteína na membrana ($p < 0,05$).

Na Tabela 7, onde temos a categorização funcional negativa pelo LQB-461 em ambas as concentrações de 3 e 5 μM , também encontramos diminuição de diversos processos relacionados a proteínas, como o direcionamento de proteína ($p < 0,01$), estabelecimento da localização da proteína no retículo endoplasmático ($p < 0,01$), localização de proteínas no retículo endoplasmático ($p < 0,01$), estabelecimento da localização da proteína para organela ($p < 0,01$) e iniciação traducional ($p < 0,01$).

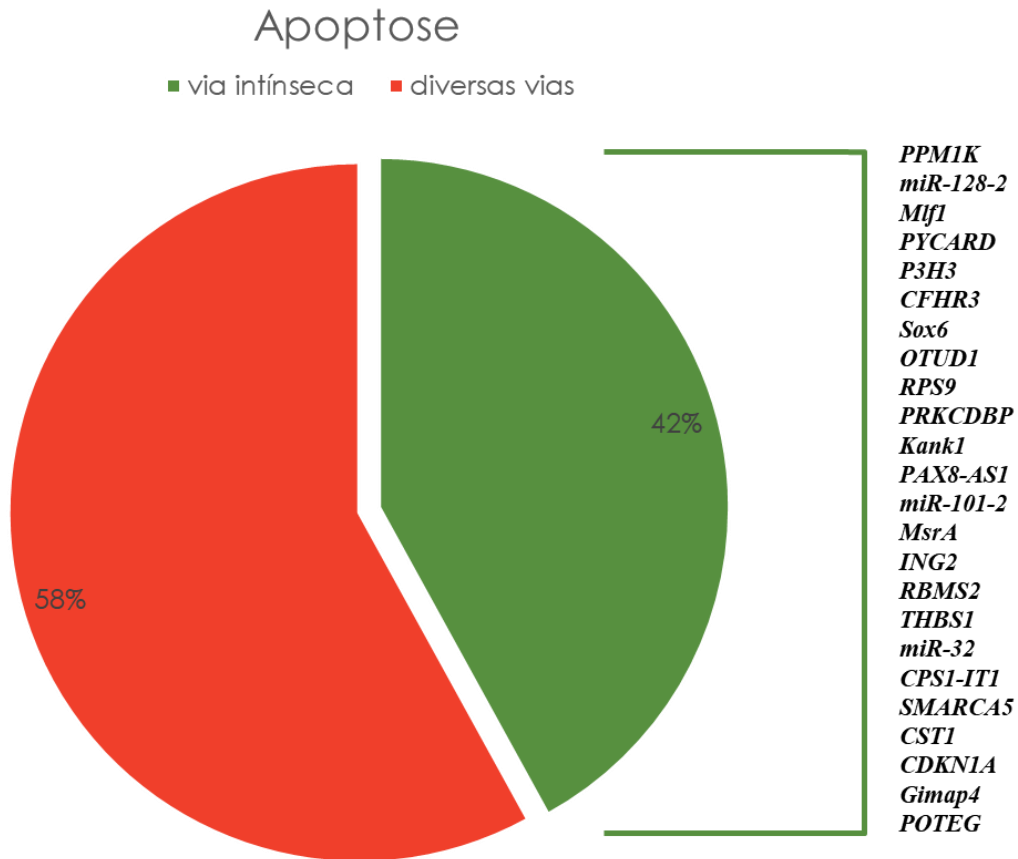
Além destes resultados, vale destacar, nesta análise de enriquecimento do ensaio de microarranjo, que observamos um aumento do processo de organização para projeção de membrana ($p < 0,05$) após tratamento na concentração de 3 μM do LQB-461 em células Jurkat (Tabela 2). Esse processo biológico está relacionado ao mecanismo autofágico e sinaliza uma possível função importante da autofagia nos efeitos observados em células Jurkat com essa concentração do LQB-461.

4.2 **Análise individual dos genes diferencialmente expressos pela técnica de microarranjo de DNA**

Na análise de enriquecimento, encontramos diversos processos biológicos modulados de forma significativa ($p < 0,05$) que sinalizam o mecanismo de ação do LQB-461 sobre as vias de proliferação/síntese de proteínas e vias indutoras de morte celular. Além da análise de enriquecimento, foi realizada uma análise individual na literatura dos 1010 genes, com aumento ou diminuição de expressão igual ou superior a 30% em relação ao controle, após tratamento com LQB-461 em células Jurkat. O estudo desses genes individualmente foi descrito na metodologia (item 4.10), e teve como parâmetro decisivo de investigação os efeitos moduladores encontrados na análise de enriquecimento, além dos efeitos de inibição da na proliferação e indução de morte, anteriormente descritos para o LQB-461.

Considerando os genes envolvidos com a apoptose, encontramos o número total de 57 genes comuns a diversas vias que promovem o mecanismo de morte celular programada, dos quais 24 estão relacionados à via intrínseca, representando 42% dos genes e predominância majoritária dos genes relacionados com esse tipo de morte. Na Figura 11 podemos observar a representação gráfica desta porcentagem, destacando os genes envolvidos na via intrínseca de apoptose.

Figura 11 - Representação gráfica da porcentagem dos genes envolvidos na morte celular por apoptose



Legenda: Essa porcentagem foi calculada em relação ao total de genes descritos após análise individual dos genes alterados no ensaio de microarranjo. Temos em destaque a via intrínseca de apoptose, majoritariamente modulada. Também podemos encontrar representada a lista de genes alterados relacionados à via intrínseca de apoptose.

Fonte: dados foram analisados e o gráfico foi construído através do programa Excel e Power point.

Com base em estudo da literatura e nos resultados da análise de enriquecimento de dados, foi construído um esquema mostrado na Figura 12. Neste esquema observa-se a função de diversos genes da via intrínseca de apoptose, sendo modulados pelo LQB-461 nas concentrações de 3 μ M (Fig. 12A) e 5 μ M (Fig. 12B). As setas verdes indicam indução da expressão gênica, enquanto as linhas com barra, em cor vermelha, indicam inibição.

Figura 12 – (Continua) – Esquematização dos genes envolvidos na via intrínseca de apoptose encontrados alterados, pelo ensaio de microarranjo, nos tratamentos das células Jurkat pelo LQB-461

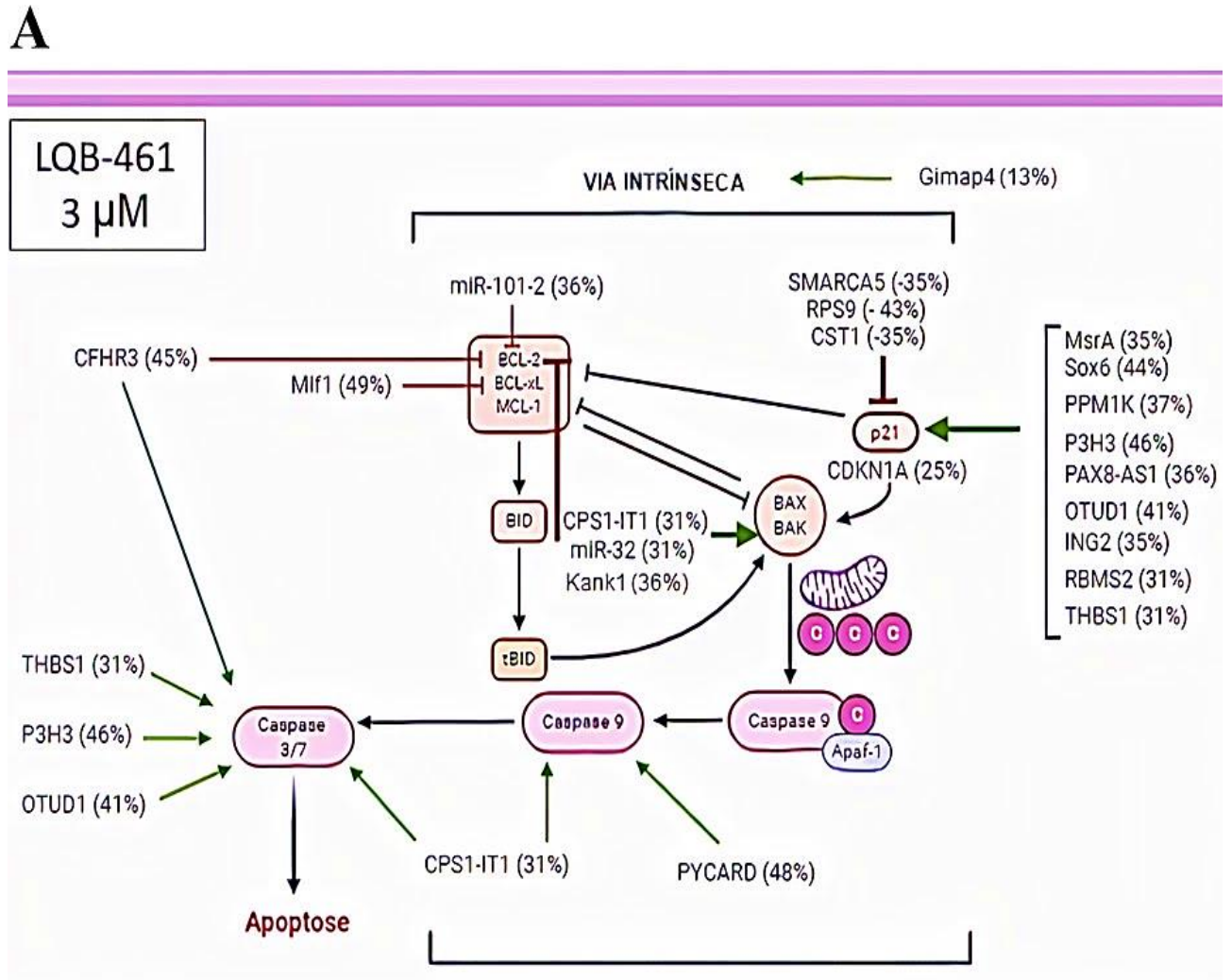
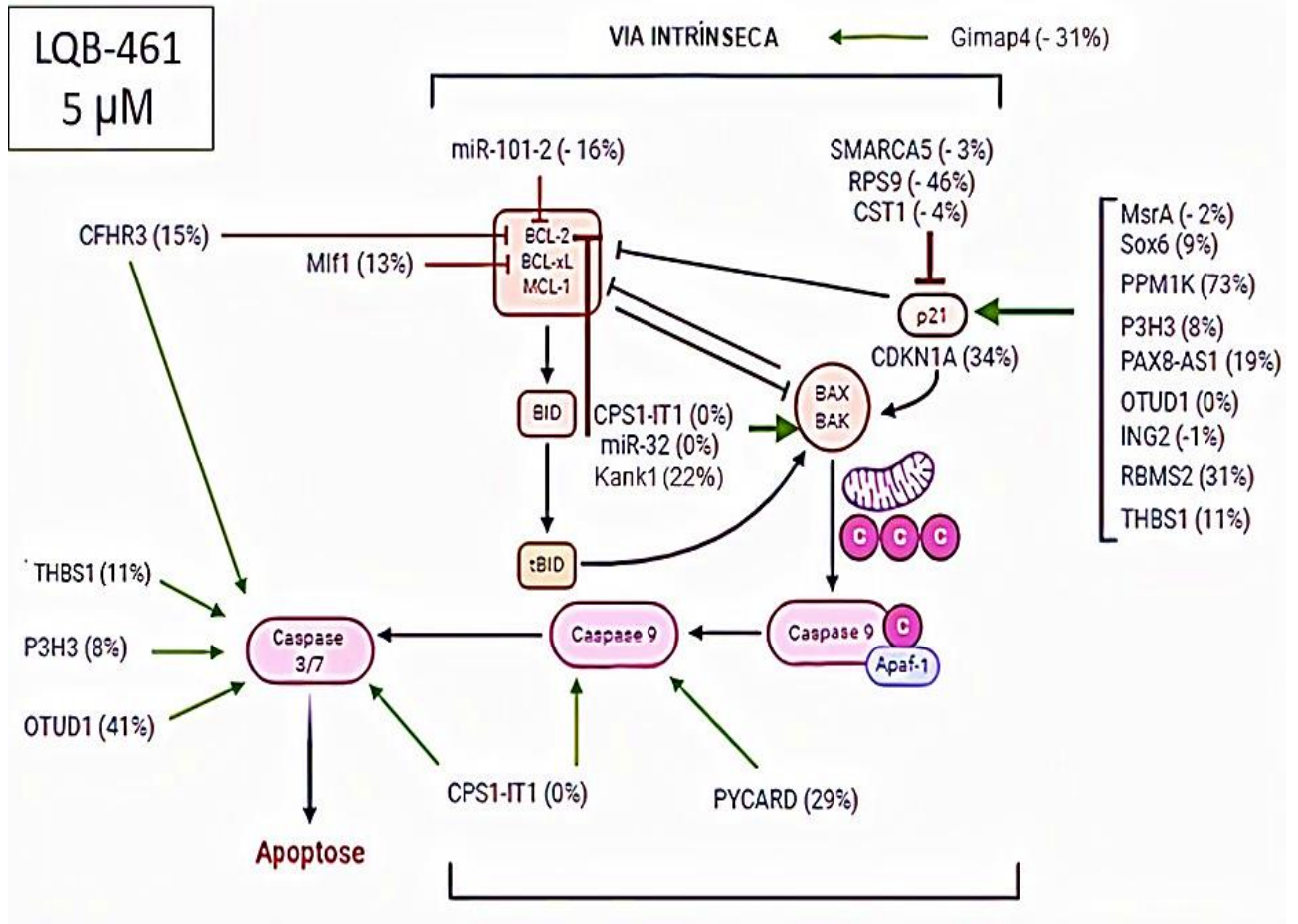


Figura 12 – (conclusão) – Esquematização dos genes envolvidos na via intrínseca de apoptose encontrados alterados, pelo ensaio de microarranjo, nos tratamentos das células Jurkat pelo LQB-461

B



Legenda: A) 3 µM; B) 5 µM. A expressão gênica foi avaliada por análise de microarranjo DNA. Os dados representam os resultados de um pool de três experimentos, seguido de análise de enriquecimento de dados, e pesquisa na plataforma PUBMED.

Fonte: A Figura foi construída pelo autor através do programa *Biorender*. As setas verdes indicam indução da expressão gênica, enquanto as linhas com barra, em cor vermelha, indicam inibição da expressão gênica.

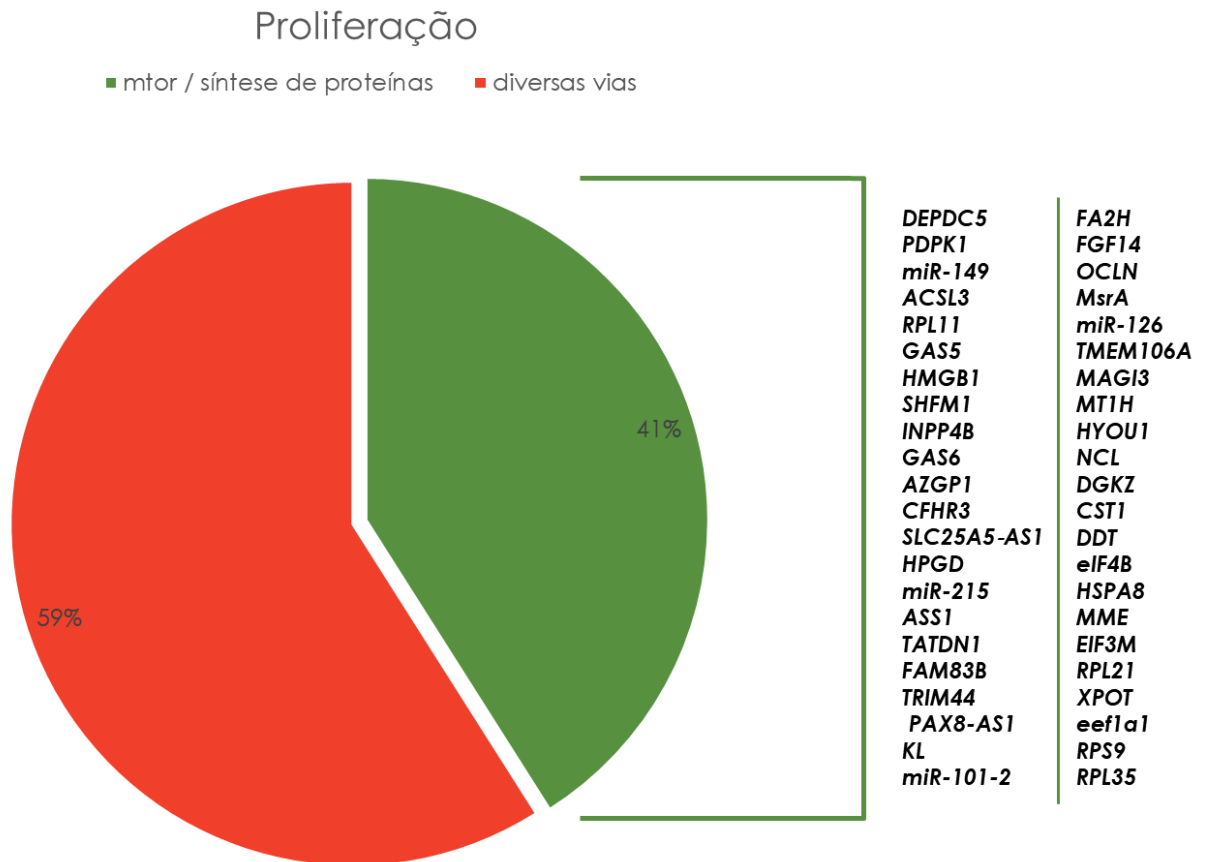
Na Figura 12A observamos que o tratamento com o LQB-461 na concentração de 3 μ aumentou a expressão de diversos genes indutores de p21 e reduziu a expressão de diferentes genes inibidores desta proteína, em relação ao controle, contribuindo para um aumento da sua expressão.

A maioria dos genes descritos na Figura 12A mostra o mesmo perfil de resposta após tratamento com a concentração de 5 μ M do LQB-461 (Figura 12B). Também podemos observar que o ensaio de microarranjo sinalizou, na concentração de 3 μ M (12A), regulação positiva de diversos genes ativadores da expressão de Bax e inibidores da expressão de Bcl-2. O mesmo foi observado após o tratamento na concentração de 5 μ M (Figura 12B). Ainda na Figura 12 podemos ver que o LQB-461 promoveu aumento de expressão de genes indutores de caspase-9 e caspase-3.

Continuando a análise individual dos resultados, obtidos da análise de expressão global, foram identificados 108 genes relacionados com diferentes vias reguladoras da proliferação, dos quais 44 estão relacionados com a via do mTOR e síntese de proteínas, representando aproximadamente 41% desta seleção e a via majoritariamente modulada.

A representação gráfica desta porcentagem pode ser observada na Figura 13, onde também podemos encontrar em destaque a lista de genes envolvidos na via do mTOR e síntese de proteínas.

Figura 13 - Representação gráfica da porcentagem dos genes envolvidos na proliferação celular



Legenda: Essa porcentagem foi calculada em relação ao total de genes descritos após análise individual dos genes alterados no ensaio de microarranjo. Temos em destaque a via majoritariamente modulada, a via do mTOR e síntese de proteínas. Também podemos encontrar representada a lista de genes encontrados alterados, relacionados a esta via.

Fonte: Os dados foram analisados e o gráfico foi construído através do programa Excel e Power point.

Através da análise bibliográfica, onde encontramos descritas as funções biológicas destes 44 genes relacionados com a via do mTOR e síntese de proteínas, foi construído um esquema onde observa-se as modulações dos genes da via PI3K/ AKT/ mTOR na concentração de 3 μ M (Figura 14A) e de 5 μ M (Figura 14B), em que as setas verdes indicam ativação da expressão gênica, enquanto as linhas com barra, de cor vermelha, indicam a inibição da expressão gênica.

Figura 14 – (continua) – Esquemática dos genes da via do PI3k/AKT/mTOR e síntese de proteínas encontrados alterados no ensaio de microarranjo após tratamento de células Jurkat com o LQB-461

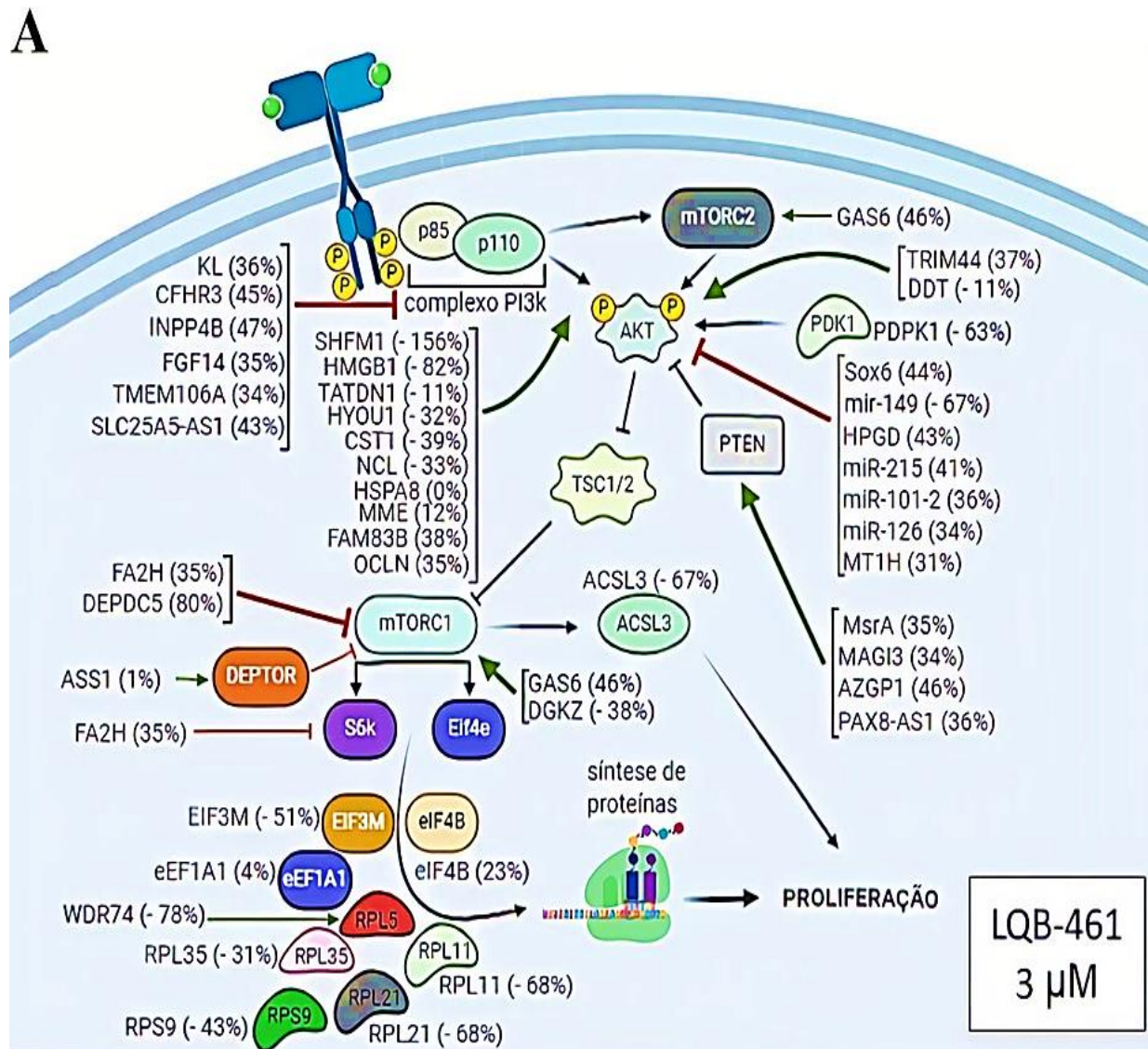
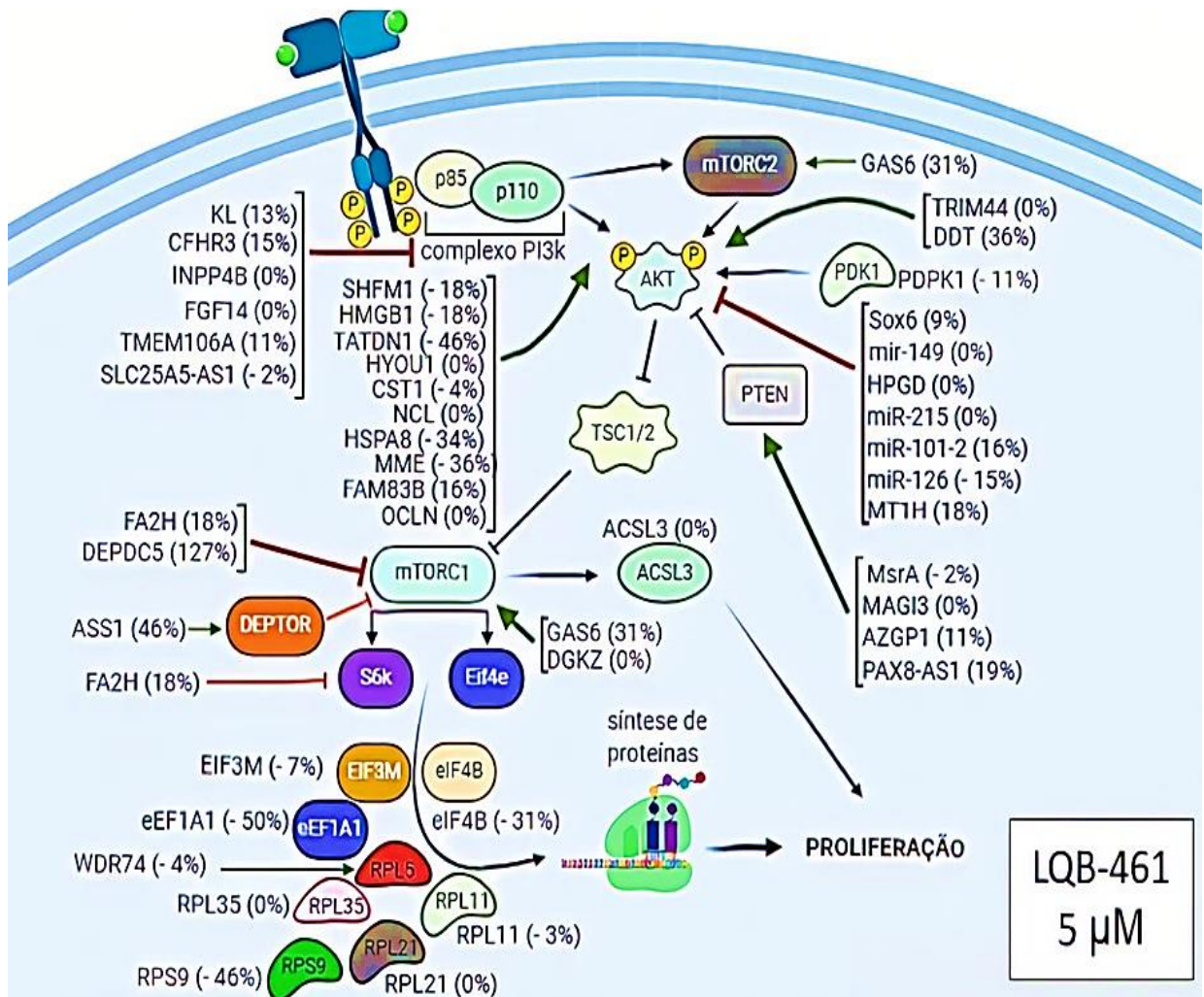


Figura 14 – (conclusão) – Esquemática dos genes da via do PI3k/AKT/mTOR e síntese de proteínas encontrados alterados no ensaio de microarranjo após tratamento de células Jurkat com o LQB-461

B



Legenda: A. 3 µM, B. 5 µM. As células (1×10^5 /mL) foram incubadas na presença ou ausência (controle) de diferentes concentrações de LQB-461 por 72 h a 37°C. A expressão gênica foi avaliada por análise de microarranjo DNA. Os dados representam os resultados de um pool de três experimentos independentes. Foi realizada, utilizando a plataforma PUBMED, a análise individual, na literatura, dos 1010 genes com aumento ou diminuição de expressão igual ou superior a 30%, em relação ao controle, em pelo menos uma das concentrações testadas do LQB. As setas verdes indicam indução da expressão gênica, enquanto as linhas com barra, de cor vermelha, indicam inibição da expressão gênica.

Fonte: A Figura foi construída pelo autor, utilizando o programa *Biorender*.

Podemos observar na Figura 14A, após tratamento de 3 µM com o LQB-461, diversos genes da via PI3K/ AKT/ mTOR desregulados (positivamente ou negativamente), quando comparados ao controle. Também encontramos diversos genes importantes para o processo de

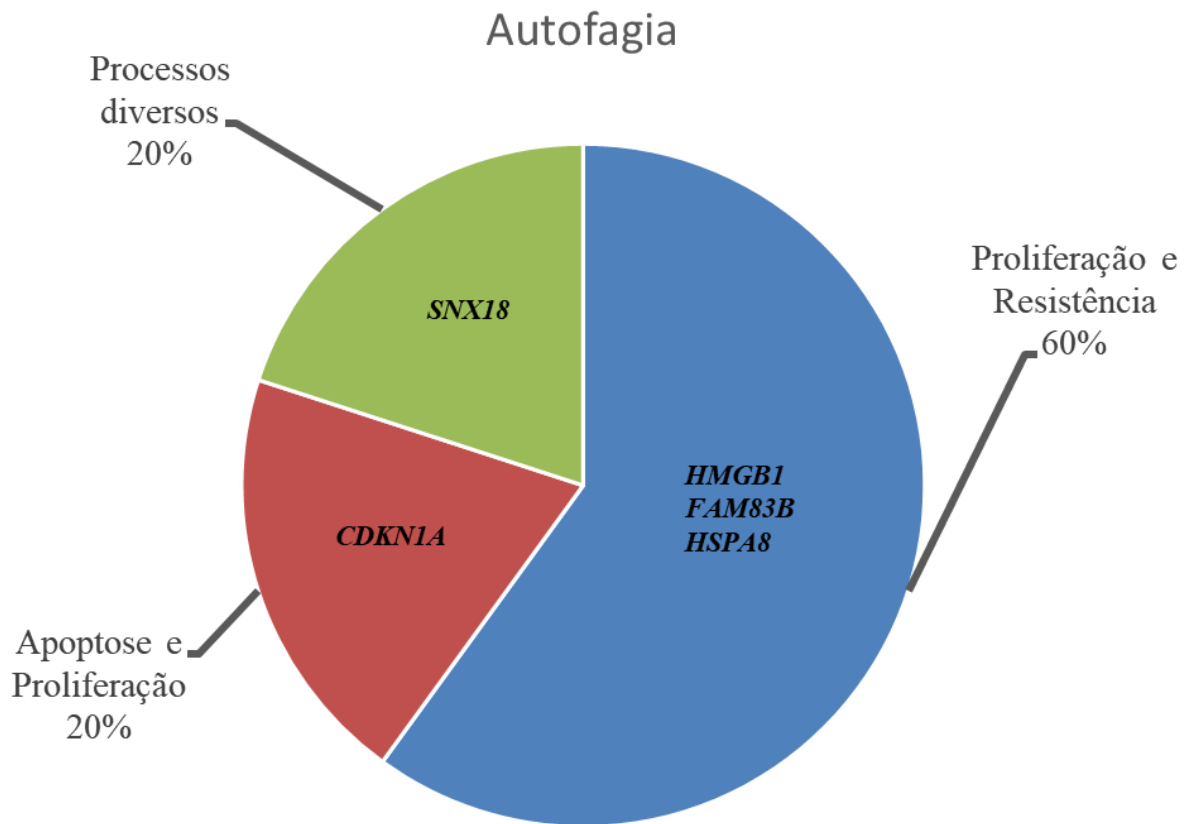
tradução de proteínas com a expressão diminuída. Na análise dos genes modulados após o tratamento com o LQB-461 a 5 μM (Figura 14B), encontramos em geral o mesmo perfil de modulação que o tratamento de 3 μM .

Diversos trabalhos descrevem medicamentos quimioterápicos induzindo a autofagia, embora esta se encontre associada, principalmente, à uma resposta citoprotetora, promovendo resistência a ação farmacológica. Há também casos de indução de morte celular, assim como supressão tumoral, através desse processo (Fulda, 2017, Antunes *et al.*, 2018).

Desta forma, com base nos efeitos descritos da ação do LQB-461 em células Jurkat (Thimóteo, 2017), na análise literária feita anteriormente na plataforma do PUBMED, também foram selecionados genes relacionados com a modulação do processo autofágico.

É interessante destacar que, dos genes descritos relacionados à autofagia, 3 estão relacionados com a modulação da proliferação e mecanismos de resistência tumoral, 1 relacionado com a apoptose. Na Figura 15 podemos observar uma representação gráfica destes genes, indicando sua relação com outros possíveis mecanismos de ação do LQB-461 em células Jurkat. A porcentagem foi calculada considerando o total de genes descritos e os seus possíveis mecanismos de ação.

Figura 15 - Representação gráfica percentual dos genes moduladores da autofagia envolvidos com outros possíveis mecanismos de ação do LQB-461 em células Jurkat



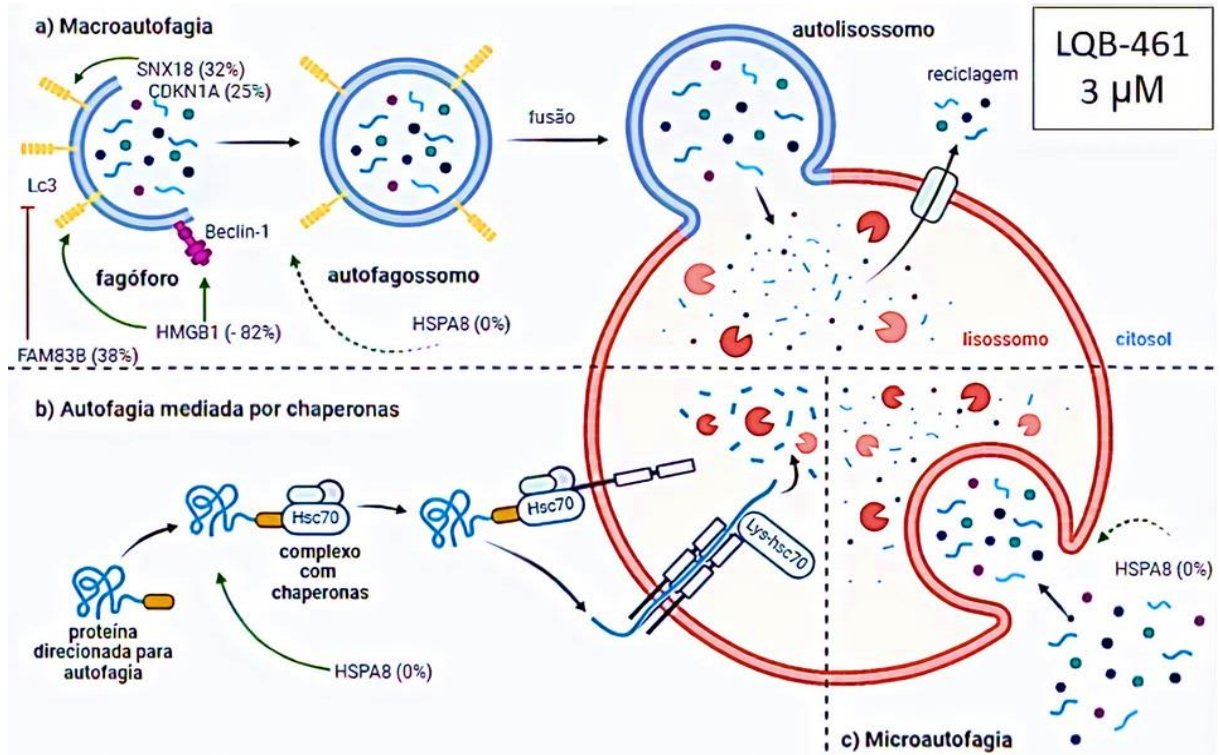
Legenda: Essa porcentagem foi calculada em relação ao total de genes descritos após análise individual dos genes alterados no ensaio de microarranjo.

Fonte: Os dados foram analisados e o gráfico foi construído através do programa Excel e Power point.

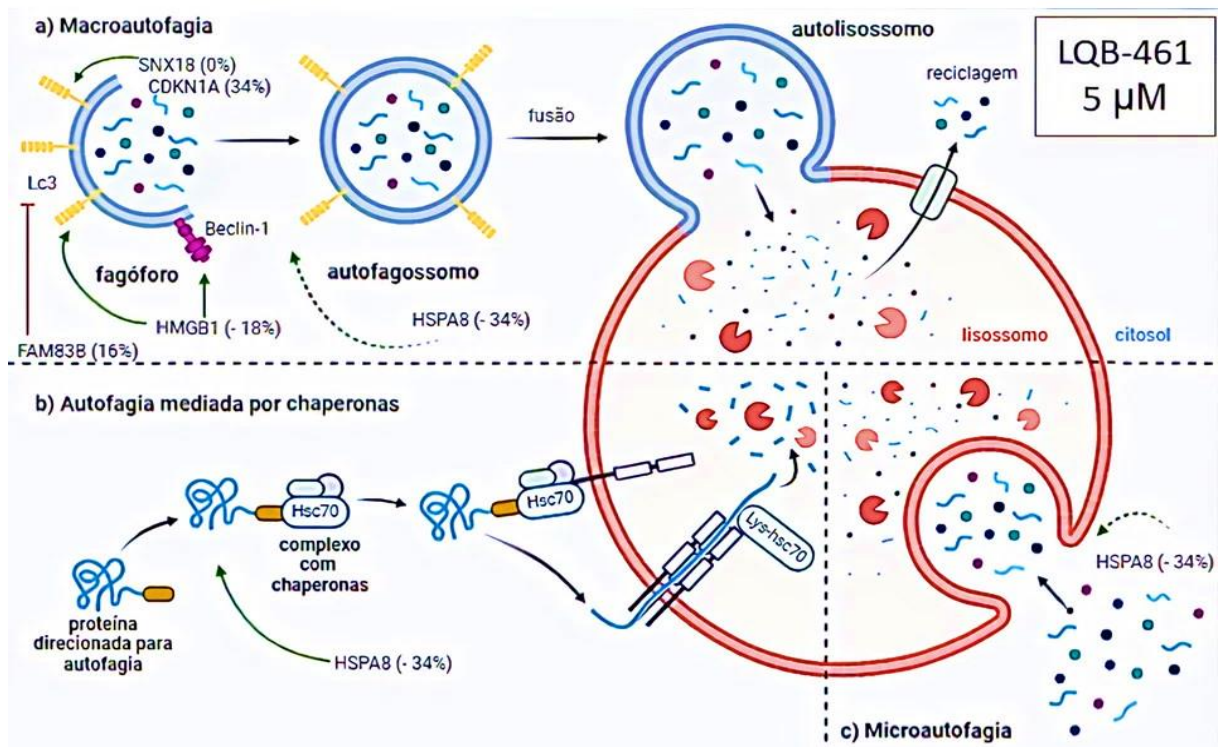
Através da análise bibliográfica, na qual encontra-se descrita a função biológica destes 5 genes relacionados à autofagia, foi construído um esquema, mostrado na Figura 16. Na Figura 16A, podemos ver as modulações dos genes na concentração de 3 μ M, e na Figura 16B, os resultados após o tratamento a 5 μ M, sendo que as setas verdes indicam promoção da expressão gênica, enquanto as linhas com barra, de cor vermelha, indicam a inibição da expressão.

Figura 16 – Esquematização dos genes da autofagia alterados no ensaio de microarranjo após tratamento de células Jurkat com LQB-461

A



B



Legenda: A. 3 μM, B. 5 μM. As células (1×10^5 /mL) foram incubadas na presença ou ausência (controle) de diferentes concentrações de LQB-461 por 72 h a 37°C e 5% de CO₂. A expressão gênica foi avaliada

por análise de microarranjo DNA. Os dados representam os resultados de um pool de três experimentos. A análise individual na literatura, dos 1010 genes com aumento ou diminuição de expressão igual ou superior a 30%, em relação ao controle, em pelo menos uma das concentrações testadas do LQB, foi realizada utilizando-se a plataforma PUBMED. Em a) macroautofagia, b) autofagia mediada por chaperonas e c) microautofagia. As setas verdes indicam promoção da expressão gênica, enquanto as linhas com barra, de cor vermelha, indicam a inibição da expressão gênica.

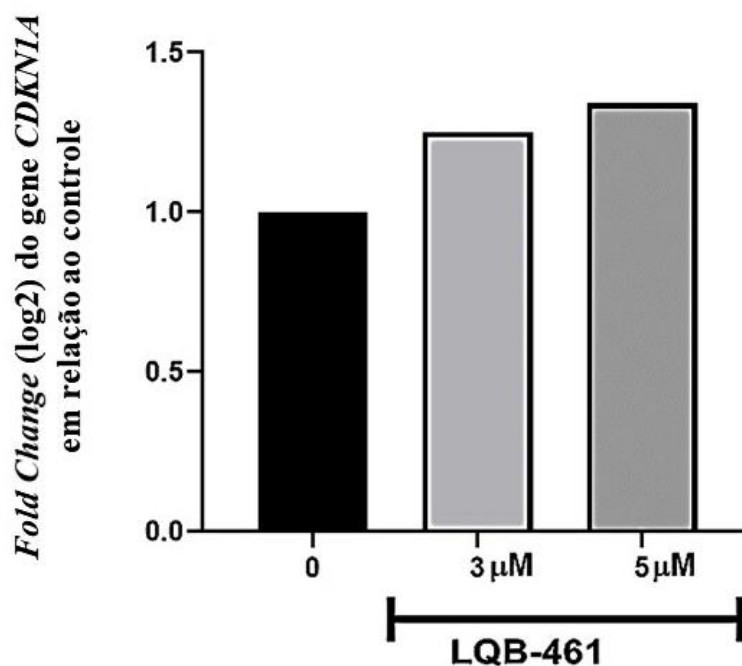
Fonte: A Figura foi construída pelo programa *Biorender*.

A Figura 16 mostra o aumento/ diminuição da expressão de genes relacionados à diversos mecanismos autofágicos, como macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas, sendo esse efeito observado em células Jurkat tratadas com ambas as concentrações testadas de LQB-461.

4.3 Efeito do LQB-461 na expressão de *CDKN1A*

O gene *CDKN1A* codifica a proteína p21, descrita na literatura como relacionada à atividade antiproliferativa e indutora de morte por apoptose em células tumorais (Kreis e Yuan, 2019; Shamloo e Usluer, 2019). Em resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa foi demonstrado, por citometria de fluxo, que o LQB-461 promoveu aumento significativo da proteína p21, em todas as concentrações testadas (2 μ M, 3 μ M e 5 μ M) em células Jurkat. Nos resultados obtidos no ensaio de microarranjo, a expressão do gene *CDKN1A* também mostrou alterações, em relação ao controle, após tratamento *in vitro* das mesmas células com o LQB-461. Foram observados aumentos de 25% e 34%, na expressão do gene *CDKN1A*, em relação ao controle, nas concentrações de 3 μ M e 5 μ M do LQB-461, respectivamente, como mostra a Figura 17. Estas porcentagens foram baseadas em alterações nos valores de *Fold change* das culturas tratadas com LQB-461, em relação à cultura controle.

Figura 17 – Expressão do gene *CDKN1A* em células Jurkat tratadas com diferentes concentrações de LQB-461, por análise de microarranjo de DNA



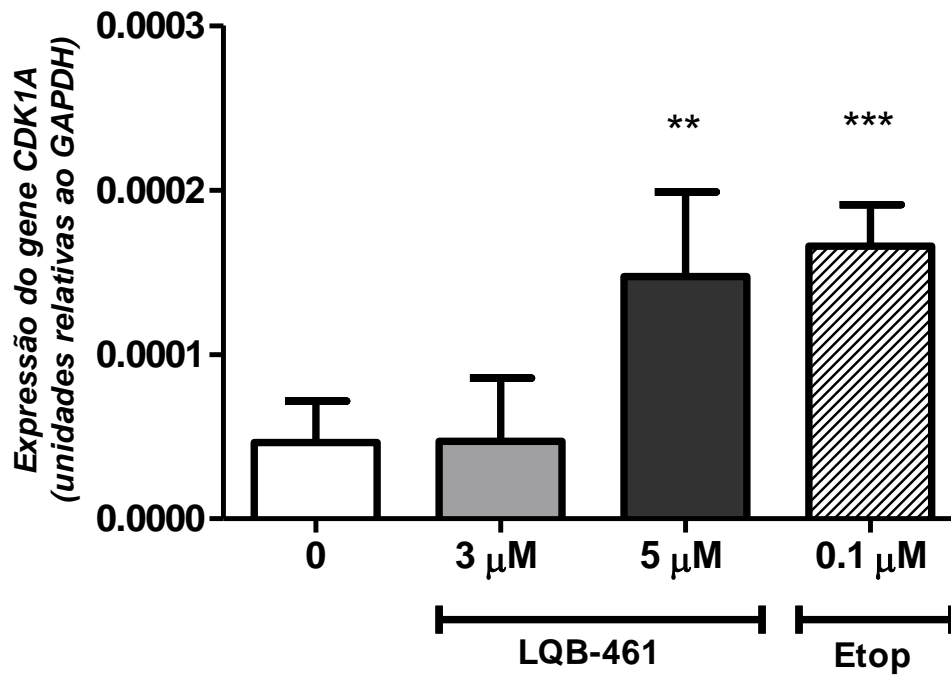
Legenda: As células (1×10^5 /mL) foram incubadas na presença ou ausência (controle) de diferentes concentrações de LQB-461 por 72 h a 37°C em estufa de CO₂. A expressão gênica foi avaliada. O cálculo de *Fold-Change* (log₂) foi realizado através da razão das médias dos valores obtidos do controle e do tratado. Os dados representam os resultados de um pool de três experimentos.

Fonte: Os dados foram analisados e o gráfico foi construído através dos programas Excel e GraphPad Prism 5.0.

4.3.1 Validação do gene *CDKN1A* após tratamento de células Jurkat com o LQB-461

Visto a importância que a expressão do p21 tem demonstrado na ação do LQB-461 e a fim de validar os resultados obtidos no microarranjo, foi realizada a análise, por PCRq, do gene *CDKN1A* em células Jurkat, após tratamento com o LQB nas mesmas condições experimentais do microarranjo. Na Figura 18 podemos observar os resultados obtidos, onde o LQB-461 na concentração de 5 μM e o controle positivo etoposídeo (0,1 μM) mostraram um aumento significativo de 218% ($p < 0,01$) e 258% ($p < 0,001$), respectivamente, em relação ao controle, na expressão do gene *CDKN1A*.

Figura 18 – Expressão do gene *CDKN1A* em células Jurkat tratadas com diferentes concentrações de LQB-461, por PCRq



Legenda: As células (1×10^5 /mL) foram incubadas na presença ou ausência (controle) de diferentes concentrações de LQB-461 por 72 h a 37°C em estufa de CO_2 . O etoposídeo $0,1 \mu\text{M}$ (Etop) foi usado nos experimentos como controle positivo. O RNA total foi extraído e o RT-PCR realizado para o gene específico. A diferença entre as médias do gene de interesse e o gene de referência, *GAPDH*, foi calculada pelo programa Microsoft Excel 2010 e o valor de quantificação relativa foi expresso como $2^{-\Delta\text{C}_q}$. Os gráficos representam a média \pm desvio padrão (SD) de três experimentos independentes. A estatística apresentada é referente a comparação dos tratados com o controle. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

Fonte: Os dados foram analisados e o gráfico foi construído através dos programas Excel e GraphPad Prism 5.0, respectivamente.

4.4 Validações da ação do LQB-461 na via intrínseca de apoptose através de membros da família BCL-2

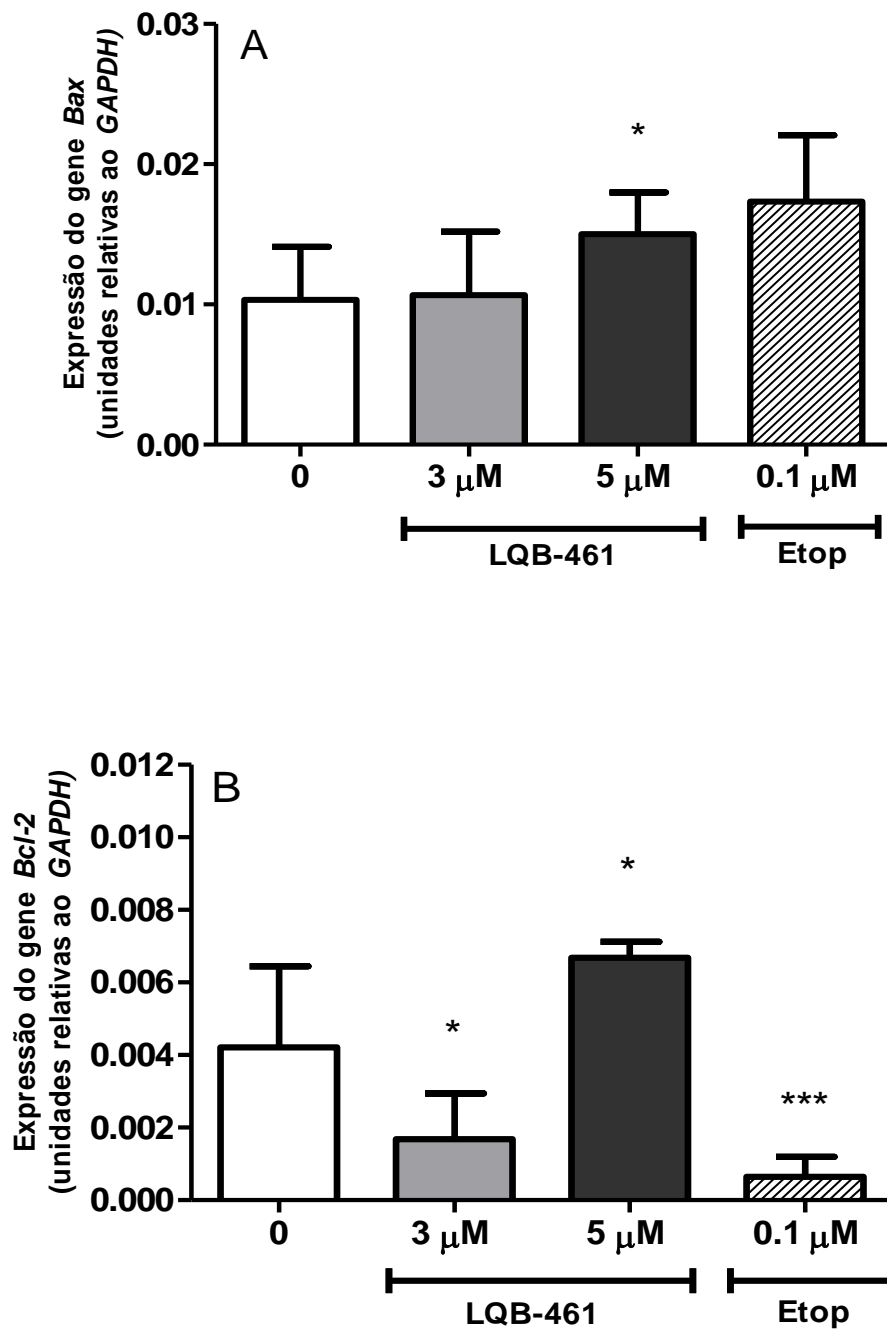
Como discutido anteriormente, a via intrínseca de apoptose é regulada por membros da família Bcl-2, entre os quais podemos destacar as proteínas Bax e Bcl-2, duas importantes proteínas com funções pró e anti-apoptóticas, respectivamente (Nagata, 2018; Xu *et al.*, 2019; D'Arcy, 2019).

Os resultados obtidos pelo microarranjo após tratamento de células Jurkat com o LQB-461 mostraram alterações em diversos genes relacionados à modulação destas proteínas, como pode ser visualizado na Figura 12. Desta forma, foi realizado um ensaio de RT-PCR padrão ouro, investigando a expressão gênica de *Bax* e *Bcl-2*, em células Jurkat tratadas nas mesmas condições do microarranjo.

A Figura 19A mostra que o tratamento com 3 μ M do LQB-461 não alterou a expressão de *Bax*, quando comparada ao controle. No entanto, na concentração de 5 μ M houve um aumento de 45% ($p < 0,05$) na expressão de *Bax*, em relação ao controle. O quimioterápico etoposídeo não aumentou a expressão de *Bax*, em relação ao controle.

Em relação a expressão gênica de *Bcl-2* (Figura 19B), os resultados de PCRq mostraram-se significativos ($p < 0,05$), em relação ao controle, em ambas as concentrações testadas do LQB-461, com diminuição de 60% na concentração de 3 μ M e aumento de 58% na concentração de 5 μ M. O quimioterápico etoposídeo diminuiu 85% ($p < 0,001$) da expressão do gene *Bcl-2*, em relação ao controle.

Figura 19 – Expressão gênica de *Bax* e *Bcl-2* em células Jurkat tratadas com LQB-461, por PCRq



Legenda: As células (1×10^5 /mL) foram incubadas na presença ou ausência (controle negativo) de diferentes concentrações de LQB-461 por 72 h a 37°C em estufa de CO₂. O composto etoposídeo 0,1 μ M (Etop) foi usado como controle positivo. O RNA total foi extraído e o RT-PCR realizado para o gene específico. A diferença entre as médias do gene de interesse e o gene de referência, *GAPDH*, foi calculada pelo programa Microsoft Excel 2010 e o valor de quantificação relativa foi expresso como $2^{-\Delta Cq}$. Os gráficos representam a média \pm desvio padrão (SD) de três experimentos independentes. A estatística apresentada é referente a comparação dos tratados com o controle. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ comparado ao controle (One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

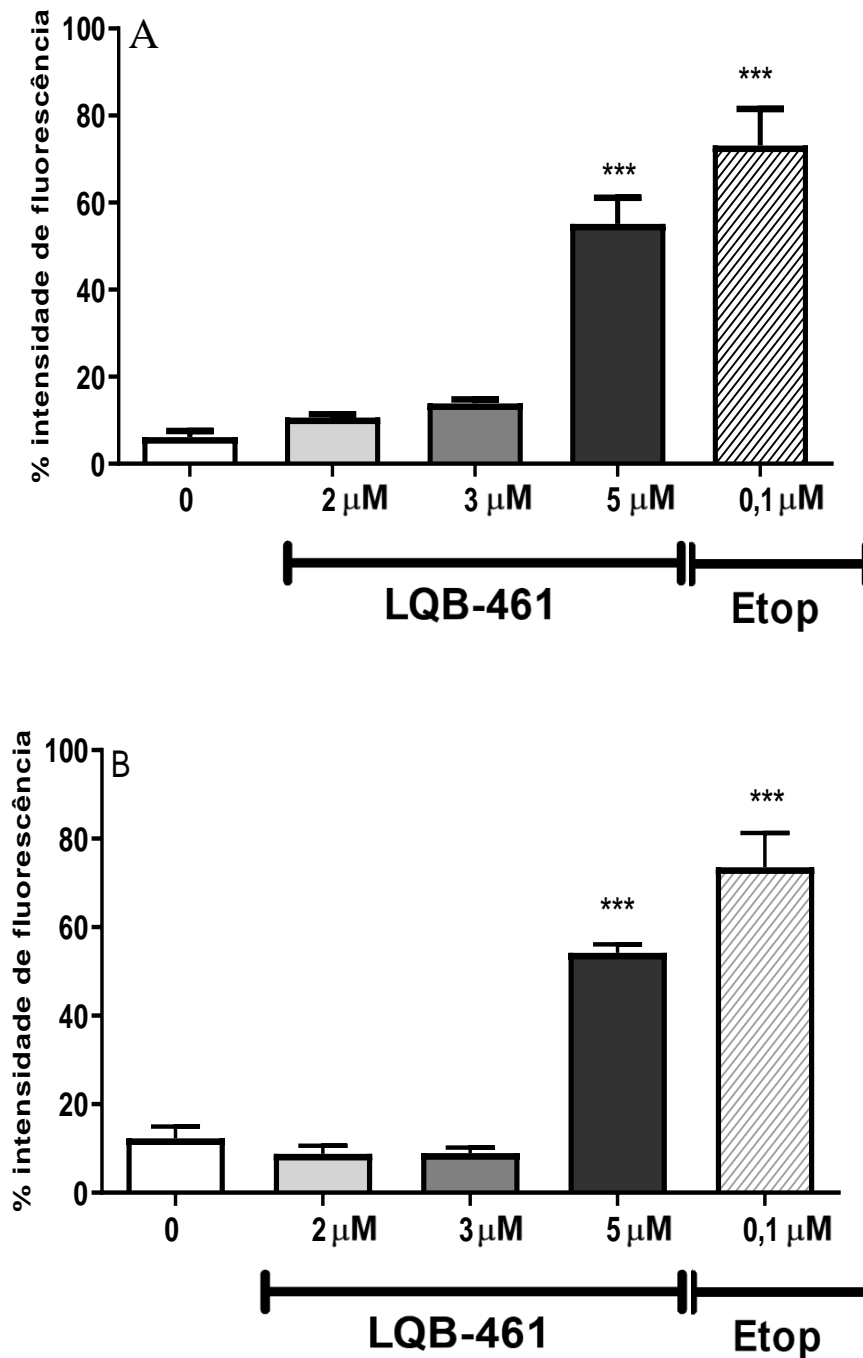
Fonte: Os dados foram analisados e o gráfico foi construído através dos programas Excel e GraphPad Prism 5.0.

A expressão das proteínas Bax e Bcl-2 também foi determinada após o tratamento com o LQB-461 em células Jurkat. Os resultados da expressão de tais proteínas intracelulares, por citometria de fluxo, podem ser observados na Figura 20.

Na Figura 20A, os tratamentos das células com as menores concentrações testadas do LQB-461 não mostraram aumento significativo de Bax, em relação ao controle. Contudo, a concentração de 5 μM induziu aumento de 55,1% ($p < 0,001$) na expressão de Bax, em relação ao controle. O quimioterápico etoposídeo também promoveu aumento importante de 73,1% ($p < 0,001$) na expressão da proteína Bax, em relação ao controle.

Na Figura 20B podemos observar os resultados da expressão da proteína Bcl-2, por citometria de fluxo, os quais mostraram aumento importante ($p < 0,001$) de 4,4 vezes, em relação ao controle, na expressão desta proteína, na concentração de 5 μM . O quimioterápico etoposídeo (0,1 μM) mostrou aumento ($p < 0,001$) de aproximadamente 6 vezes, em relação ao controle.

Figura 20 – Expressão das proteínas Bax e Bcl-2 em células Jurkat tratadas com LQB-461, por citometria de fluxo

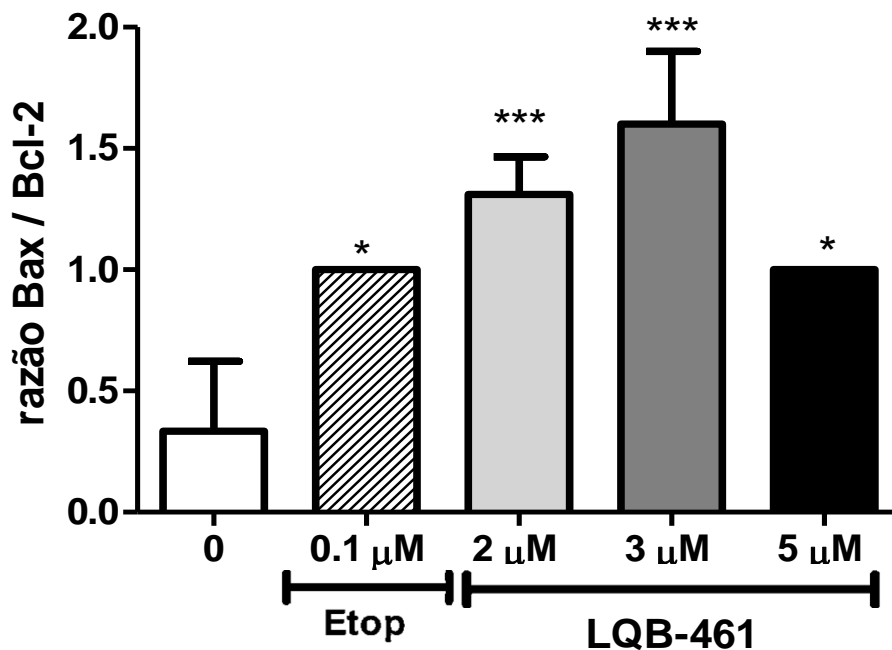


Legenda: (A) Bax e (B) Bcl-2. As células ($1 \times 10^5/\text{mL}$) foram incubadas na presença ou ausência (controle negativo) de diferentes concentrações de LQB-461 por 72 h a 37°C em estufa de CO_2 . O composto etoposídeo $0,1 \mu\text{M}$ (Etop) foi usado como controle positivo. Foram capturados 25.000 eventos em cada leitura, sem a utilização de regiões predeterminadas. A fluorescência de Bax e Bcl-2 foram detectadas pelo canal FL6. Os resultados estão expressos como porcentagem \pm desvio padrão (SD) da intensidade de fluorescência de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$, comparado ao controle (One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

Fonte: Os dados foram analisados e o gráfico foi construído através dos programas Summit v4.3 e GraphPad Prism 5.0.

A proteína Bcl-2 se liga à proteína Bax inibindo sua ação pró-apoptótica, e por esta razão foi determinada a razão entre os níveis de Bax e Bcl-2. Na Figura 21 podemos observar que o LQB-461 induziu aumentos significativos na razão Bax/Bcl-2 em todas as concentrações testadas. Esses aumentos, em relação ao controle, foram na proporção de 3,5 vezes (* $p < 0,05$) na concentração de 2 μM , de 4,7 vezes (** $p < 0,01$) na concentração de 3 μM e de 2,9 vezes (***) na concentração de 5 μM . O quimioterápico etoposídeo também mostrou aumento ($p < 0,05$) de 2,9 vezes, em relação ao controle.

Figura 21 – Relação da expressão das proteínas Bax e Bcl-2 em células Jurkat tratadas com LQB-461, por citometria de fluxo



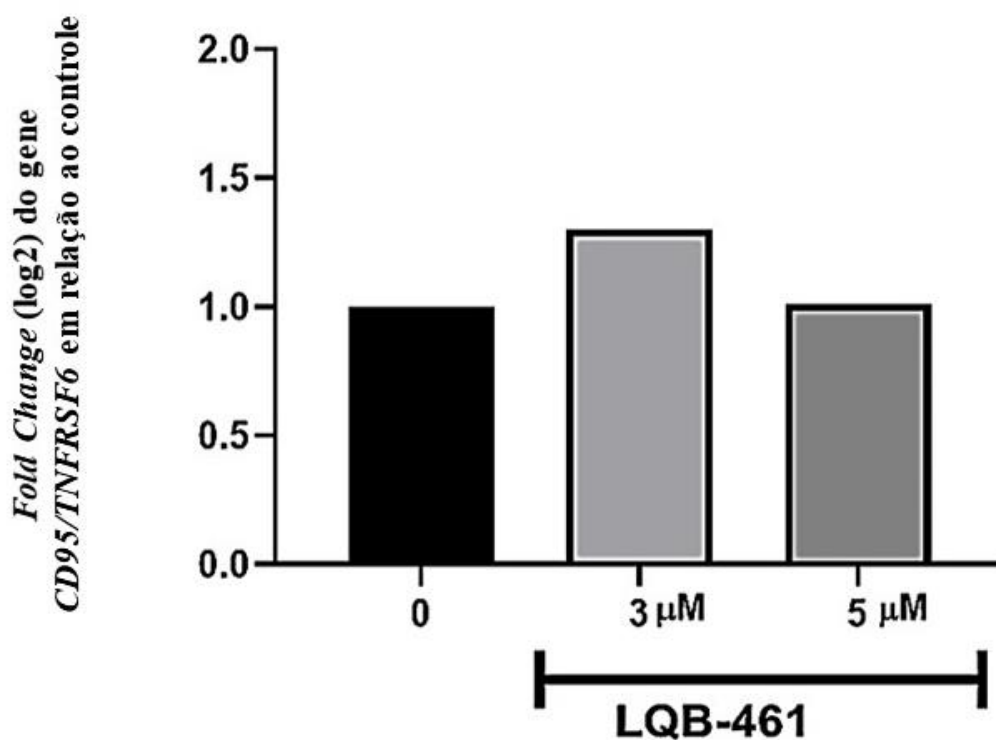
Legenda: As células ($1 \times 10^5/\text{mL}$) foram incubadas na presença ou ausência (controle) de diferentes concentrações de LQB-461 por 72 h a 37°C em estufa de CO_2 . $R_{\text{bax} / \text{Bcl-2}}$ representa a razão da expressão de Bax pela de Bcl-2 em cada concentração testada. O composto Etoposídeo 0,1 μM (Etop) foi usado como controle positivo. Foram capturados 25.000 eventos em cada leitura, sem a utilização de regiões predeterminadas. A fluorescência de Bax e Bcl-2 foram detectadas pelo canal FL6. Os dados representam a média \pm desvio padrão (SD) de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, comparado ao controle (One-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey).

Fonte: Os dados foram analisados e o gráfico construído através dos programas Summit v4.3 e GraphPad Prism 5.0., respectivamente.

4.5 Análise da ação do LQB-461 na via extrínseca de apoptose através do receptor Fas

Nos resultados relativos ao microarranjo, podemos observar na Figura 22 que foi encontrada alteração na expressão do gene *CD95/TNFRSF6* apenas nas células tratadas com LQB-461 na concentração de 3 μM , com diferença no *fold change* deste gene de 1,3 nas células tratadas com o LQB-461, em relação à cultura controle, não havendo alteração na concentração de 5 μM .

Figura 22 – Expressão de *CD95/TNFRSF6* em células Jurkat tratadas com diferentes concentrações de LQB-461, por análise de microarranjo de DNA



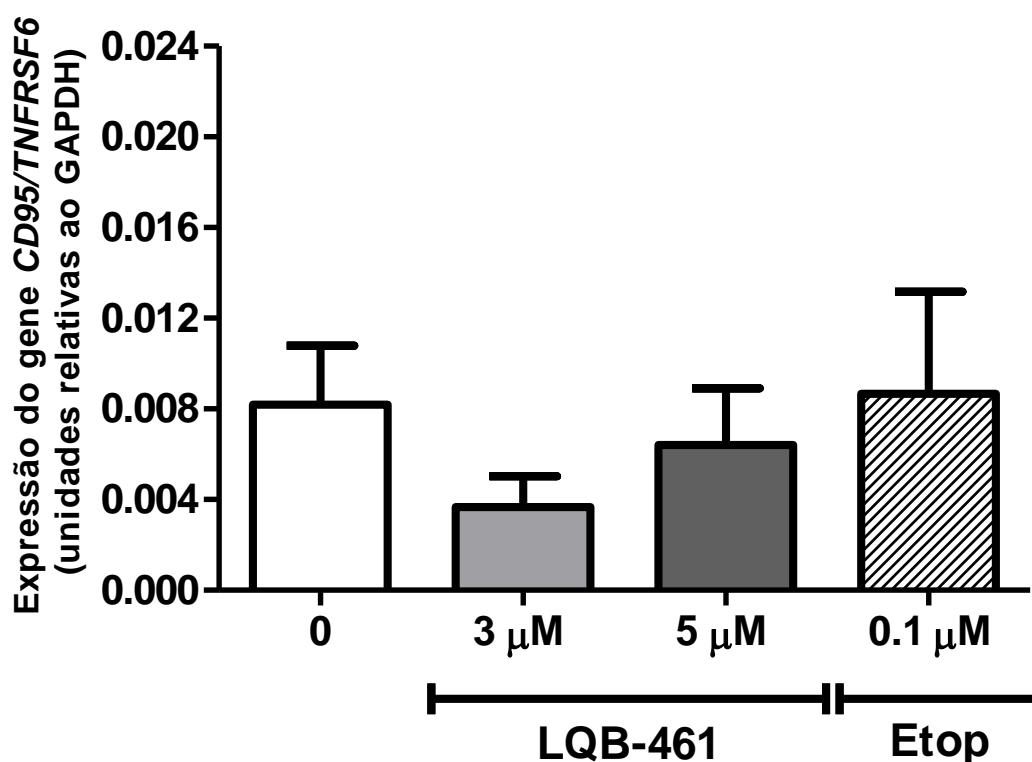
Legenda: As células ($1 \times 10^5/\text{mL}$) foram incubadas na presença ou ausência (controle) em diferentes concentrações de LQB-461 por 72 h a 37°C em estufa de CO_2 . O cálculo de *Fold-Change* (log2) foi realizado através da razão das médias dos valores obtidos do controle e do tratado. Os dados representam os resultados de um pool de três experimentos independentes.

Fonte: Os dados foram analisados e o gráfico construído através dos programas Excel e GraphPad Prism 5.0, respectivamente.

4.5.1 Validações da expressão de receptor Fas

Devido à importância da expressão do receptor Fas no mecanismo de indução de morte em células Jurkat (Aguirre *et al.*, 2013; Li e Shively, 2013; Lee *et al.*, 2014), foi realizado o ensaio de PCR em tempo real para validar a expressão gênica de *CD95/TNFRSF6*, gene que codifica o receptor Fas. Os resultados obtidos (Figura 23) não mostraram diferenças significativas, em relação ao controle, em nenhum dos tratamentos realizados, tanto com o LQB-461 quanto com controle positivo etoposídeo.

Figura 23 – Expressão de *CD95/TNFRSF6* em células Jurkat tratadas com LQB-461, por PCRq



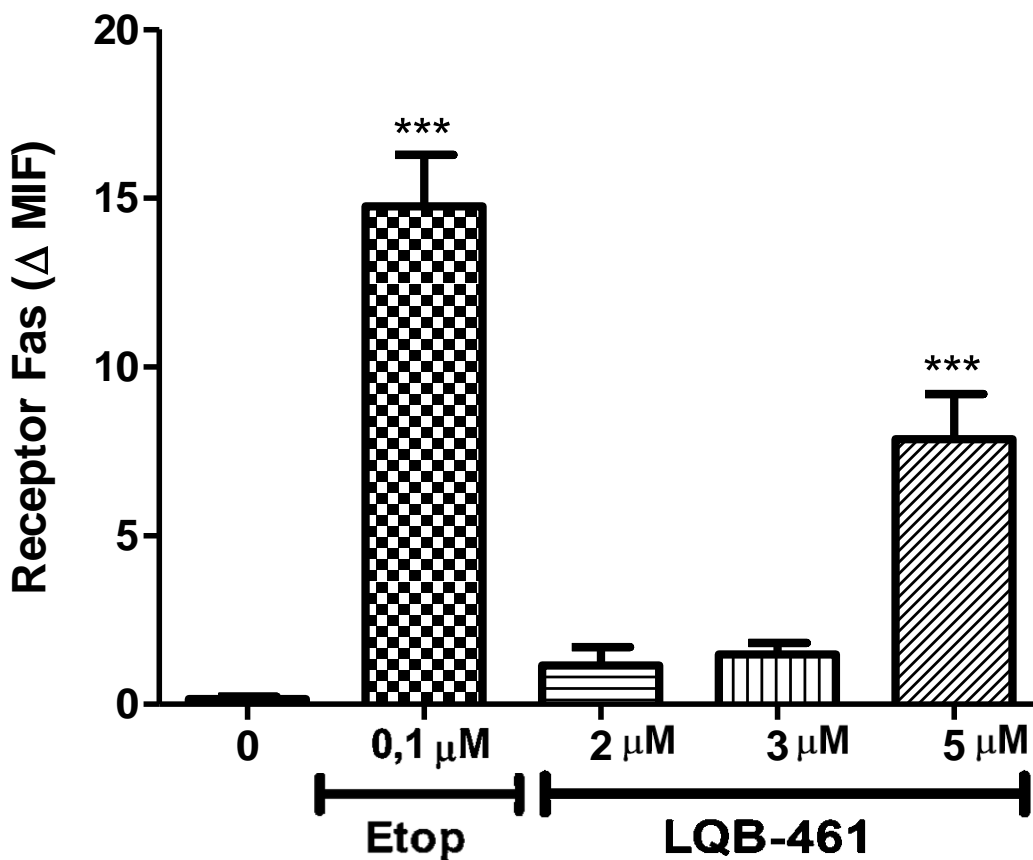
Legenda: As células (1×10^5 /mL) foram incubadas na presença ou ausência (controle) de diferentes concentrações de LQB-461 por 72 h a 37°C em estufa de CO₂. O quimioterápico etoposídeo 0,1 µM (Etop) foi usado como controle positivo. O RNA total foi extraído e o RT-PCR realizado para o gene específico. A diferença entre as médias do gene de interesse e o gene de referência, *GAPDH*, foi calculada pelo programa Microsoft Excel 2010 e o valor de quantificação relativa foi expresso como $2^{-\Delta Cq}$. Os gráficos representam a média \pm desvio padrão (SD) de três experimentos independentes (One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

Fonte: Os dados foram analisados e o gráfico foi construído através dos programas Excel e GraphPad Prism 5.0, respectivamente.

Embora seja esperado que os níveis de expressão gênica através do mRNA correspondam aos níveis expressos de proteína de maneira significativa, a correlação geral entre transcrição e tradução muitas vezes é inconsistente (Fournier *et al.*, 2010; Bauernfeind *et al.*, 2017; Seo *et al.*, 2017). Buscando confirmar se a expressão proteica do receptor Fas corresponderia aos resultados da análise molecular, a expressão deste receptor foi analisada por citometria de fluxo, cujos resultados podem ser observados na Figura 24.

Nos tratamentos com LQB-461 5 μM observamos um aumento de 49,2 vezes ($p < 0,001$), em relação ao controle, na expressão do receptor Fas na membrana celular de células Jurkat. O quimioterápico etoposídeo (controle positivo) também induziu aumento significativo (92,3 vezes, em relação ao controle) na expressão desse receptor em células Jurkat, na concentração de 0,1 μM .

Figura 24 – Expressão do receptor Fas em células Jurkat tratadas com LQB-461, por citometria de fluxo



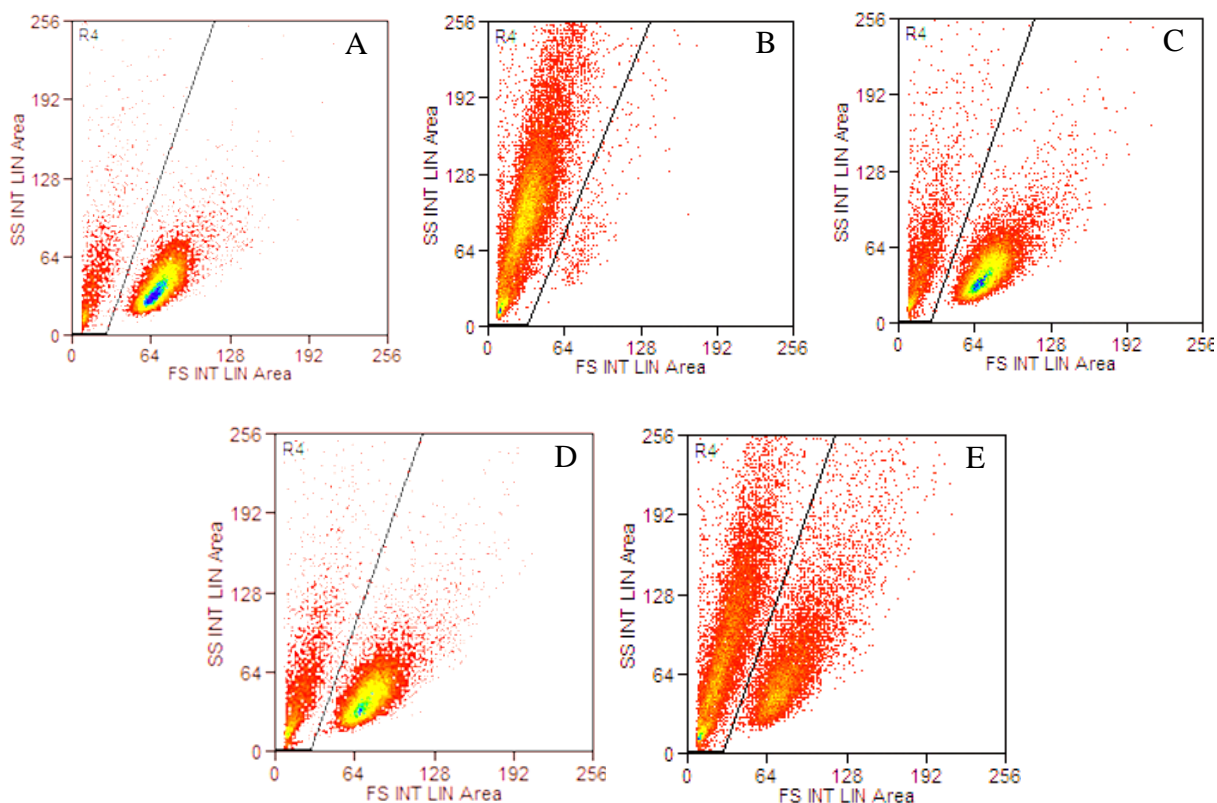
Legenda: As células (1×10^5 / mL) foram incubadas na presença ou ausência (controle) de diferentes concentrações de LQB-461 por 72 h a 37°C em estufa de CO₂. O etoposídeo (0,1 μM) foi usado como controle positivo. Os resultados mostram a mediana de intensidade de fluorescência (Δ MIF) \pm desvio padrão (SD) de três experimentos independentes. A fluorescência de 25.000 eventos foi determinada no canal FL6, sem a

utilização de qualquer região (*gate*) pré-delimitada. *** $p < 0,001$, comparado ao controle (One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

Fonte: Os dados foram analisados e o gráfico construído através dos programas Summit v4.3 e GraphPad Prism 5.0, respectivamente.

Nas análises de expressão do receptor Fas por citometria de fluxo foi observado a presença de duas sub-populações no citograma de tamanho versus granulosidade celular (Figuras 25A - 25E). Com a finalidade de investigar se alguma dessas populações estaria apresentando maior sensibilidade à indução de morte por apoptose através do receptor Fas, em relação à outra, células Jurkat tratadas com o LQB-461 ou etoposídeo foram marcadas concomitantemente para análise da expressão do receptor Fas e da externalização da fosfatidilserina na membrana plasmática, por citometria de fluxo. A externalização da fosfatidilserina na membrana plasmática é um importante marcador de apoptose, o qual pode ser avaliado através da marcação das células com anexina V-FITC (Lee *et al.*, 2013).

Figura 25 – Efeito do tratamento com LQB-461 no tamanho e granulosidade das células Jurkat, por citometria de fluxo



Legenda: A) cultura celular sem tratamento; B) etoposídeo (controle positivo); C) LQB 2 μM ; D) LQB 3 μM ; e E) LQB 5 μM . As células ($1 \times 10^5/\text{mL}$) foram incubadas na ausência (controle negativo) ou presença de diferentes concentrações de LQB-461 ou etoposídeo 0,1 μM , por 72 h a 37°C em estufa de CO₂, e depois

processadas para análise por citometria de fluxo. FS indica tamanho da célula, enquanto SS indica granulosidade da célula. A região R4 (polígono à esquerda) foi gerada neste citograma para delimitar duas populações de células, a da esquerda e a da direita. Experimento representativo. Foram capturados 25.000 eventos na leitura realizada no citômetro Gallios.

Fonte: a análise dos dados foi realizada pelo software Summit v4.3.

A Figura 26 mostra os percentuais de fluorescência de ambas as populações celulares indicadas na Figura 25, tratadas com LQB-461 ou etoposídeo, em relação à cultura controle (ausência de tratamento e considerada como 100% no gráfico). Tais fluorescências foram obtidas em ensaios com marcações simultâneas para fosfatidilserina (leitura no canal FL1, marcador para apoptose) e receptor Fas (leitura no canal FL6, marcador de apoptose ativada pela via extrínseca).

Analisando os resultados referentes à população da esquerda no citograma tamanho vs granulosidade (Figura 25), observamos (Figura 26A) que o tratamento com o LQB-461 nas concentrações de 2 μM e 3 μM não promoveu alterações significativas nos níveis da fluorescência tanto para o receptor Fas (4,7% e 6,3% de aumento, respectivamente) quanto para o marcador de apoptose (0,3% e 11,5% de aumento, respectivamente), em relação ao controle.

Já na concentração de 5 μM encontramos aumento da fluorescência de forma significativa tanto para receptor Fas ($p < 0,001$) como para apoptose ($p < 0,001$), com percentuais de aumento, em relação ao controle, de 21,3% e 24,8 %, respectivamente.

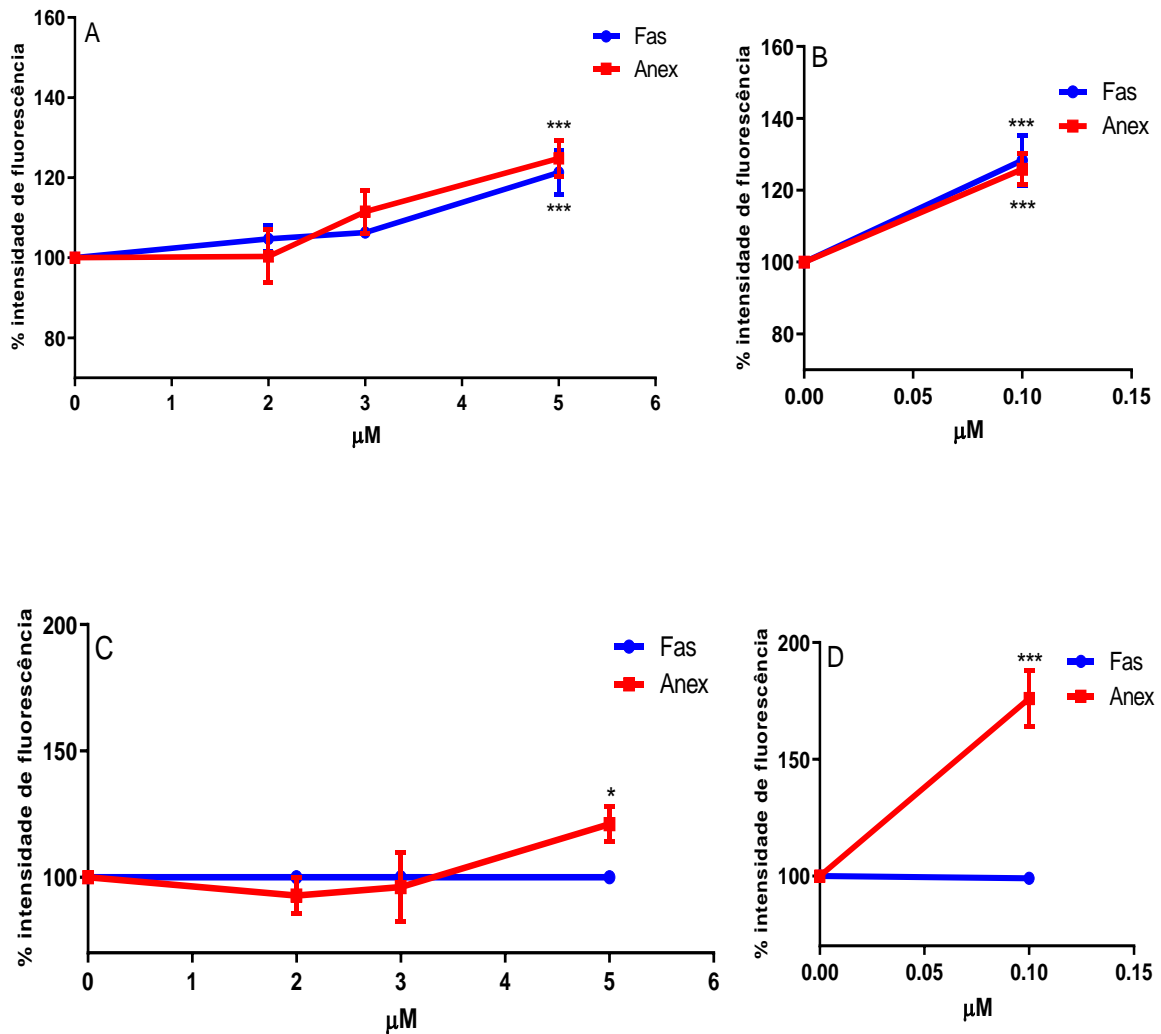
Nesta mesma população da esquerda do gráfico, podemos observar na Figura 26B que o tratamento com o quimioterápico etoposídeo também mostrou aumentos significativos na marcação para ambos, com percentuais de aumento de 28,3% e 25,8% ($p < 0,001$), em relação ao controle, respectivamente, na concentração de 0,1 μM .

Com relação à população da direita, no citograma tamanho versus granulosidade (Figura 25), podemos observar (Figura 26C) que o tratamento com o LQB-461 em células Jurkat não promoveu aumento percentual, em relação ao controle, na indução de apoptose nas concentrações de 2 μM e 3 μM , contudo encontramos um aumento de 21% ($p < 0,05$) na morte por apoptose, em relação ao controle, com a concentração de 5 μM . Já o percentual de aumento de receptor Fas nessa população, após o tratamento com o LQB, foi similar ao controle em todas as concentrações testadas (2 μM , 3 μM e 5 μM), não mostrando alterações significativas.

O tratamento com o etoposídeo promoveu um aumento significativo na marcação para apoptose, nesta população da direita do citograma tamanho versus granulosidade (Figura 25), mostrando um percentual de aumento de 76% ($p < 0,001$), em relação ao controle, na concentração de 0,1 μM , contudo sem aumento significativo na marcação para o receptor Fas.

Esses resultados sugerem que as células Jurkat possuem uma população mais sensível, em contraposição à outra mais resistente, à indução de morte via receptor Fas, tanto após o tratamento com o LQB-461, quanto com o controle positivo etoposídeo.

Figura 26 – Análise dos efeitos simultâneos do LQB-461 na indução de apoptose e expressão do receptor Fas na membrana plasmática de células Jurkat, por citometria de fluxo



Legenda: A) e B) população da esquerda, e C) e D) população da direita, (ambas mostradas na Figura 25), tratadas com LQB e o quimioterápico etoposídeo, respectivamente. Células ($1 \times 10^5/\text{mL}$) foram incubadas na ausência (controle) ou presença de LQB-461 (2, 3 ou 5 μM) ou quimioterápico etoposídeo 0,1 μM , por 72 h a 37°C em estufa de CO_2 , e depois marcadas simultaneamente para Anexina V e receptor Fas. As fluorescências foram lidas nos canais FL1 e FL6, respectivamente. Os gráficos representam a média \pm desvio padrão (SD) de três experimentos independentes. O experimento controle foi considerado como 100% de intensidade de fluorescência. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, comparado ao controle (One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

Fonte: Os dados foram analisados e os gráficos construídos através dos programas Summit v4.3 e GraphPad Prism 5.0, respectivamente.

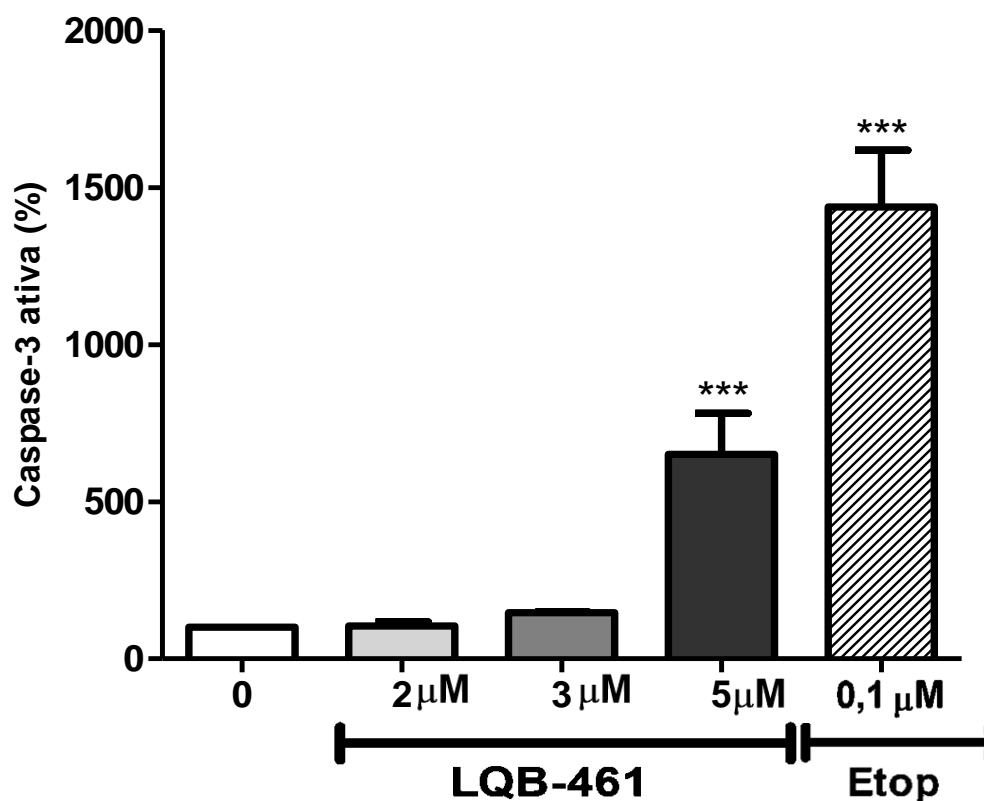
4.6 Validação da expressão de Caspase-3 ativa após tratamento com LQB-461

Devido às alterações observadas, induzidas pelo tratamento com o LQB-461, tanto na via extrínseca como na via intrínseca de ativação de apoptose, e o fato da caspase-3 ser descrita como a principal executora deste tipo de morte celular em ambas as vias (Lossi *et al.*, 2018; Opend Bosch e Lamkanf, 2019), tornou-se importante avaliar a expressão de caspase-3 ativa após tratamento com o LQB-461 em células Jurkat.

Adicionalmente, no ensaio de microarranjo, encontramos diversos genes que promovem o aumento na expressão de caspase-3 modulados positivamente, como podemos observar na Figura 12 e na Tabela 2, sinalizando alterações na expressão desta caspase. Vale destacar que a caspase-3 é ativada de forma pós traducional, através de clivagem de sua forma inativa, a procaspase 3 (Sagulenko *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019). Desta forma, sua quantificação molecular pode não expressar a presença dessa caspase em sua forma ativa na célula, o que nos fez optar por validar sua expressão através da análise da enzima ativa.

Na Figura 27 podemos observar os resultados obtidos na detecção desta caspase-3 ativa por citometria de fluxo. Na concentração de 5 μ M do LQB-461, o aumento de 6,5 vezes, em relação ao controle, se mostrou significativo ($p < 0,001$). O quimioterápico etoposídeo (Figura 27) também induziu aumento de 14,37 vezes na expressão de caspase-3 ativa em relação ao controle ($p < 0,001$), na concentração de 0,1 μ M.

Figura 27 – Expressão de caspase-3 ativa em células Jurkat tratadas com LQB-461, por citometria de fluxo



Legenda: As células ($1 \times 10^5/\text{mL}$) foram incubadas na presença ou ausência (controle) de diferentes concentrações de LQB-461 ou etoposídeo $0,1 \mu\text{M}$ (referido como Etop no gráfico) por 72 h a 37°C em estufa de CO_2 . Foram capturados 25.000 eventos em cada leitura, sem a utilização de regiões predeterminadas. A fluorescência de foi detectada pelo canal FL1. O gráfico apresenta a porcentagem \pm desvio padrão (SD) da intensidade de fluorescência de três experimentos independentes, considerando a cultura controle como 100%. *** $p < 0,001$, comparado ao controle (One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

Fonte: Os dados foram analisados e o gráfico construído através dos programas Summit v4.3 e GraphPad Prism 5.0, respectivamente.

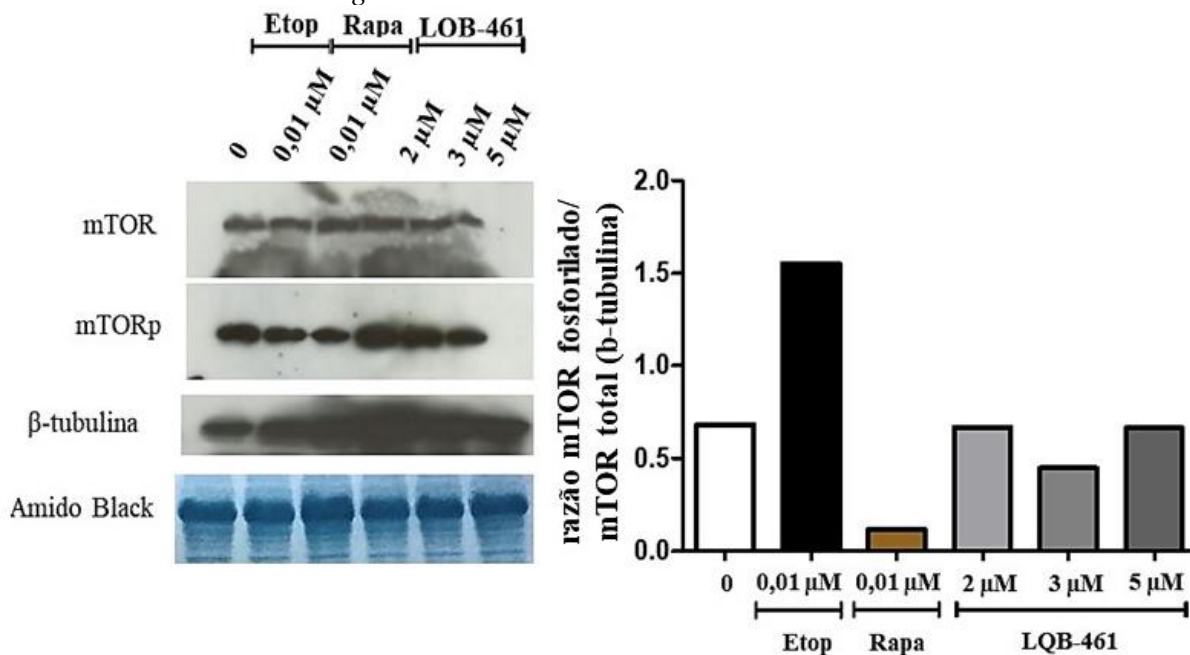
4.7 Validações da ação do LQB-461 na modulação da proliferação pela via PI3K/AKT/mTOR

Em estudos anteriores, o LQB-461 mostrou diminuir a população de células Jurkat sem alterar o ciclo celular nem induzir apoptose na concentração do seu IC₅₀ (2,8 µM), sugerindo um efeito citostático através da inibição da proliferação (Thimoteo, 2017). Nos dados obtidos pelo ensaio de microarranjo foram encontrados diversos processos biológicos relacionados com a diminuição da proliferação e da síntese de proteína enriquecidos significativamente ($p < 0,05$; $p < 0,001$), sinalizando a importância da ação do LQB-461 sobre esses processos em células Jurkat.

Além disto, na análise individual dos genes modulados, foram encontrados 108 genes relacionados com diferentes vias reguladoras da proliferação, dos quais 44 estão relacionados à via do mTOR e síntese de proteínas, representando a via majoritariamente modulada. Desta forma, nossos estudos foram continuados buscando avaliar se o mTOR, um importante mediador da proliferação e descrito como principal promotor da síntese de proteínas (Sridharan e Basu, 2020), seria alvo do mecanismo de ação do LQB-461 em células Jurkat.

Devido ao mTOR necessitar sofrer modulação por fosforilação para se tornar ativo (Mirabili *et al.*, 2018; Paquette *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Sridharan e Basu, 2020), optamos por fazer a investigação pelo estudo da proteína e não pelo mRNA. Na Figura 28 temos a imagem representativa do ensaio por *Western Blotting* realizado na investigação do mTOR e mTORp.

Figura 28 – Razão da expressão mTOR-P/mTOR em células Jurkat tratadas com LQB-461, por *Western Blotting*



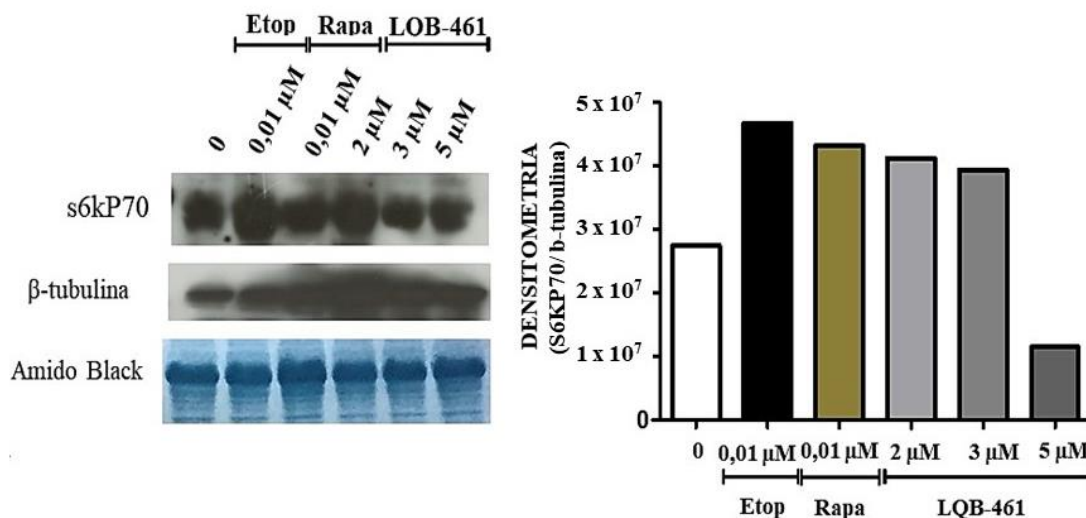
Legenda: As células (1×10^5 /mL) foram incubadas na presença ou ausência (controle) de diferentes concentrações de LQB-461 ou etoposídeo por 72 h a 37°C em estufa de CO₂. A rapamicina (Rapa) e o etoposídeo (Etop) foram utilizados como controles positivos na concentração de 0,1 μ M. foram utilizados como controles. A proteína β -tubulina foi utilizada como controle de expressão constitutiva. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

Fonte: As densitometrias foram obtidas e o gráfico construído através dos programas ImageJ e GraphPad Prism 5.0, respectivamente.

Resultados preliminares, expostos na Figura 28, mostram a razão mTOR-P/mTOR, que indica o grau de ativação desta proteína. Tais resultados sugerem que o tratamento com LQB-461 a 3 μ M promove uma diminuição (34%) desta razão, em relação ao controle. O tratamento das células Jurkat com rapamicina, utilizada como um dos controles positivos, e descrito na literatura como inibidor do mTOR (Podshivalova *et al.*, 2018), também parece promover diminuição (63%) da razão mTOR-P/mTOR, em relação ao controle. Já o quimioterápico etoposídeo, outro controle positivo, promoveu aumento (127%) da ativação desta proteína em células Jurkat, no entanto mais experimentos são necessários para que seja possível fazermos uma análise estatística destes dados.

Continuando as análises desta via, foi investigada a expressão da proteína S6KP70, descrita, dentre diversas funções, como sendo uma indutora importante da síntese de proteínas e ativada pelo mTOR (Mirabilii *et al.*, 2018; Paquette *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018). Os resultados preliminares obtidos no ensaio de *Western Blotting* podem ser observados na Figura 29.

Figura 29 – Expressão da proteína S6KP70 em células Jurkat tratadas com LQB-461, por *Western Blotting*

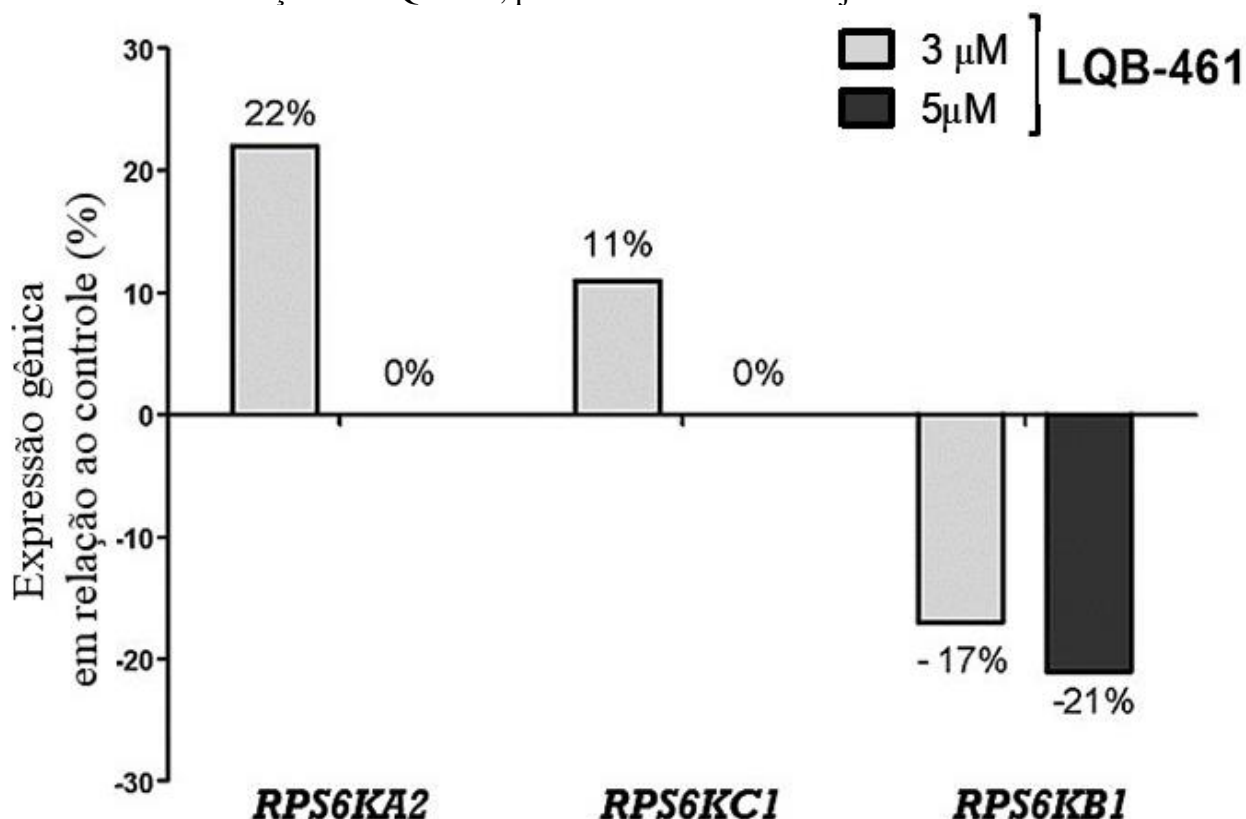


Legenda: As células (1×10^5 /mL) foram incubadas na presença ou ausência (controle) de diferentes concentrações de LQB-461 ou etoposídeo por 72 h a 37°C em estufa de CO₂. A rapamicina (Rapa) e o etoposídeo (Etop) foram utilizados como controles positivos na concentração de 0,1 μ M. A proteína β -tubulina foi utilizada como controle de expressão constitutiva. Resultados de um experimento.

Fonte: As densitometrias foram obtidas e o gráfico construído através dos programas ImageJ e GraphPad Prism 5.0., respectivamente.

Nos resultados apresentados na Figura 29, observa-se uma tendência de aumentos (50% e 44%) na expressão de S6KP70, nas células Jurkat tratadas com 2 μ e 3 μ M de LQB-461, respectivamente, e diminuição (58%) em 5 μ M, em relação ao controle. Os controles etoposídeo e rapamicina também mostraram tendência em aumentar (71% e 57%, respectivamente) a expressão desta proteína em células Jurkat (n = 1). Contudo, vale destacar que a proteína S6KP70 possui diferentes isoformas, sendo a S6K1 a principal isoforma ativada pelo mTOR e envolvida na promoção da síntese proteica (Sridharan e Basu, 2020). Na análise obtida nos ensaios de microarranjo encontramos a expressão dessas três isoformas, resultado que pode ser observado na Figura 30.

Figura 30 - Expressão das isoformas do gene *S6KP70* em células Jurkat tratadas com diferentes concentrações de LQB-461, por análise de microarranjo de DNA



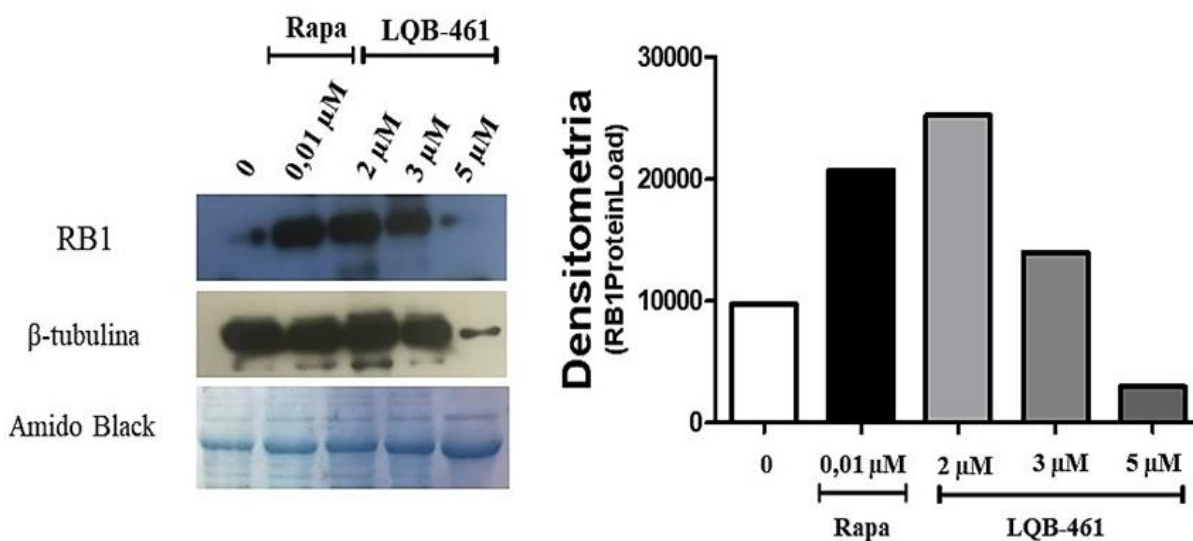
Legenda: As células (1×10^5 /mL) foram incubadas na presença ou ausência (controle) de diferentes concentrações de LQB-461 por 72 h a 37°C em estufa de CO₂. As porcentagens foram baseadas em alterações nos valores de *Fold Change*. O cálculo de *Fold-Change* (log₂) foi realizado através da razão das médias dos valores obtidos do controle e do tratado. Os dados representam os resultados de um pool de três experimentos independentes.

Fonte: Os dados foram analisados e o gráfico construído através dos programas Excel e GraphPad Prism 5.0, respectivamente.

Nos resultados obtidos pelo microarranjo para os genes que codificam a proteína S6KP70 no qual encontramos 3 isoformas, a expressão de 2 isoformas estava aumentada e apenas a isoforma *RPS6KB1*, responsável pela transcrição da proteína S6K1, apresentou-se diminuída (- 17% e - 21% respectivamente em 3 μ M e 5 μ M).

Ainda relacionada à esta via de proliferação, foi analisada a expressão da proteína RB1, importante marcadora de proliferação e inibidora da via Akt/mTOR (Xie *et al.*, 2017). Os resultados preliminares do ensaio por *Western Blotting* (n =1) podem ser observados na Figura 31.

Figura 31 - Expressão da proteína RB1 em células Jurkat tratadas com LQB-641, por *Western Blotting*



Legenda: As células (1×10^5 /mL) foram incubadas na presença ou ausência (controle) de diferentes concentrações de LQB-461 ou etoposídeo por 72 h a 37°C em estufa de CO_2 . A rapamicina (Rapa) foi utilizada como controle positivo na concentração de $0,1 \mu\text{M}$. A proteína β -tubulina foi utilizada como controle de expressão, constitutiva. Resultados de um experimento.

Fonte: As densitometrias foram obtidas e o gráfico foi construído através dos programas ImageJ e GraphPad Prism 5.0., respectivamente.

Os resultados expostos na Figura 31 sugerem que os tratamentos de células Jurkat com LQB-461 a $2 \mu\text{M}$ e $3 \mu\text{M}$ promovem aumentos (160% e 44%, respectivamente) da expressão da proteína RB, em relação ao controle, e diminuição (70%) em $5 \mu\text{M}$ ($n = 1$). A rapamicina, utilizada como controle positivo neste ensaio, mostra tendência a promover indução (114%) da expressão da proteína RB1, após tratamento na concentração de $0,1 \mu\text{M}$.

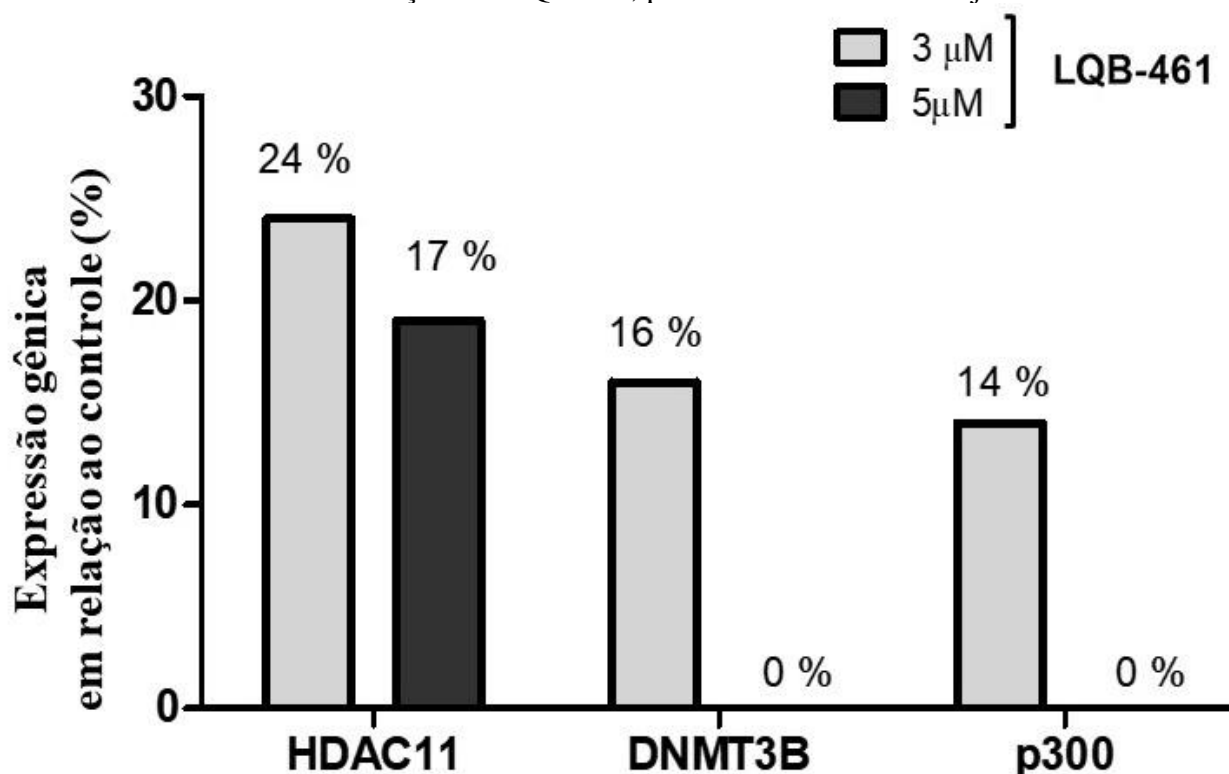
4.8 Efeito do tratamento com LQB-461 na modulação de mRNAs de vias relacionadas com epigenética

A epigenética pode ser caracterizada como mudanças hereditárias na expressão gênica e na estrutura da cromatina sem que ocorra mudanças na sequência de DNA. As histonas desacetilases (HDACs), histona acetiltransferases (HAT) e DNA metiltransferases (DNMTs) representam importantes mecanismos de controle epigenético e desempenham um papel importante na patologia do câncer (Aydin e Kalkan, 2020; Akone *et al.*, 2020).

Desta forma, um dos objetivos do nosso trabalho foi avaliar possíveis alterações no mRNA pertencentes as famílias de HDACs, HATs e DNMTs após tratamento *in vitro* de células Jurkat com o LQB-461. No ensaio de microarranjo, podemos observar (Tabela 2) a diminuição de processos biológicos de regulação da expressão gênica e epigenética na concentração de 3 μ M.

Ao investigar na literatura, individualmente, os genes das famílias HDACs, HATs e DNMTs alterados nos resultados do microarranjo, encontramos três importantes genes modulados, após tratamento com o LQB-461 em células Jurkat. Estes resultados podem ser observados na Figura 32.

Figura 32 - Expressão de genes HDACs, HATs e DNMTs em células Jurkat tratadas com diferentes concentrações de LQB-461, por análise de microarranjo de DNA



Legenda: As células (1×10^5 /mL) foram incubadas na presença ou ausência (controle) em diferentes concentrações de LQB-461 por 72 h a 37°C em estufa de CO_2 . As porcentagens foram baseadas em alterações nos valores de *Fold Change*. O cálculo de *Fold-Change* (\log_2) foi realizado através da razão das médias dos valores obtidos do controle e do tratado. Os dados representam os resultados de um pool de três experimentos independentes.

Fonte: Os dados foram analisados e o gráfico construído através dos programas Excel e GraphPad Prism 5.0., respectivamente.

Podemos observar na Figura 32 um aumento de expressão, em relação ao controle, dos genes *HDAC11*, *DNMT3B* e *p300* (24%, 16% e 14%, respectivamente), após o tratamento de células Jurkat com 3 µM de LQB-461. Na concentração de 5 µM, o LQB-461 aumentou apenas a expressão do gene *HDAC11* (17%), em relação ao controle.

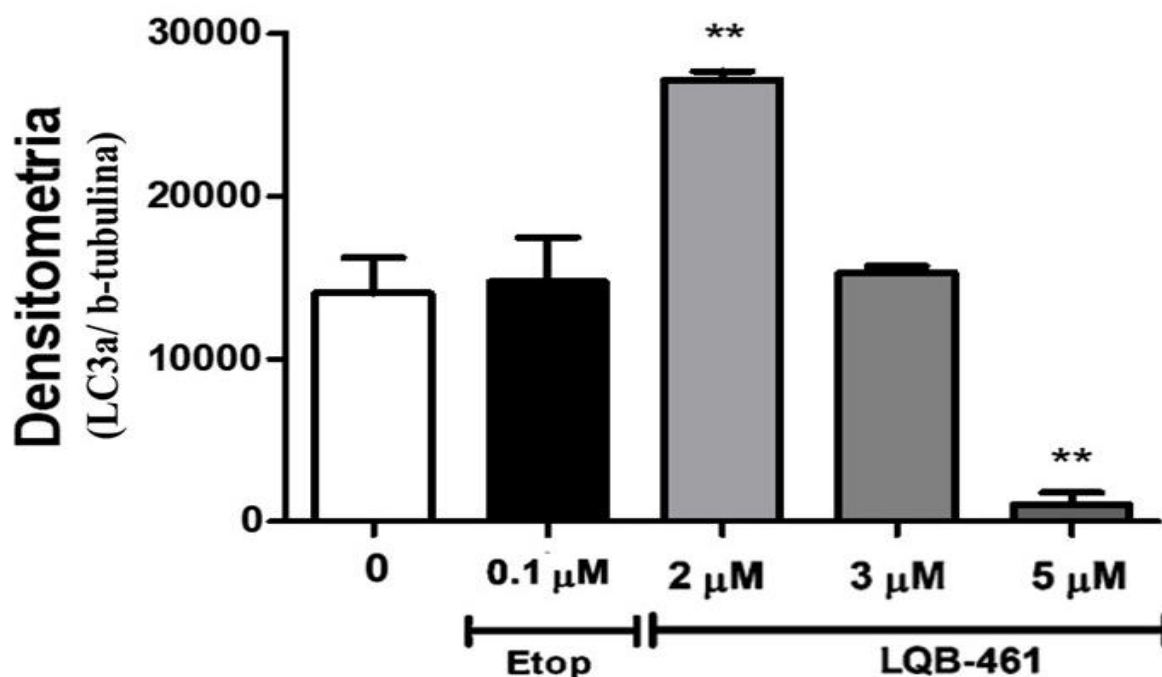
4.9 Validações do efeito do tratamento com LQB-461 no processo de autofagia

A autofagia é um processo natural da fisiologia celular que quando desregulado pode estar relacionado com a indução de apoptose ou mecanismos de sobrevivência, resistência e proliferação (Sun, 2016; Qian *et al.*, 2017; Antunes *et al.*, 2018; Jacomin *et al.*, 2018).

Nos ensaios de microarranjo foram encontrados alterados processos biológicos ($p < 0,05$) relacionados a autofagia. Ainda por este ensaio, na investigação de genes moduladores da autofagia, encontramos genes com expressões alteradas, quais não somente estavam relacionados a este processo em si, mas também mostraram relações com outros processos importantes no mecanismo de ação do LQB-461.

Desta forma, foi dada continuidade aos estudos, investigando se o tratamento com o LQB-461 poderia promover alterações no processo de autofagia em células Jurkat. Na Figura 33 podemos observar os resultados da análise da proteína LC-3a, forma ativa da proteína LC-3, por *Western Blotting*, proteína descrita na literatura como um marcador importante da autofagia (Antunes *et al.*, 2018; Lee, 2018; Yu *et al.*, 2018).

Figura 33 – Expressão da proteína LC-3a em células Jurkat tratadas com LQB-461, por *Western Blotting*



Legenda: As células (1×10^5 / ml) foram incubadas na ausência (controle) ou na presença de diferentes concentrações do composto por 72 h a 37°C em estufa de CO₂. Para análise de *Western Blotting*, as proteínas totais das células foram extraídas com tampão RIPA e os níveis de LC-3a foram avaliados usando anticorpos específicos. O etoposídeo (0,1 µM) foi utilizado como controle positivo. A β-tubulina

foi utilizada como controle de expressão constitutiva. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão da densitometria de três experimentos independentes. $**p < 0,01$, comparado ao controle (One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

Fonte: As densitometrias foram obtidas e o gráfico construído através dos programas ImageJ e GraphPad Prism 5.0., respectivamente.

O tratamento com LQB-461, na concentração de 2 μM , mostrou promover um aumento de 96% ($p < 0,01$) na expressão da proteína LC-3a em células Jurkat, em relação ao controle. Por outro lado, a concentração de 5 μM do LQB-461 também promoveu alteração significativa, porém de diminuição (93%) na expressão deste marcador, em relação ao controle.

Após o tratamento na concentração de 3 μM , os valores de expressão foram similares ao controle. Alterações significativas entre as concentrações testadas demonstram que o LQB-461 induz um efeito dose dependente sobre a expressão da LC-3a.

Na Figura 33 também observamos os efeitos do etoposídeo, fármaco utilizado como controle positivo, demonstrando inibição significativa ($p < 0,01$) da expressão de LC-3, quando comparado ao controle não tratado.

5 DISCUSSÃO

A tecnologia de microarranjo de DNA se tornou uma importante ferramenta de investigação, e sua análise oferece uma variedade de métodos que permitem, entre outros, a coleta de informações para diagnóstico de doenças, a identificação de genes que podem ser significativos em um mecanismo de resposta celular específico ou um padrão de expressão de gene em particular, que caracteriza uma doença, ou uma ferramenta de rastreamento de possíveis mecanismos de ação de um fármaco, avaliando sua citotoxicidade e seu impacto na fisiologia celular (Jaksik *et al.*, 2015; Jonczyk *et al.*, 2016; Alonso-Betanzos *et al.*, 2019; Wöhrle *et al.*, 2020).

Neste trabalho foi realizado um rastreamento dos genes modulados pelo LQB-461 em células de leucemia Jurkat, através do ensaio de microarranjo. Para isso foram realizados 3 experimentos individuais de incubação das células na presença ou ausência do LQB-461, e após a extração do RNA total foi realizado um *mix* equimolar (pool) de cada condição de cultura, a partir dos diferentes experimentos, no caso um pool para o controle não tratado, um para o LQB-461 na concentração de 3 μM e outro para o LQB-461 na concentração de 5 μM . Esse tipo de estratégia tem sido descrita na literatura, onde a utilização do pool de amostra de RNA em ensaios de microarranjo otimizaram o custo de geração de dados, bem como o poder estatístico para a análise de expressão gênica diferencial (DGE). Foram relatados para cenários com uma alta variabilidade biológica um pool com n amostral de 2, já sendo eficaz para otimizar o custo do experimento e manter o poder estatístico que seria obtido sem a combinação. (Takele Assefa *et al.*, 2020).

Com base nos dados obtidos do ensaio de microarranjo, podemos observar na Figura 9 a clusterização de genes por *heatmap*, onde existem variações de expressão gênica entre os tratamentos e entre os tratamentos e o controle. Ao analisar a Tabela de GDEs, essa variação observada inicialmente pôde ser confirmada, totalizando 4621 e 1310 genes modulados em relação ao controle nas concentrações de 3 e 5 μM , respectivamente.

Na literatura, Thomas e colaboradores (2015) demonstrou a existência de uma degradação de RNAm rápida e global durante a intensificação do processo apoptótico, principalmente quando ocorre ativação expressiva de caspase-3. Em estudos anteriores com LQB-461 foi demonstrado uma intensa indução de apoptose em células Jurkat, indicando um valor aproximado de 90% de morte por apoptose na concentração de 5 μM (Thimóteo, 2017).

Isto pode explicar a redução da modulação gênica observada na concentração de 5 μM , que também induziu um aumento significativo ($p < 0,0001$) de caspase-3 ativa no presente trabalho (Figura 27).

Também é interessante destacar que ao observar a interseção dos genes expressos nas concentrações de 3 μM e 5 μM (Figura 10) vemos um total de 123 genes com expressão alterada, sinalizando que apesar de estudos anteriores indicarem que o LQB-461 apresente efeitos diferentes em células Jurkat dependendo da concentração testada (Thimoteo, 2017), provavelmente existem mecanismos de ação que são comuns atuando em ambas as dosagens.

Buscando realizar uma análise de enriquecimento de dados mais direcionada aos genes com maior alteração em sua expressão, foi estabelecido, como parâmetro, a seleção de genes com aumento ou diminuição de expressão superior a 30% em relação ao controle. Na análise foi utilizado o programa *WEB-based Gene set Analysis Toolkit* (WebGestalt), sendo realizada a seleção de genes regulados positivamente e negativamente. Podemos observar, com os resultados obtidos, que o LQB-461 promoveu uma ampla regulação de processos, interferindo em diversas vias, inclusive com o aumento significativo na indução de processos apoptóticos, ou a eles relacionados, com ambas as concentrações estudadas. Na Tabela 1, onde temos os genes modulados positivamente pelo LQB-461 na concentração de 3 μM , encontramos o aumento da produção de citocinas da superfamília do fator de necrose tumoral e resposta ao interferon-alfa, ambos os processos relacionados à indução de apoptose (Miura *et al.*, 2015; Jarry *et al.*, 2017; Sobrido-Cameán *et al.*, 2018). Também encontramos na Tabela 1, aumento do processo apoptótico de células epiteliais, indicando a importância da morte celular programada no mecanismo de ação do LQB-461.

Na Tabela 3, que apresenta os processos biológicos que aumentaram significativamente com o tratamento pelo LQB-461 na concentração de 5 μM , encontramos os processos metabólicos de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, e vias ERK1 e ERK2, já descritos na literatura estarem relacionados com a indução de apoptose (Lan *et al.*, 2015; Cort *et al.*, 2016; Tangchirakhaphan *et al.*, 2018; Yoon *et al.*, 2019). Alguns estudos mostram a indução de morte por apoptose via aumento de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio através do tratamento com derivados cinamoil (Lan *et al.*, 2015; Yoon *et al.*, 2019), grupo que faz parte da composição estrutural do LQB-461.

Quando analisamos os dados da Tabela 6, que apresenta a análise de enriquecimento realizada com os dados selecionados dos genes regulados positivamente em ambas as concentrações de 3 e 5 μM do LQB-461, também encontramos um grande número de processos

relacionados à apoptose alterados significativamente, entre estes alguns que agem como promotores e outros como inibidores desta via. Desta forma, buscando entender melhor o mecanismo de ação do LQB-461 sobre a apoptose, foi realizada uma análise individual na literatura dos 1010 genes selecionados pela análise de enriquecimento de dados (conforme descrito no item 4.10), utilizando a plataforma PUBMED. Um dos critérios de avaliação seria investigar se esses genes teriam relação com o câncer e com a apoptose. Vale destacar que a via intrínseca de apoptose mostrou ser majoritária, com genes modulados representando 42% em relação ao total de genes descritos relacionados a indução de morte. A lista desses principais genes reguladores da via intrínseca de apoptose encontra-se em destaque na Figura 11.

Com base nesses estudos da literatura e nos resultados da análise de enriquecimento de dados, foi construído um fluxograma esquemático (Figura 12), onde vemos diversos genes da via intrínseca de apoptose sendo modulados pelo LQB-461 nas concentrações de 3 μ M (Fig. 12A) e 5 μ M (Fig. 12B).

Na Figura 12A observamos que após o tratamento com o LQB-461 na concentração de 3 μ M, houve um aumento, em relação ao controle, na expressão de diversos genes descritos na literatura como indutores de p21, sendo eles *MsrA* (De Luca *et al.*, 2010; Choi e kim, 2011; Jiang e Moskovitz, 2018), *Sox6* (Qin *et al.*, 2011; Wang, J. *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2018); *PPMIK* (Liu, Xiaoye *et al.*, 2018), *P3H3* (Li *et al.*, 2018), *PAX8-AS1* (Yu, Xiaolan *et al.*, 2018), *OTUD1* (Zhang *et al.*, 2017; Piao *et al.*, 2017; Wu, Lanqin *et al.*, 2019), *ING2* (Guérillon *et al.*, 2013; Blondel *et al.*, 2019), *RBMS2* (Sun *et al.*, 2018) e *THBS1* (Huang *et al.*, 2017). Da mesma forma, encontramos diferentes genes inibidores desta proteína regulados negativamente, como *SMARCA5* (Jin *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2018), *RPS9* (Goudarzi e Lindström, 2016; Cheng *et al.*, 2017; Lindström e Nistér, 2010) e *CST1* (Dai *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2019; Liu e Yao, 2019). A maioria dos genes descritos na Figura 12A mostra o mesmo perfil de resposta após tratamento na concentração de 5 μ M do LQB-461 (Figura 12B), em menor intensidade, possivelmente pela degradação de RNAm por indução expressiva de apoptose (Thomas *et al.* (2015) e/ou diminuição do pico de expressão de RNAm que pode ocorrer após a tradução (Fournier *et al.*, 2010).

Na mesma análise por microarranjo, além dos genes relacionados com o p21 mostrarem modulação que sinalizem seu aumento, o próprio gene *CDKN1A*, que codifica o p21, mostrou um aumento da expressão (Figura 17), em relação ao controle, nas células tratadas com LQB-461, tanto na concentração de 3 μ M (25%), quanto na concentração de 5 μ M (34%). Por PCRq em tempo real (Figura 18), foi confirmado o aumento significativo (218%) deste gene em

relação ao controle, após o tratamento com a concentração de 5 μ M. O p21 é uma proteína que pode apresentar múltiplas funções biológicas, e entre as mais descritas na literatura podemos destacar sua capacidade de inibir a proliferação e também promover a indução de morte por apoptose (Kreis e Yuan, 2019; Shamloo e Usluer, 2019; Dadsena *et al.*, 2021; Obeng, 2021). Em estudo anterior, foi demonstrado que o LQB-461 é capaz de regular positivamente a expressão da proteína p21 em células Jurkat, por citometria de fluxo (Thimóteo, 2017). Esse aumento de p21 induzido pelo LQB parece representar um dos mecanismos de ação desta molécula e seu efeito na indução de morte por apoptose observada na concentração de 5 μ M (Thimóteo, 2017).

Outro aspecto importante a ser destacado neste trabalho é o fato da atividade anti-leucêmica do LQB-461 ocorrer de forma independente de p53, já que as células Jurkat possuem este gene expresso de forma deficiente (Costa *et al.*, 2015). Tendo em conta que alterações na regulação de apoptose e do ciclo celular encontram-se diretamente ligadas ao desenvolvimento do câncer e que as mutações do gene *TP53* têm gerado um perfil de células tumorais com maior resistência a múltiplas drogas quimioterápicas (Costa *et al.*, 2015), o desenvolvimento de novas drogas capazes de induzir apoptose de modo independente de p53 é de grande relevância, o que torna o LQB-461 um candidato promissor para uma abordagem terapêutica no tratamento das leucemias.

Quanto à relação da estrutura química, o LQB-461 é um protótipo oriundo da modificação estrutural de *N*-metilaril nitronas *O*-geraniladas, pelo aumento das restrições conformacionais na cadeia lateral insaturada, através de sua anelação. Além da anelação da cadeia terpênica, com inserção de um radical nitro na mesma, o LQB-461 sofreu uma alteração do grupamento nitrona para aldeído. Desta forma, esse composto é formado por um fragmento benzaldeído unido a um fragmento cinamoil, este contendo um grupamento nitro. Na literatura, a expressão aumentada de p21 tem sido descrita para tratamentos com derivados cinamoila (Remiszewski, 2003; Kwon *et al.*, 2015). Além disso, o LQB-461 apresenta a porção benzaldeído, e já foi demonstrado o aumento da expressão de p21 após tratamento com derivados benzaldeídos (Cheung *et al.*, 2010).

Quanto ao quimioterápico etoposídeo, os resultados por PCR em tempo real (Figura 18) mostraram aumento da expressão do gene *CDKN1A* de forma significativa após tratamento na concentração de 0,1 μ M deste composto ($p < 0,001$). Em nossos estudos anteriores, foi demonstrado por citometria de fluxo que o etoposídeo também induziu expressivamente ($p < 0,001$) a proteína p21 em células Jurkat, na concentração de 0,1 μ M (Thimóteo, 2017). Na

literatura também se encontra descrita a ação do etoposídeo como promotor do aumento de p21 em células Jurkat (Mahyar-Roemer e Roemer, 2001; Ding *et al.*, 2003; Jamil *et al.*, 2015). Este quimioterápico parece também induzir aumento na expressão de p21, de forma p53-dependente e p53-independente, em vários outros tipos de câncer (Mahyar-Roemer e Roemer, 2001; Ding *et al.*, 2003; Jamil *et al.*, 2015).

A via intrínseca de apoptose é geralmente iniciada quando há danos ao DNA ou interrupção de fatores de crescimento, estando envolvida no controle do desenvolvimento, e também associada à morte induzida por agentes genotóxicos. Esta via é regulada por membros da família Bcl-2, entre estes podemos destacar a proteína Bax, uma proteína pró-apoptótica importante para formação de poros na membrana mitocondrial e consequente liberação do citocromo C, formação de apoptossoma e ativação de caspases, eventos que irão promover a apoptose (Nagata, 2018; D'Arcy, 2019; Xu *et al.*, 2019; Dadsena *et al.*, 2021; Obeng, 2021). Na Figura 12A podemos observar que o ensaio de microarranjo sinalizou a ativação da via intrínseca de apoptose após tratamento com LQB-461 na concentração de 3 μ M, mostrando regulação positiva de genes promotores da apoptose, e aumento da expressão de diversos genes ativadores da expressão de Bax, e inibidores da expressão de Bcl-2 como *CPS1-IT1*, *miR-32*, *Kank1*, *miR-101-2*, *MIF1* e *CFHR3*, mostrando a importância da regulação desses intermediários no mecanismo de ação do LQB-461 em células Jurkat (Sun *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2017; Cui *et al.*, 2017; Gabra e Salmena, 2017; Nakamae *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2017; Xiaoguang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Gu e Zhang, 2018; Wang, Cen Zhu *et al.*, 2018; Liu, Hong *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2019; Fan *et al.*, 2020). Após o tratamento na concentração de 5 μ M (Figura 12B), observamos uma menor intensidade na expressão destes genes, concentração na qual observamos uma indução intensa de apoptose pelo LQB-461 em células Jurkat (Thimoteo, 2017). Como discutido anteriormente, essa redução de expressão pode estar relacionada à degradação de RNAm em induções expressivas de apoptose, onde o decaimento global, com diminuição de expressão de RNAm, está fortemente relacionado com a intensificação desse mecanismo de morte (Thomas *et al.*, 2015). Além disto, é comum a diminuição da expressão de RNAm após tradução de determinada proteína, visto que o pico de expressão de RNAm e proteico não ocorrem necessariamente no mesmo período de tempo (Fournier *et al.*, 2010).

Analisando-se os resultados obtidos, o LQB-461 induziu aumentos significativos de Bax, tanto no nível transcricional (Figura 19A) quanto traducional (Figura 20A), ($p < 0,05$; $p < 0,001$, respectivamente), em relação ao controle, na concentração de 5 μ M. Esses resultados

são compatíveis com dados anteriores, que mostram a indução de apoptose em células Jurkat, com o tratamento pelo LQB-461 nesta mesma concentração, sugerindo que a proteína pró-apoptótica Bax participe do mecanismo de ação de indução de morte (Thimóteo, 2017). Na literatura, derivados cinamoil têm demonstrado atividade antitumoral, promovendo morte por apoptose através do aumento da proteína Bax (Lan *et al.*, 2015; Maiuthed *et al.*, 2017). Maiuthed e colaboradores (2017) demonstraram a ação antitumoral do composto hidroquinona 5-O-cinamoil éster (CIN-RM) em células de câncer de pulmão H292, induzindo apoptose em concentrações de 15-60 μM , através do aumento na expressão do fator indutor de apoptose (AIF) e ativação da caspase-3 e -9. No estudo do mecanismo de ação, CIN-RM mediou a apoptose regulando positivamente a proteína Bax, além de diminuir, de forma significativa, a fosforilação de AKT. Lan e colaboradores (2015) demonstraram o efeito do 3-cinamoil-4-hidroxi-6-metil-2H-piran-2-ona (CHP) na indução de apoptose em células de carcinoma de ovário humano, onde por *Western Blotting*, demonstraram um aumento significativo na expressão de caspase-3, Bax e na liberação de citocromo C, indicando esse composto como um potencial candidato para o tratamento de câncer de ovário humano. O LQB-461 possui em sua estrutura o fragmento cinamoil, desta forma sua atividade promovendo aumento de Bax em células Jurkat pode estar relacionado com este fragmento do LQB.

Outro membro importante da família BCL-2 é a proteína antiapoptótica Bcl-2 que se liga à proteína Bax, inibindo a sua atividade. A proteína Bcl-2 é caracterizada como um inibidor de apoptose e encontra-se superexpressa em diferentes tipos de câncer (Baig *et al.*, 2016; Campbell e Tait, 2018; Nagata, 2018; D'Arcy, 2019; Xu *et al.*, 2019; Dadsena *et al.*, 2021; Obeng, 2021). Em relação à expressão gênica de Bcl-2 (Figura 19B), os resultados adquiridos por PCRq mostraram alterações significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle, em duas das concentrações testadas do LQB-461, com diminuição de 60% na concentração de 3 μM e aumento de 58% na concentração de 5 μM . Ao analisar a proteína Bcl-2 por citometria de fluxo (Figura 20B), a concentração de 5 μM do LQB-461 induziu um aumento significativo ($p < 0,001$), em relação ao controle.

Questionando o porquê da concentração de 3 μM do LQB-461 mostrar diminuição significativa na expressão apenas do gene Bcl-2, mas não da proteína, encontramos na literatura trabalhos mostrando haver diferenças no tempo entre o pico de expressão de RNA mensageiro e o de expressão proteica (Fournier *et al.*, 2010). Desta forma, uma hipótese para explicar essa diferença de expressão entre o RNAm e a proteína Bcl-2 seria o pico de expressão do mRNA na célula, após tratamento com o LQB, ter ocorrido antes do pico de expressão da proteína.

Desta forma, embora frequentemente se espere que os níveis de expressão da transcrição correspondam aos níveis de proteína, a correlação geral entre transcrição e expressão de proteínas muitas vezes é inconsistente. A relação entre esses dois aspectos ainda não foi totalmente compreendida, e pode variar entre tecidos e tipos de células (Fournier *et al.*, 2010; Bauernfeind *et al.*, 2017; Seo *et al.*, 2017).

Contudo, visto que a proteína Bcl-2 atua como inibidora da proteína Bax, foi calculada uma razão entre os níveis das proteínas Bax e Bcl-2, considerando a relação intrínseca entre essas proteínas na indução de apoptose. Vale destacar que este cálculo da razão Bax / Bcl-2 é utilizado usualmente para expressar a relação destas proteínas com a indução de morte por apoptose (Wei *et al.*, 2018; Hong *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019) e, portanto, foi adotado no presente trabalho. Assim, analisando a razão Bax/Bcl-2 (Figura 21), encontramos aumentos significativos desses valores em todas as concentrações testadas, indicando que o LQB-461 promove um aumento da proteína pró-apoptótica Bax em relação à Bcl-2. Na literatura, derivados cinamoil têm demonstrado atividade antitumoral promovendo morte por apoptose através do aumento da razão entre a expressão das proteínas Bax e Bcl-2 (Lan *et al.*, 2015; Maiuthed *et al.*, 2017). O estudo do mecanismo de ação do derivado 3-cinamoil-4-hidroxi-6-metil-2H-piran-2-ona mostrou indução de apoptose em células de carcinoma de ovário humano, através do aumento na expressão de Bax e diminuição de Bcl-2, levando à consequente liberação de citocromo c e ativação de caspase-3 (Lan *et al.*, 2015). Em células de linhagem de câncer de pulmão, o derivado hidroquinona 5-O-cinamoil éster promoveu o aumento da proteína Bax e diminuição de Bcl-2, consequentemente induzindo aumento de expressão do fator indutor de apoptose (AIF) e ativação da caspase-3 e -9, confirmando a indução de morte por apoptose (Maiuthed *et al.*, 2017). Desta forma, estes resultados nos apontam a importância do fragmento cinamoil no mecanismo de ação do LQB-461 em células Jurkat, modulando a expressão das proteínas da família BCL-2.

Além da função anti-apoptótica da proteína Bcl-2, como inibidora da proteína Bax, diversos trabalhos têm mostrado que ela é um importante regulador redox (Susnow *et al.*, 2009; Pohl e colaboradores 2018). O aumento da expressão de Bcl-2 se relaciona de forma intrínseca com a diminuição do estresse oxidativo, com o objetivo de promover a sobrevivência celular. Na indução de apoptose há um aumento do estresse oxidativo na célula, principalmente com o aumento da produção de espécies reativas do oxigênio (ERO). Vale destacar que, na análise de enriquecimento (Tabela 3), os dados selecionados de genes modulados positivamente no ensaio

de microarranjo, no tratamento das células Jurkat pelo LQB-461 a 5 μ M, evidenciaram ativação dos processos metabólicos de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Além disto, em um estímulo intenso de indução de morte por apoptose pode ocorrer o estresse no retículo endoplasmático, com efluxo de íons cálcio para mitocôndria, potencializando ainda mais o estímulo de morte. Já foi descrito que o aumento da proteína Bcl-2 atua, neste caso, como um bloqueador dos canais de efluxo de cálcio do retículo endoplasmático, tentando interromper o processo (Bahar *et al.*, 2016). O aumento de Bcl-2 também pode promover resistência a uma ampla gama de agentes anticâncer e prevenir a morte celular independente de p53 em leucemias (Vazanov *et al.*, 2018). Desta forma, tendo em vista a super expressão observada da proteína Bcl-2 após o tratamento com LQB-461 na concentração de 5 μ M, e sendo esta concentração a mesma observada na indução de morte por apoptose em células Jurkat (~90%), nossos resultados parecem sugerir que, nesta concentração, o LQB-461 parece promover aumento do estresse no retículo endoplasmático, o que leva a superexpressão desta proteína como um mecanismo de proteção e resistência celular, porém não o suficiente para evitar a morte por apoptose.

O quimioterápico etoposídeo também promoveu um aumento significativo na expressão da proteína Bax por citometria de fluxo (Figura 20A), em relação ao controle ($p < 0,001$), na concentração de 0,1 μ M. Contudo, nas mesmas condições de incubação, não houve aumento percentual na expressão do gene *Bax* (Figura 19A), em relação ao controle. Quanto à expressão do gene *Bcl-2* por PCRq (Figura 19B), foi observada uma diminuição significativa de sua expressão, em relação ao controle ($p < 0,001$), porém em relação à expressão da proteína Bcl-2 (Figura 20B), o controle positivo etoposídeo induziu aumento significativo ($p < 0,001$), em relação ao controle, sugerindo também uma tentativa de efeito protetor e de resistência do Bcl-2, de forma similar ao observado com a expressão desta proteína, após tratamento com o LQB-461 a 5 μ M.

Como discutido anteriormente, a relação entre transcrição e tradução não necessita obrigatoriamente apresentar compatibilidade, e dados na literatura mostram diversos trabalhos descrevendo a ação do etoposídeo como promotor da apoptose através da regulação positiva de Bax e regulação negativa de Bcl-2 em células tumorais, inclusive em células de leucemia (Sawada *et al.*, 2000; Floros *et al.*, 2006; Královcová *et al.* 2008; Lee *et al.*, 2010). Na análise da razão Bax/Bcl-2, esse quimioterápico também promoveu um aumento significativo ($P < 0,05$), em relação ao controle na concentração de 0,1 μ M, mostrando indução da via intrínseca de apoptose.

A apoptose é essencial na manutenção da homeostase de um organismo, mas quando esse tipo de morte celular sofre desregulação pode desencadear síndromes linfoproliferativas e câncer (Aguirre *et al.*, 2013; Li e Shively, 2013; Lee *et al.*, 2014; Obeng, 2021). A via extrínseca de apoptose induzida através do receptor de morte Fas (Apo-1 ou CD95) é uma via comumente encontrada em vários tipos celulares, e muitos trabalhos destacam células linfoides, entre elas a célula de linhagem Jurkat, como sendo mais sensíveis à indução de morte através deste receptor de morte (Aguirre *et al.*, 2013; Li e Shively, 2013; Lee *et al.*, 2014). Devido à essa importância e ao destaque que a promoção de apoptose tem demonstrado como mecanismo de ação do LQB-461, foi investigado se esta molécula promoveria alterações na expressão de receptor Fas em membranas de células de leucemia Jurkat.

Nos resultados de microarranjo (Tabela 2), verificamos a modulação de genes que induzem aumento de expressão do receptor Fas, como os genes *THBS1* e *ZDHHC7* (Chen, Baoen *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2017; Ko e Dixon, 2018). Ao analisar pelo ensaio de microarranjo o gene *CD95/TNFRSF6*, que codifica o próprio receptor Fas (Figura 22), observamos um aumento da expressão desse gene na concentração de 3 μ M, mas não observamos alterações na concentração de 5 μ M. Entretanto, na validação da sua expressão por PCRq em tempo real (Figura 23), não foram observadas alterações na expressão desse gene em nenhuma das concentrações testadas.

Devido às possíveis incompatibilidades destacadas anteriormente entre a expressão de RNAm e a síntese proteica, e considerando a importância do receptor Fas na indução de morte em linfócitos, foi analisada a expressão deste receptor por ensaio de citometria de fluxo. Analisando os resultados obtidos (Figura 24), constatamos que o tratamento com LQB-461, na concentração de 5 μ M, induziu um aumento significativo ($p < 0,001$) na expressão de receptor Fas, em relação ao controle.

Tendo observado a presença de duas subpopulações no citograma de tamanho (*FSC*) versus complexidade celular (*SSC*) (Figura 25), nas análises de marcação do receptor Fas por citometria de fluxo, decidiu-se avaliar se uma dessas populações estaria apresentando maior sensibilidade à indução de morte por apoptose, através do receptor Fas, em relação à outra. Para isso, células Jurkat tratadas com o LQB-461 e seu controle positivo foram marcadas, concomitantemente, com anticorpo anti-receptor Fas (PC anti-human CD95) e anexina V-FITC. A anexina V-FITC é uma proteína que se liga e sinaliza a presença de fosfatidilserina quando exposta na face externa da membrana plasmática de células em início de apoptose, sendo um ensaio realizado comumente na investigação desse tipo de morte celular (Liu *et al.*,

2018). Os resultados encontrados (Figura 26) sugerem que as células Jurkat possuem uma população mais sensível à indução de morte via receptor Fas, encontrada a esquerda no gráfico de tamanho vs. granulosidade, em contraposição à outra, posicionada à direita do mesmo gráfico, mais resistente, tanto após o tratamento com o LQB-461 na concentração de 5 μM , quanto ao tratamento com etoposídeo na concentração de 0,1 μM . Esses resultados estão de acordo com a literatura, que descreve exatamente duas subpopulações de células Jurkat, sendo uma mais sensível e outra mais resistente à indução de morte via receptor Fas (Su *et al.*, 1998).

Quanto à relação da estrutura química do LQB-461, Lin e colaboradores (2013) mostraram aumento de expressão de receptor Fas em células de linhagem de hematocarcinoma (HepG2), após tratamento com um composto cinamaldeído. Dutta e Chakraborty (2018) também mostraram compostos cinamaldeídos induzindo aumento de receptor Fas em células de linhagem leucêmica mieloide (K562). Mais uma vez vemos a importância do fragmento cinamoil na ativação da apoptose, sinalizando novamente a importância dessa estrutura no mecanismo de ação do LQB-461 em células Jurkat.

Em relação ao quimioterápico etoposídeo, os ensaios por citometria de fluxo (Figura 24) mostraram um aumento de expressão do receptor Fas na concentração de 0,1 μM . Da mesma forma que para o LQB-461, os resultados por PCRq não mostraram aumento da expressão do gene *CD95/TNFRSF6* de forma significativa, após tratamento na mesma concentração deste padrão (Figura 23). Contudo, os resultados por citometria de fluxo são compatíveis com os resultados encontrados em nossos estudos anteriores, onde o etoposídeo induziu expressivamente ($p < 0,001$) a morte por apoptose em células Jurkat na concentração de 0,1 μM , corroborando resultados da literatura que mostram indução de apoptose via receptor Fas, por este quimioterápico, em diferentes tipos de câncer (Galenkamp *et al.*, 2015; Montecucco *et al.*, 2015).

Dentro do mecanismo de promoção da apoptose, vale destacar a importância das caspases, uma família de endoproteases funcionalmente subdivididas em caspases iniciadoras (caspases 8, 9 e 10) e efetoras (caspases 3, 6 e 7), que desempenham papel essencial nos mecanismos de morte por apoptose, tanto na via intrínseca como na via extrínseca (Lossi *et al.*, 2018; Opdenbosch *et al.*, 2019; D'Arcy, 2019; Xu *et al.*, 2019; Dadsena *et al.*, 2021; Obeng, 2021). Visto que o LQB-461 induziu morte celular envolvendo tanto a via intrínseca como na via extrínseca de apoptose, checamos se a morte por apoptose envolvia a ativação de caspases em células Jurkat, configurando assim a via clássica de apoptose.

No ensaio de microarranjo, podemos ver na Figura 12 que o LQB-461 promoveu aumento de expressão dos genes *PYCARD*, *CPS1-IT1*, *CFHR3*, *THBS1*, *P3H3* e *OTUD1*, descritos na literatura como indutores de caspase-9 e caspase-3 (Okada *et al.*, 2016; Piao *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2017; Xiaoguang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017; Sakaizawa *et al.*, 2018; Liu, Hong *et al.*, 2019; Wu, Lanqin *et al.*, 2019). Dentre estas endoproteases vale destacar a caspase-3, uma importante caspase efetora, que pode ser ativada em ambas as vias intrínseca e extrínseca, sendo a principal executora da apoptose (Lossi *et al.*, 2018; Opdenbosch *et al.*, 2019). Além disso, ainda pelo microarranjo, foram encontradas alterações em diferentes caspases, entre elas os genes *CASP1* e *CASP5*, responsáveis pela codificação de caspase-1 e caspase-5 respectivamente, que possuem relação com a ativação de caspase-3 (Sagulenko *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019).

Tendo visto a importância da caspase-3 no mecanismo efetor de apoptose, seguimos os estudos fazendo ensaios de sua validação. Devido a caspase-3 ser ativada de forma pós-traducional, através de clivagem de sua forma inativa, a procaspase 3 (Sagulenko *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019), a validação da expressão desta caspase foi realizada pela detecção de sua forma ativa por ensaio de citometria de fluxo. Pela análise dos resultados (Figura 27), o tratamento com LQB-461 aumentou 6,5 vezes a expressão de caspase-3 ativa ($p < 0,001$) na concentração de 5 μM , em relação ao controle. Esse resultado corrobora dados observados anteriormente (Thimoteo, 2017) de indução de morte de células Jurkat por apoptose, nesta mesma concentração, evidenciando agora que este processo é caspase dependente. Nossos resultados estão de acordo com o que vem sendo descrito na literatura sobre os derivados cinamoil, que atuam como agentes antitumorais, promovendo morte por apoptose através do aumento de caspase-3 ativa (Lan *et al.*, 2015; Maiuthed *et al.*, 2017).

Em relação ao quimioterápico etoposídeo, este também induziu ($p < 0,001$) a expressão de caspase-3 ativa, com aumento de 14,37 vezes, em relação ao controle, na concentração de 0,1 μM (Figura 27). Esses dados também corroboram resultados prévios de indução de apoptose nas mesmas condições de análise (Thimoteo, 2017). Da mesma forma, está de acordo com diversos trabalhos que descreveram a ação do etoposídeo induzindo apoptose através do aumento de caspase-3 em células tumorais (Sawada *et al.*, 2000; Lee *et al.* 2010; Sverchinsky *et al.*, 2018).

Em estudos anteriores, o LQB-461 mostrou mecanismos diferentes de ação de acordo com a concentração testada, apresentando ação citostática, com inibição da proliferação na concentração de 3 μM , e indutora de morte celular na concentração de 5 μM (Thimoteo, 2017).

Na análise de enriquecimento, realizada com os dados obtidos do ensaio de microarranjo, foram sinalizados diversos processos biológicos relacionados com a proliferação (Tabelas 2, 4 e 7), com resultados significativos ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$). Dentre estes processos, destacamos, na concentração de 3 μM (Tabela 2), a inibição de processos de iniciação da tradução do mRNA, localização da proteína no retículo endoplasmático, direcionamento de proteína, estabelecimento da localização da proteína na membrana, tradução citoplasmática e alongamento traducional. Isto indica a inibição global de tradução proteica na condição estudada. Na concentração de 5 μM , no mesmo protocolo de análise de enriquecimento (Tabela 4), observamos praticamente a inibição dos mesmos processos biológicos, com exceção do alongamento traducional.

Na Tabela 7, onde temos a categorização funcional negativa pelo LQB-461 em ambas as concentrações de 3 e 5 μM , também encontramos diminuição de diversos dos processos biológicos relacionados a proteínas citados acima, referentes as Tabelas 2 e 4. Contudo vale destacar ainda outros processos com modulações negativas, como iniciação traducional e o estabelecimento da localização da proteína no retículo endoplasmático e organelas. Esses resultados nos sugerem que em ambas as concentrações testadas ocorre um comprometimento global de síntese e direcionamento de proteínas após tratamento com o LQB-461.

Continuando os estudos da análise individual de cada gene com aumento ou diminuição de 30% na expressão, em relação ao controle, selecionamos 108 genes envolvidos em diferentes vias de proliferação. Ao analisarmos essas vias, observamos que dentre estes genes, 44 estão relacionados à via PI3K/ AKT/ mTOR e síntese de proteínas, representando aproximadamente 41% desta seleção e constituindo-se a via majoritariamente modulada (Figura 13). Esse dado é interessante pois na literatura o mTOR é descrito como um importante modulador da proliferação e o principal mediador na promoção de síntese de proteínas (Sridharan e Basu, 2020).

Com a análise bibliográfica, na qual encontramos descrita a função biológica destes 44 genes, foi construído um fluxograma onde mostramos as modulações dos genes da via PI3K/ AKT/ mTOR na concentração de 3 μM (Figura 14A) e de 5 μM (Figura 14B). Podemos observar na Figura 14A diversos genes como *KL*, *CFHR3*, *INPP4B*, *FGF14*, *TMEM106A* e *SLC25A5-AS1*, descritos na literatura como sendo inibidores do complexo PI3K (Vo e Fruman, 2015; Chen *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018; Xuan e Hai, 2018; Arbel Rubinstein *et al.*, 2019; Li, Xiwen *et al.*, 2019; Liu, Hong *et al.*, 2019; Liu e Zhu, 2019; Peshes-yeloz *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2019; Pako *et al.*, 2020; Su *et al.*, 2020), com aumento de expressão após tratamento com

o LQB-461 a 3 μ M, em relação ao controle. Na mesma imagem, vemos outro grupo de genes formados por *SHFM1*, *HMGB1*, *TATDN1*, *HYOU1*, *CST1* e *NCL*, descritos como ativadores da via PI3K/ AKT (Bonache *et al.*, 2013; Tamilzhalagan *et al.*, 2015; Chen e Xu, 2016; WU *et al.*, 2016; Zequn *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016; He *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019; Liu e Yao, 2019; Lv *et al.*, 2019; Romano *et al.*, 2019; Xu, Tianwei *et al.*, 2019; Yu. *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019), com diminuição de expressão após tratamento com o LQB-461 a 3 μ M, quando comparados ao controle. Ainda em 3 μ M (Figura 14A) observamos o aumento na expressão de genes descritos como inibidores da AKT, (*Sox6*, *HPGD*, *miR-215*, *miR-101-2*, *miR-126* e *MT1H*), em relação ao controle, assim como diminuição na expressão dos genes *PDPK1* e *DDT*, importantes indutores da AKT (Ericson *et al.*, 2010; Qin *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2016; Wang, J. *et al.*, 2016; Cai *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2018; Leblanc *et al.*, 2018; Wang, Cen Zhu *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2019).

Também foram encontrados superexpressos após tratamento em 3 μ M (Figura 14 A) os genes *MsrA*, *MAGI3*, *AZGP1* e *PAX8-AS1*, conhecidos por promoverem aumento da expressão de PTEN, um dos principais inibidores da via PI3K/ AKT/ mTOR (Figura 14A) (De Luca *et al.*, 2010; Choi e kim, 2011; Ma *et al.*, 2015; Jiang e Moskovitz, 2018; Tian *et al.*, 2018; Yu, Xiaolan *et al.*, 2018). Em relação ao mTOR, podemos ver na Figura 14A um aumento na expressão de *FA2H* e *DEPDC5*, inibidores de mTORC1, em relação ao controle (Dai *et al.*, 2019; Padi *et al.*, 2019; Yao *et al.*, 2019), e diminuição de *DGKZ*, um indutor deste mesmo complexo (Torres-Ayuso *et al.*, 2015; Yu, Wenxi *et al.* 2019). Além disso, observamos diminuição de expressão do gene *ACSL3* (Figura 14A), cuja tradução é ativada por mTOR e está relacionada com aumento da proliferação e resistência a quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer (Tang, Yue *et al.*, 2018; Sebastiano e Konstantinidou, 2019; Saliakoura *et al.*, 2020). Esses resultados sugerem que um dos mecanismos de ação do LQB-461 seja atuando inibindo vias de proliferação, entre elas a via PI3K/ AKT/ mTOR.

Continuando a análise da proliferação do tratamento do LQB-461 na concentração de 3 μ M (Figura 14A), os genes *FAM83B*, *MME* e *OCLN*, conhecidos por induzirem o aumento da via PI3K/ mTOR, (Cipriano *et al.*, 2013; Eguchi *et al.*, 2018; Liu, Xue Ling *et al.*, 2019) encontram-se superexpressos. Contudo, estudos na literatura demonstraram haver relação destes genes com perfis de resistência celular e resistência a quimioterápicos (Cipriano *et al.*, 2013; Eguchi *et al.*, 2018; Liu, Xue Ling *et al.*, 2019). Da mesma forma, na Figura 14A, podemos observar genes superexpressos que são descritos como ativadores de AKT e mTOR, e também promotores de resistência à quimioterápicos em diversos tipos de câncer, como *GAS6* e *TRIM44*

(Janning *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2016; Baumann *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2019). Além disto, nesta mesma concentração (Figura 14A), observamos a diminuição de expressão do gene *miR-149*, um conhecido inibidor de AKT (Grieco *et al.*, 2017; He *et al.*, 2018; Sánchez-González *et al.*, 2020). Estudos demonstraram que o *miR-149* aumenta a sensibilidade a quimioterapia e sua diminuição está relacionada à resistência tumoral (He *et al.*, 2018). Nos resultados da análise de enriquecimento (Tabela 1) também encontramos aumento de sinalização de proteína quinase B ($p < 0,01$), o que pode estar relacionado ao aumento destes genes relacionados a resistência acima descritos. Esses resultados sugerem que o LQB-461, na concentração de 3 μM , promova não apenas uma possível inibição de vias de proliferação, mas também induza um perfil de resistência em células Jurkat. Isto chama a atenção para a determinação da dose ideal no tratamento das leucemias, visto que o desenvolvimento de mecanismos de resistência, que ocorrem com frequência neste tipo de câncer, pode estar relacionado à indução de processos celulares adversos, o que precisa ser melhor investigado.

Na análise dos genes modulados após o tratamento com o LQB-461 a 5 μM (Figura 14B), encontramos o mesmo perfil de modulação que o tratamento com 3 μM (Figura 14 A), contudo com uma menor intensidade na expressão dos referidos genes. Como discutido anteriormente, essa redução de expressão pode ser pela expressiva indução de apoptose promovida pelo LQB-461 nessa concentração (Thomas *et al.*, 2015, Thimoteo, 2017). Contudo, vale ainda destacar alterações importantes em genes envolvidos na via PI3K/ AKT/ mTOR, encontradas no ensaio de microarranjo apenas na concentração de 5 μM . Primeiramente, encontramos um aumento na expressão do gene *ASS1* (Figura 14B), em relação ao controle e à concentração de 3 μM (Figura 14A), descrito na literatura como um ativador epigenético (por metilação de histonas) da expressão de DEPTOR um inibidor importante de um dos complexos mTOR, o complexo mTORC1 (Ohshima *et al.*, 2017).

Outro ponto em destaque na concentração de 5 μM é a diminuição da expressão de todos os genes ligados a resistência, modulados positivamente na concentração de 3 μM do LQB-461. Essa diminuição poder estar relacionada à apoptose intensa e consequente degradação global de RNAm, ou representar mecanismos no qual o LQB nesta concentração consegue superar as barreiras de resistência celular e induzir a apoptose. Vale destacar que a via PI3K / AKT/ mTOR tem forte relação com os mecanismos de resistência celular a fármacos (Gremke *et al.*, 2020). Desta forma, o aumento do gene *ASS1*, descrita no parágrafo anterior, e a diminuição destes genes ligados à resistência podem estar relacionados ao mecanismo de ação do LQB-461 a 5 μM . Na literatura, derivados de cinamaldeídos e benzaldeídos têm sido

descritos como moléculas capazes de transpor barreiras celulares de resistência, sendo eficazes no tratamento de diversas doenças, inclusive o câncer (Banerjee *et al.*, 2016; Bhat *et al.*, 2017, Wang, Shixiang *et al.*, 2018), indicando novamente a importância destes grupamentos no efeito antileucêmico do LQB-461.

Sabendo-se da importância do mTOR como mediador da proliferação e síntese de proteínas (Sridharan e Basu, 2020), e com base nos resultados obtidos pelo microarranjo, realizamos ensaios de imunomarcagem para validar a expressão de mTOR após tratamento de células Jurkat com o LQB-461 (Figura 28). Infelizmente, devido à pandemia, temos apenas os resultados preliminares, que indicam uma inibição da ativação do mTOR com o tratamento pelo LQB-461 a 3 μ M (n=2), sinalizando novamente um mecanismo de ação do LQB-461 sobre esta via. Na literatura, o composto antitumoral Amygdalin, que possui em sua composição uma porção benzaldeído, é descrito como um eficiente inibidor da via PI3K/ AKT/ mTOR (Shi *et al.*, 2019), sinalizando uma possível relação estrutura/atividade para esse grupamento presente no LQB-461.

Ainda envolvendo o mTOR, existe a ativação de importantes intermediários que disparam o processo de tradução proteica realizada pelos ribossomos, dentre estes a proteína S6KP70 (Sridharan e Basu, 2020). Na Figura 14, além do aumento da expressão do gene *FA2H*, um inibidor de S6K, observamos que o LQB-461 a 3 μ M (Figura 14A) e 5 μ M (Figura 14B) inibiu a expressão de diversos genes chaves da tradução de proteínas pelos ribossomos, como *EIF3M*, *WDR74*, *RPL35*, *RPS9*, *RPL21* e *RPL11* (Lindström e Nistér, 2010; Goudarzi e Lindström, 2016; Cheng *et al.*, 2017; David-West *et al.*, 2018 ; Liu, Pei Y. *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020), com exceção dos genes *eEF1A1* e *eIF4B*, que se encontram subexpressos somente na concentração de 5 μ M (Figura 14B). Estes dois últimos genes estão fortemente relacionados à progressão e resistência tumoral, e muitas vezes são encontrados expressos constitutivamente em células cancerosas (Chen, Ke *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Chen, Shi Lu *et al.*, 2018; Kapadia *et al.*, 2018; Howard *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2020).

Com o objetivo de investigar esta via e validar a importância da modulação da proteína S6KP70, como possível mecanismo de ação do LQB-461, foi realizada a marcação desta proteína por *Western Blotting*. Devido à pandemia e consequente impossibilidade de experimentos presenciais, não foi finalizado o número amostral pretendido. Contudo, nos resultados preliminares (Figura 29), o LQB-461 parece induzir em células Jurkat (n = 1) o aumento da expressão de S6KP70 nas concentrações de 2 μ e 3 μ M (50% e 44% respectivamente) e inibir a expressão em 5 μ M (58%), em relação ao controle. É importante

destacar que a proteína S6KP70 possui diferentes isoformas (*RPS6KA2*, *RPS6KC1* e *RPS6KB1*), sendo a S6K1 a principal isoforma ativada pelo mTOR e envolvida na promoção da síntese proteica (Sridharan e Basu, 2020). Na análise molecular obtida nos ensaios de microarranjo encontramos a expressão dessas três isoformas (Figura 30), sendo que em 3 μ M houve aumento na expressão de 2 isoformas (*RPS6KA2* e *RPS6KC1*), e apenas a isoforma *RPS6KB1*, responsável pela transcrição da proteína S6K1, apresentou-se com expressão diminuída (- 17% e - 21%, em 3 μ M e 5 μ M, respectivamente). Dessa forma, o aumento encontrado na Figura 29 da proteína S6KP70 após tratamento nas concentrações de 2 μ M e 3 μ M pode ser relativo ao aumento das isoformas *RPS6KA2* e *RPS6KC1* (Figura 30). Na concentração de 5 μ M estas isoformas têm sua expressão reduzidas no microarranjo, alcançando níveis similares ao controle (Figura 30), o que pode estar contribuindo para a redução da expressão observada no *Western Blotting* com 5 μ M (Figura 29). No entanto, chama atenção a diminuição na expressão da isoforma *RPS6KB1* na contribuição da para a redução na expressão proteica demonstrada por *Western Blotting* com 5 μ M. Comparando esses resultados com dados da literatura sobre derivados benzaldeídos, encontramos diversos estudos apresentando como mecanismo de ação a inibição da síntese de proteínas em células tumorais (Pettersen *et al.*, 1991, 1993; Dunsaed *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 2019). Esses dados sugerem a importância do fragmento benzaldeído na ação antiproliferativa do LQB-461 em células Jurkat.

Ainda relacionada à via de proliferação PI3K/ AKT/ mTOR, foi realizada uma análise da expressão da proteína RB1, importante inibidor desta via e marcador da inibição de proliferação e (Xie *et al.*, 2017). Devido à impossibilidade de finalizar os ensaios presencialmente, foram apresentados apenas resultados preliminares (n=1) na Figura 31. Os resultados sugerem que o LQB-461 induz a expressão da proteína RB1 em células Jurkat, após tratamento nas concentrações de 2 μ e 3 μ M (160% e 44%, respectivamente), e inibe em 5 μ M (70%). Esses resultados são promissores (se confirmados), uma vez que estão de acordo com a nossa hipótese de que o LQB-461, nas menores concentrações testadas, promova diminuição da proliferação, via inibição da via PI3K/ AKT/ mTOR, e inibição da síntese de proteínas além de sugerirem participação da RB1 no seu mecanismo de ação. Já na concentração de 5 μ M, a ativação de apoptose parece ser o principal mecanismo de ação do LQB-461 em células Jurkat. Entretanto, o processo de apoptose também parece ter relação com a via PI3K/ AKT/ mTOR, pois a sinalização Akt / mTOR desempenha um papel vital no processo de apoptose de células tumorais. A ativação desta via parece inibir a liberação de fatores estimuladores de apoptose da mitocôndria, levando à ativação de proteínas antiapoptóticas (como Bcl-2), e inibição de

algumas proteínas pró-apoptóticas (como Bax e caspase-3) (Long *et al.*, 2020). Além disso, a diminuição da expressão da proteína S6KP70, do gene *RPS6KB1* e os resultados de diminuição global de proteínas podem ter relação com o aumento da expressão da razão Bax/Bcl-2 e ativação de caspase-3, com consequente apoptose, na concentração de 5 μ M.

O etoposídeo, um quimioterápico utilizado para o tratamento de diversos tipos de câncer, inclusive as leucemias, (Walsby *et al.*, 2011; Mahbub *et al.*, 2015; Zhuang *et al.*, 2015), e a rapamicina, um conhecido inibidor da via PI3K/ AKT/ mTOR (Podshivalova *et al.*, 2018), foram utilizados como controle positivo nos experimentos. Ao analisar a razão mTOR-P/mTOR (Figura 28), os resultados preliminares sugerem que o tratamento de células Jurkat com a rapamicina (0,1 μ M) reduz a forma fosforilada de mTOR (63%), em relação ao controle, confirmando dados na literatura, os quais mostram seu efeito inibidor sobre mTOR, inclusive em leucemias linfocíticas agudas (Podshivalova *et al.*, 2018). Já o quimioterápico etoposídeo (Figura 28) parece promover o aumento (127%) da razão mTOR-P/mTOR em células Jurkat, sugerindo ativação do mTOR. Dados da literatura mostram aumento de ativação da via do mTOR em leucemia, após tratamento com o etoposídeo, relacionando esse perfil com resistência celular e sobrevivência (Xu *et al.*, 2005). Estudos recentes também relacionaram o aumento de expressão do mTOR fosforilado com mecanismos de resistência tumoral a quimioterápicos (Gremke *et al.*, 2020). Contudo, estudos anteriores demonstraram que esta mesma concentração do etoposídeo induz morte por apoptose em células Jurkat (Thimoteo, 2017). Desta forma, mesmo se confirmado o aumento de ativação do mTOR após tratamento com o etoposídeo, esta alteração não parece não ter relação ou interferir no efeito citotóxico promovido por esse fármaco,.

Quanto à expressão da S6KP70 (Figura 29), os quimioterápicos etoposídeo e rapamicina tendem a aumentar (71% e 57%, respectivamente) sua expressão em células Jurkat (n=1) nas condições estudadas. Contudo, como discutido anteriormente, a proteína S6KP70 possui diferentes isoformas, sendo a S6K1 a principal isoforma ativada pelo mTOR e envolvida na promoção da síntese proteica (Sridharan e Basu, 2020). Além disso, estudos da literatura descreveram a ativação da proteína S6kp70 em células de leucemia após tratamento com o etoposídeo, relacionando esse aumento com a resistência tumoral (Xu *et al.*, 2005). Em alguns destes estudos esta resistência do tumor foi relacionada à ativação da via do mTOR (Xu *et al.*, 2005; Gremke *et al.*, 2020).

No câncer, alterações dos mecanismos epigenéticos de modulação da expressão gênica estão relacionados com a apoptose e a proliferação (Aydin e Kalkan, 2020; Akone *et al.*, 2020).

Histonas Desacetilases (HDACs), Histonas Acetiltransferases (HATs) e DNA Metiltransferases (DNMTs) representam os principais mecanismos de controle epigenético. As DNMTs transferem grupos metil para o DNA e as HDACs catalisam a remoção de grupos acetil de histonas, ambos os processos estão associados à repressão transcricional. As histonas acetiltransferases (HATs), transferem grupos acetil para as histonas, podendo promover silenciamento ou ativação de genes (Aydin e Kalkan, 2020).

Na categorização funcional dos genes pelo microarranjo, podemos observar a inibição de processos biológicos de regulação da expressão gênica e epigenética na concentração de 3 μM (Tabela 2), além da inibição de processos biológicos de processamento de ncRNAs, tanto em 3 μM como em 5 μM (Tabelas 2, 4 e 7). Interessantemente, estudos recentes mostram a modulação epigenética de ncRNAs atuando como importantes na regulação de enzimas epigenéticas, como HDACs, HATs e DNMTs (Zhou *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2020). Contudo, através da análise individual dos genes, também pelo microarranjo (Figura 32), foram observados aumentos na expressão, em relação ao controle, dos genes destas famílias, como o *HDAC11* (24%) e o *DNMT3B* (16%), após tratamento com o LQB-461 a 3 μM . Na concentração de 5 μM , o LQB-461 aumentou a expressão apenas do gene *HDAC11* (17%), em relação ao controle, sendo observada uma redução de 7% neste gene, em relação a concentração de 3 μM . De acordo com a literatura, a regulação positiva de HDACs, DNMTs e HATs está fortemente relacionada com a resistência celular (Aydin e Kalkan, 2020; Akone *et al.*, 2020). Desta forma, o aumento da expressão desses genes na concentração de 3 μM , com consequente redução desse aumento após tratamento com 5 μM , pode ter relação com a hipótese de uma possível resistência das células Jurkat à morte por apoptose pelo tratamento com LQB-461 nas menores concentrações testadas.

Além disto, observa-se um leve aumento (14%) de *p300* (uma HAT), após tratamento com LQB-461 a 3 μM (Figura 32), o qual é descrito na literatura como promotor da ativação de p21, independente de p53 (Parveen *et al.*, 2016.). Este aumento de *p300*, embora leve, pode estar envolvido na expressão (Figuras 17 e 18) aumentada tanto do gene *CDKN1A* (que codifica o p21) quanto da proteína p21 (Thimóteo, 2017), induzida pelo tratamento de células Jurkat com o LQB-461.

Em relação ao estudo da estrutura química-atividade, Zagni e colaboradores (2019) mostraram diversos derivados cinamoil com propriedades inibidoras sobre HDACs e atividade antiproliferativa contra a linhagens de células tumorais de neuroblastoma. É interessante essa correlação, pois na composição do LQB-461 existe um fragmento cinamoil, e Zagni e

colaboradores (2019) descrevem uma ação antiproliferativa, também observada com o LQB-461 (Thimóteo, 2017). apesar da ação inibidora de HDACs.

A autofagia tem papel importante no equilíbrio apropriado entre anabolismo e catabolismo, podendo estar associada ao processo de morte por apoptose e ao processo de sobrevivência celular (Sun, 2016; Qian *et al.*, 2017; Antunes e colaboradores, 2018; Jacomin *et al.*, 2018). Quando desregulado, este processo tem mostrado forte associação a uma vasta gama de patologias humanas, entre elas o câncer, incluindo as leucemias (Antunes *et al.*, 2018; Jacomin *et al.*, 2018). A autofagia pode ocorrer em níveis basais, em condições fisiológicas, e também ser regulada em resposta a danos no DNA, estímulos estressantes e agentes citotóxicos, como quimioterápicos. Esse processo é regulado rapidamente sob condições adversas, buscando reciclar energia e fornecer macromoléculas para a biossíntese, levando as células a se adaptarem ao estresse, buscando a sobrevivência, e muitas vezes encontra-se ligada à resistência tumoral (Sun, 2016; Qian *et al.*, 2017; Antunes e colaboradores, 2018; Jacomin *et al.*, 2018).

Embora o papel inicial da autofagia seja contribuir para a sobrevivência celular, em certas condições, ela pode levar à morte, processo denominado morte celular autofágica, e ocorre quando há degradação excessiva das proteínas e organelas necessárias, levando à apoptose. Nas células neoplásicas, a autofagia foi previamente descrita como estando relacionada à apoptose induzida por estresse do retículo endoplasmático. Portanto, a autofagia é um processo altamente regulado que tem um papel duplo: na morte ou sobrevivência celular (Sun, 2016; Qian *et al.*, 2017; Antunes e colaboradores, 2018; Jacomin *et al.*, 2018).

Na análise de enriquecimento do ensaio de microarranjo observamos um aumento do processo de organização para projeção de membrana ($p < 0,05$) após tratamento na concentração de 3 μM do LQB-461 em células Jurkat (Tabela 2). No estudo individual dos genes que atuam na autofagia com aumento ou diminuição de expressão superior a 30% em relação ao controle, destacamos 3 genes relacionados com a modulação da proliferação envolvidos com a resistência celular e 1 gene relacionado com a apoptose (Figura 15). Através da análise bibliográfica, na qual encontramos descrita a função biológica destes 5 genes relacionados a autofagia, foi construído um fluxograma que podemos observar na Figura 16.

Nos resultados apresentados na Figura 16A e 16B, observamos a participação do gene *CDK1NA*, que codifica a proteína p21, atuando na promoção de apoptose. Contudo, esse gene possui múltiplas funções no metabolismo celular, dentre estas a modulação positiva da macroautofagia (Kreis *et al.*, 2019). Vimos um aumento de expressão do respectivo gene de 25% e

24%, após tratamento com o LQB-461 a 3 μ M e 5 μ M, respectivamente, tendo suas validações já discutidas anteriormente. O p21 é descrito como ativador de autofagia relacionada a aceleração de morte celular em células tumorais (Kreis *et al.*, 2019). Após tratamento na concentração de 3 μ M, o LQB-461 aumentou a expressão do gene *SNX18* (32%), um promotor da formação de autofagossomos em células de mamíferos. O gene *SNX18* foi identificado como um regulador positivo de autofagia, modulando o tráfego de ATG9A de endossomos de reciclagem, sendo crucial na formação de membranas precursoras de autofagossomo, as quais são positivas para ATG16L1 e WIPI2 (Bendris e Schmid, 2017; Sørensen *et al.*, 2018).

Também pode ser visto na Figura 16B uma diminuição de expressão do gene *HSPA8* (-34%), após tratamento com o LQB-461 na concentração de 5 μ M. Na literatura, este gene é descrito como um regulador positivo crucial da autofagia, principalmente na autofagia mediada por chaperonas, que está relacionada à resistência, e o silenciamento de *HSPA8* parece inibir significativamente a viabilidade celular (Tian *et al.*, 2018; Xiang *et al.*, 2018; Bonam *et al.*, 2019). Também observamos diminuições de 82% e 18% na expressão do gene *HMGB1*, após os tratamentos com LQB-461 a 3 μ M e 5 μ M, respectivamente (Figuras 32 A e 32B, respectivamente). Estudos recentes demonstraram que a autofagia induzida por *HMGB1* exerce funções múltiplas em vários tipos de câncer, como na indução da proliferação associado a PI3K/Akt, fator nuclear- κ B e MAPK (ERK1/2). Portanto, a inibição da autofagia induzida por *HMGB1*, por redução na expressão do referido gene, como observado com o LQB-461, pode reverter a quimiorresistência, sensibilizando a célula tumoral ao agente citotóxico (He *et al.*, 2017; Lv *et al.*, 2019).

Vemos que as modulações dos genes ligados à autofagia, até então discutidos, mostram uma ação do LQB-461 de indução de apoptose e na inibição de genes promotores da autofagia relacionados a resistência celular. Entretanto, também observamos um aumento de 38% na expressão do gene *FAM83B*, após o tratamento com LQB-461 a 3 μ M (Figura 16 A) e uma expressão menor deste mesmo gene com LQB-461 a 5 μ M (16%) (Figura 16B). Este gene é um promotor da proliferação e metástase de células cancerígenas endometriais, que inibe a apoptose e a autofagia, e promove aumento da ativação da via PI3K/ AKT /mTOR, recebendo destaque como um novo oncogene, pelo seu envolvimento com esta via. Membros da família *FAM83* superexpressos ou desregulados são descritos como reguladores principais de transformação (crescimento, proliferação e metástase celular) e resistência a terapias de diversos tipos de câncer (Cipriano *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2019). Relacionando estas informações com os efeitos do LQB-461, podemos sugerir que o aumento da expressão deste gene em 3 μ M

possa contribuir para os mecanismos de resistência apresentados no tratamento com esta concentração, o que pode ser observado pela ausência de apoptose das células Jurkat. Entretanto, a diminuição da expressão do gene *FAM83B*, observada com o tratamento a 5 μM , em relação à expressão apresentada com o LQB-461 a 3 μM , pode ter contribuído para que os mecanismos de resistência fossem ultrapassados, levando à ativação do processo de apoptose, observada nesta concentração.

Ainda no ensaio de microarranjo, na tabela de GDEs, encontramos alguns genes relacionados à autofagia, com percentual de alteração menor que 30%, mas que são interessantes para nossa discussão. Observamos um aumento de 25% na expressão do gene *ATG16L2*, após tratamento de células Jurkat com LQB-461 na concentração de 3 μM . Esse gene codifica uma segunda isoforma Atg16L, com a capacidade de formar um complexo com Atg5, conjugado ao Atg12 *in vivo*, e na lipidação de LC-3 *in vitro* (Ishibashi *et al.*, 2011). Nesta mesma concentração de LQB-461 (3 μM), também observamos um aumento de 15% na expressão dos genes *RUBCN* e *ATG4A*. Na via da autofagia, em que a fagocitose está associada à LC3 (LAP), é necessário que a proteína seja transcrita pelo gene *RUBCN* para que ocorra uma degradação ideal do alvo fagocitado (Feliciano *et al.*, 2017). A proteína codificada pelo gene *ATG4A*, um membro da família das cisteínas proteases, também desempenha um papel importante na autofagia. A expressão aumentada de ATG4A foi observada induzindo a autofagia em eritroblastos humanos. Além disso, foi demonstrado que no câncer de pulmão de pequenas células, o ATG4A participou da resistência ao etoposídeo (VP16) e à cisplatina (DDP) (Wolf *et al.*, 2013; Fernández e Otín, 2015; Yang *et al.* 2016).

Também foi observado um aumento de 11% do gene *ATG12*, também na concentração de 3 μM . A proteína codificada pelo gene *ATG12* é um mediador crítico da autofagia que impulsiona esse processo, formando um complexo covalente com proteínas, como o ATG5. Em células tumorais, a regulação positiva de ATG12 parece estar relacionada com a indução de apoptose (Yoo *et al.*, 2018). No tratamento de células Jurkat, com o LQB-461 na concentração de 5 μM , os genes *ATG16L2*, *RUBCN*, *ATG4A* e *ATG12* mostraram redução, quando comparado a concentração de 3 μM , mostrando valores similares ao controle não tratado.

Reunindo os resultados observados, vemos como é complexa a modulação dos genes relacionados a autofagia após tratamento com o LQB-461 em células Jurkat. Na concentração de 3 μM , encontramos principalmente um aumento na expressão de genes promotores da autofagia, alguns descritos apenas como ferramentas do mecanismo autofágico (*SNX18*,

ATG16L2 e *RUBCN*), outros relacionados com a promoção de apoptose (*CDKN1A* e *ATG12*), e ainda outros descritos estarem relacionados com a resistência celular (*ATG4A* e *FAM83B*). Encontramos diminuição de expressão em relação ao controle apenas do gene *HMGB1*. Na concentração de 5 μM o perfil é diferente, além do menor número de genes modulados, observamos aumento de expressão em relação ao controle de apenas um gene promotor da autofagia relacionada à apoptose (*CDKN1A*), e um gene promotor da autofagia relacionada a resistência (*FAM83B*), e observamos diminuição de expressão de dois genes relacionados a promoção da autofagia que induzem resistência celular (*HSPA8* e *HMGB1*), em relação ao tratamento com a concentração de 3 μM . As alterações nestes genes, induzidas pelo LQB-461 a 3 μM , sugerem que os mesmos possam estar envolvidos no processo de autofagia e resistência da célula Jurkat à apoptose, observada com essa concentração, enquanto a apoptose é observada no tratamento com 5 μM (Figura 26; Figura 27; Thimoteo, 2017).

Buscando avaliar e validar se haveria promoção da autofagia após tratamento do LQB-461 em células Jurkat, foi feita a marcação da proteína LC-3a (Figura 33), forma ativa da proteína LC-3, descrita na literatura como um marcador importante da autofagia (Antunes *et al.*, 2018; Lee, 2018; Yu *et al.*, 2018). O LQB-461 mostrou promover aumento da expressão de LC3-a (96%), em relação ao controle, após tratamento na concentração de 2 μM , já em 3 μM ocorre uma redução (44 %) significativa ($p < 0,01$), em relação a concentração de 2 μM , onde os níveis de LC3a alcançam valores similares ao controle. Na concentração de 5 μM , o LQB mostrou promover uma diminuição significativa ($p < 0,01$) de 93 %, em relação ao controle da expressão deste marcador. Vale destacar que também observamos uma redução significativa (93%) dos níveis de expressão de LC3a, quando comparamos a concentração de 5 μM em relação à 3 μM , demonstrando um efeito dose dependente. Comparando nossos resultados com os da literatura, diversos trabalhos têm demonstrado derivados cinamoil e benzaldeído induzindo autofagia, inclusive em células de leucemia (Yan *et al.*, 2007; Kishino *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2019), sinalizando a importância destes fragmentos da estrutura do LQB-461 no mecanismo de ação em células Jurkat.

Os resultados da autofagia nos trazem a complexidade e multiplicidade de mecanismos de ação com os quais o LQB-461 promove o seu efeito em células Jurkat. Observamos respostas que conciliam a indução da autofagia com os estímulos de apoptose, bem como induções e inibições de genes da autofagia relacionados aos mecanismos de resistência e sobrevivência celular. Com relação ao etoposídeo, a ação deste quimioterápico na autofagia mostra variações

de efeitos em diferentes tipos de câncer (Montecucco *et al.*, 2015). No nosso estudo, este fármaco não mostrou a LC3a como promotor autofágico nas células Jurkat.

Parece existir, com base nos resultados obtidos ao longo deste trabalho, a indução tanto de mecanismos inibidores da proliferação e indutores de morte celular, como mecanismos de resistência e citoproteção. Sendo a autofagia um mecanismo dual, que pode atuar tanto como um instrumento de citoproteção, como um instrumento potencializador da promoção de morte (Sun, 2016; Qian *et al.*, 2017; Antunes e colaboradores, 2018; Jacomin *et al.*, 2018), vemos espelhados nos resultados de seus ensaios a grande complexidade do efeito antileucêmico do LQB-461. De uma forma mais geral, apesar da complexa modulação da autofagia promovida pelo LQB, observamos uma ativação desse processo na concentração do LQB de 3 μM , sugerindo sua importância para o desenvolvimento do efeito citostático observado, e possível função no mecanismo de resistência das células Jurkat à apoptose. No tratamento com 5 μM , observamos uma diminuição geral do processo autofágico, possivelmente relacionado com a inibição de mecanismos de resistência celular, acarretando, junto com a indução de mediadores da via intrínseca e extrínseca, a ativação da apoptose.

Na Tabela 1, onde encontramos diversos processos biológicos regulados positivamente de forma significativa ($p < 0,05$), após tratamento com o LQB-461 na concentração de 3 μM , é interessante observar uma série de processos relacionados à resistência da célula a fármacos, como por exemplo o aumento do processo catabólico de drogas ($p < 0,01$), e da resposta à estímulos xenobióticos ($p < 0,05$). Ao ser exposto ao estresse xenobiótico induzido por um fármaco, a célula busca uma adaptação rápida e apropriada, regulando uma série de famílias de genes e vias moleculares, as quais foram desenvolvidas durante a evolução para desintoxicar e eliminar toxinas, reparar danos químicos e buscar reestabelecer a homeostase celular. A resposta a estímulos xenobióticos constitui a primeira linha de defesa química celular e está relacionada com perfis de resistência tumoral a quimioterápicos (Cort *et al.*, 2016). Da mesma forma, processos catabólicos de drogas induzem a degradação de um fármaco, promovendo sobrevivência e resistência tumoral (Russi *et al.*, 2019). A autofagia também é um processo catabólico que, em resposta a condições de estresse, leva ao engolfamento, digestão e reciclagem de componentes intracelulares para sustentar a sobrevivência celular (Sun, 2016; Qian *et al.*, 2017; Antunes e colaboradores, 2018; Jacomin *et al.*, 2018; Russi *et al.*, 2019).

Ao compararmos os efeitos obtidos com o tratamento com 3 μM de LQB-461 com os obtidos com 5 μM (Tabela 3), encontramos diversos processos relacionados à resistência celular regulados positivamente, como a resposta a estímulos xenobióticos ($p < 0,05$), a agentes

antineoplásicos ($p < 0,01$), a substâncias tóxicas ($p < 0,01$), resposta celular à droga ($p < 0,05$), à radiação ($p < 0,05$) e ao Fator Inibidor de Leucemia ($p < 0,05$). Todos esses processos biológicos possuem forte relação com a resistência tumoral à fármacos, e diversos estudos buscam entender seus mecanismos e desenvolver terapias alvos que consigam transpor essa resistência (Ferreira *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2018; Bukowski *et al.*, 2020; Wrona *et al.*, 2021).

É importante destacar a importância do Fator Inibidor de Leucemia, que é um promotor da via PI3K/ AKT/ mTOR, e promove resistência a diversos fármacos utilizados no tratamento de diversos tipos de câncer, inclusive leucemias, sendo um de seus mecanismos a resistência à morte celular por apoptose (Wrona *et al.*, 2021). Desta forma, apesar de observar todos esses mecanismos de resistência modulados positivamente pelo LQB-461, podemos considera-lo promissor desde que é capaz de induzir mecanismos citostáticos, com diminuição da proliferação, e na maior concentração (5 μM) consiga ultrapassar esta barreira de resistência, induzindo de forma tão expressiva a apoptose por ambas as vias, intrínseca e extrínseca.

Além disto, vale destacar que, em grande parte dos ensaios realizados, nosso objeto de estudo, o LQB-461, obteve resultados tão significativos quanto os obtidos pelo nosso controle positivo, o etoposídeo. Este quimioterápico é um inibidor da DNA topoisomerase II, o que acarreta diversos danos no DNA levando à morte celular por apoptose (Navakauskienė *et al.*, 2002; Karpinich *et al.*, 2006; Walsby *et al.*, 2011; Mahbub *et al.*, 2015; Zhuang *et al.*, 2015). Apesar do etoposídeo ser um fármaco tradicionalmente utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo leucemias (Walsby *et al.*, 2011; Mahbub *et al.*, 2015; Zhuang *et al.*, 2015), o que justificou sua utilização como controle positivo neste trabalho, diversos estudos relatam resistência tumoral a este fármaco, inclusive no tratamento das leucemias (Schroeder *et al.*, 2003; Asano *et al.*, 2005; Styczynski *et al.*, 2007; Lawson *et al.*, 2011; Walsby *et al.*, 2011). Além disso, alguns estudos relacionam a reincidência de leucemia após o tratamento do câncer com o etoposídeo (Kudo *et al.*, 1998; Ezoe, 2012).

Desta forma, ao longo deste estudo, o LQB-461 mostrou promover diferentes mecanismos de ação, variando principalmente com a concentração de LQB-461 utilizada no tratamento das células de leucemia Jurkat. Na concentração de 3 μM , o LQB promove um efeito citostático *in vitro*, com inibição da proliferação e redução global de síntese de proteínas, e os resultados preliminares sugerem que a via PI3K/ AKT/ mTOR seja alvo desta molécula. Na maior concentração, de 5 μM , além da modulação da proliferação, o principal mecanismo de ação do LQB-461 é através da indução de morte celular *in vitro*, em que demonstrou promover

ativação de apoptose dependente de caspase, envolvendo tanto a via extrínseca, com aumento do receptor Fas, quanto a via intrínseca pela modulação de proteínas da família Bcl-2.

Além disso, essa indução de morte parece ser promovida pela via p21 independente de p53, cuja regulação negativa está usualmente relacionada com o perfil de resistência a múltiplas drogas (MDR), o que torna o LQB-461 uma molécula promissora como um futuro fármaco no tratamento das leucemias, inclusive nos tipos p53 silenciados, apresentando perfil MDR. O LQB-461 parece ainda ser capaz de modular o processo autofágico, e este mecanismo parece estar relacionado de forma complexa a outros mecanismos de ação do LQB, principalmente com relação ao perfil de resistência celular.

CONCLUSÕES

- a) A análise do transcriptoma mostrou serem modulados negativamente, após tratamento de células Jurkat com o LQB-461 na concentração de 3 μM , processos biológicos relacionados à síntese de proteínas. Já processos biológicos relacionados à indução de morte celular foram modulados positivamente pelo tratamento com ambas as concentrações de 3 e 5 μM , sinalizando a via intrínseca de apoptose como a principal via alterada neste processo;
- b) O mecanismo de indução de morte celular *in vitro* pelo LQB-461 em células Jurkat parece ser desencadeado pela ativação de apoptose na concentração de 5 μM , sugerindo, contudo, uma atividade citostática desse composto na concentração de 3 μM ;
- c) O efeito citostático do LQB-461, observado após tratamento em 3 μM em células Jurkat, parece envolver a inibição da via PI3K/ AKT/ mTOR e consequente diminuição global de síntese de proteínas;
- d) A proteína p21 parece participar na indução de apoptose promovida pelo LQB-461 *in vitro* em células Jurkat, de forma independente de p53;
- e) O mecanismo de ação do LQB-461 em células Jurkat parece modular positivamente tanto a via extrínseca de apoptose, via receptor Fas, como a via intrínseca de apoptose, através da regulação de proteínas da família BCL-2, promovendo aumento da razão entre a proteína pró-apoptótica Bax e a proteína antiapoptótica Bcl-2;
- f) A indução de apoptose através do LQB-461 mostrou ser caspase dependente, com aumento expressivo de ativação de caspase-3 em células Jurkat;
- g) O LQB-461 parece modular positivamente a autofagia na concentração de 3 μM , com aumento de expressão do marcador autofágico LC-3a, sugerindo uma resposta de resistência celular das células Jurkat nesta concentração.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-KARIM, S. S. *et al.* Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of novel benzofuran-pyrazole derivatives as anticancer agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 63, p. 1–12, 2015.
- AFZAL, M.; SAFER, A. M.; MENON, M. Green tea polyphenols and their potential role in health and disease. **Inflammopharmacology**, v. 23, p. 151-161, 2015.
- AGUIRRE, A. *et al.* FasL-triggered death of Jurkat cells requires caspase 8-induced, ATP-dependent cross-talk between Fas and the purinergic receptor P2X7. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, p. 485–493, 2013.
- AKONE, S. *et al.* Natural Products Impacting DNA Methyltransferases and Histone Deacetylases. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 992-1018, 2020.
- AL BITAR, S.; GALI-MUHTASIB, H. The Role of the Cyclin Dependent Kinase Inhibitor p21cip1/waf1 in Targeting Cancer: Molecular Mechanisms and Novel Therapeutics. **Cancers**, v. 11, p. 1475-1496, 2019.
- ALONSO-BETANZOS, A. *et al.* Review of Microarray Datasets: Where to Find Them and Specific Characteristics. **Methods in Molecular Biology**; v. 1986, p. 65-85, 2019.
- AMITAY, E. L.; KEINAN-BOKER L. Breastfeeding and Childhood Leukemia Incidence A Meta-analysis and Systematic Review. **JAMA Pediatrics**, v. 169, p. e151025 – e151034, 2015.
- ANTUNES, F. *et al.* Autophagy and intermittent fasting: the connection for cancer therapy? **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 73, p. e814s – e821s, 2018.
- ARBEL RUBINSTEIN, T. *et al.* Klotho suppresses colorectal cancer through modulation of the unfolded protein response. **Oncogene**, v. 38, p. 794–807, 2019.
- ARIYOSHI-KISHINO, K. *et al.* Tumor-specific cytotoxicity and type of cell death induced by benzaldehyde. **Anticancer Research**, v. 30, p. 5069–5076, 2010.
- ARABI, A. A. Routes to drug design via bioisosterism of carboxyl and sulfonamide groups. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 2167–2180, 2017.
- ARIYOSHI-KISHINO, K. *et al.* Tumor-specific cytotoxicity and type of cell death induced by benzaldehyde. **Anticancer Research**, v. 30, p. 5069-5076, 2010.
- ASANO, T. *et al.* Adenovirus-mediated human topoisomerase II α gene transfer increases the sensitivity of etoposide-resistant human and mouse breast cancer cells. **Acta Oncologica**, v. 44, p. 240-247, 2005.

- ASANUMA, T. *et al.* Visualization of the protective ability of a free radical trapping compound against rat C6 and F98 gliomas with diffusion tensor fiber tractography. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 28, p. 574-587, 2008.
- ASHKENAZI, A. Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer: lessons learned and future directions. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, p. 487-489, 2015.
- AYDIN, C.; KALKAN, R. Cancer Treatment: An Epigenetic View. **Global medical genetics**, v. 7, p. 3-7, 2020.
- BAHAR, E.; KIM, H.; YOON, H. ER stress-mediated signaling: Action potential and Ca²⁺ as key players. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1-22, 2016.
- BAIG, S. *et al.* Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand. **Cell Death and Disease**, v. 7, p. e2058-e2069, 2016.
- BANERJEE, K. *et al.* Induction of intrinsic and extrinsic apoptosis through oxidative stress in drug-resistant cancer by a newly synthesized Schiff base copper chelate. **Free radical research**, v. 50, p. 426-446, 2016.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química medicinal. As bases moleculares da ação dos fármacos. **Editora Art Med Ltda**, 2ª edição, 2008.
- BARRINGTON-TRIMIS, J. L. *et al.* Trends in childhood leukemia incidence over two decades from 1992-2013. **International Journal of Cancer**, v. 140, p. 1000-1008, 2017.
- BAUERNFEIND, A. L.; BABBITT, C. C. The predictive nature of transcript expression levels on protein expression in adult human brain. **BMC Genomics**, v. 18, p. 1-11, 2017.
- BENDRIS, N.; SCHMID, S. L. Endocytosis, Metastasis and Beyond: Multiple Facets of SNX9. **Trends in cell biology**, v. 27, p. 189-200, 2017.
- BÉRUBÉ, G. An overview of molecular hybrids in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 11, p. 281-305, 2016.
- BHALLA, Y.; GUPTA, V. K.; JAITAK, V. Anticancer activity of essential oils: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 3643-3653, 2013.
- BHAT, Z. S. *et al.* Synthesis and in vitro evaluation of substituted 3-cinnamoyl-4-hydroxypyran-2-one (CHP) in pursuit of new potential antituberculosis agents. **Medchemcomm**, v. 9, p. 165-172, 2017.
- BONAM, S. R. *et al.* HSPA8/HSC70 in Immune Disorders: A Molecular Rheostat that Adjusts Chaperone-Mediated Autophagy Substrates. **Cells**, v. 8, p. 849-875, 2019.
- BLONDEL, A. *et al.* Exploiting ING2 epigenetic modulation as a therapeutic opportunity for non-small cell lung cancer. **Cancers**, v. 11, p.1601-1615, 2019.
- BONACHE, S. *et al.* O. Mutation analysis of the SHFM1 gene in breast/ovarian cancer families. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 139, p. 529-532, 2013.

BUKOWSKI, K. *et al.* Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. **International journal of molecular sciences**, v. 21, p. 3233-3257, 2020.

BURKE, Y. D. *et al.* Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. **Lipids**, v. 2, p. 51-156, 1997.

CAI, X. *et al.* Mir-215 suppresses proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells. **Oncology Letters**, v. 13, p. 2349–2353, 2017.

CAMPBELL, K. J.; TAIT, S. W. G. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. **Open Biology**, v. 8, p. 1–11, 2018.

CÂNCER RESEARCH UK. Bone marrow transplants. **Disponível em:** <www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancers-in-general/treatment/transplant/bone-marrow-transplants>. Acesso em: outubro de 2019.

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

CIPRIANO, R. *et al.* FAM83B-mediated activation of PI3K/AKT and MAPK signaling cooperates to promote epithelial cell transformation and resistance to targeted therapies. **Oncotarget**, v. 4, p. 729–738, 2013.

CHEN, B. *et al.* ZDHHC7-Mediated S-Palmitoylation of Scribble Regulates Cell Polarity. **Nature Chemical Biology**, v. 12, p. 686–693, 2016.

CHEN, K. *et al.* eIF4B is a convergent target and critical effector of oncogenic Pim and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in Abl transformants. **Oncotarget**, v. 7, p. 10073–10089, 2016.

CHEN, S. L. *et al.* eEF1A1 Overexpression Enhances Tumor Progression and Indicates Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. **Translational Oncology**, vol. 11, p. 125–131, 2018.

CHEN, T. *et al.* In vivo and in vitro inhibition of human gastric cancer progress by upregulating Kank1 gene. **Oncology Reports**, v. 38, p. 1663–1669, 2017.

CHEN, Y. *et al.* INPP4B restrains cell proliferation and metastasis via regulation of the PI3K/AKT/SGK pathway. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, p. 2935–2943, 2018.

CHEN, Z.; XU, X. H. Roles of nucleolin: Focus on cancer and anti-cancer therapy. **Saudi Medical Journal**, v. 37, p. 1312–1318, 2016.

CHEN, Z. *et al.* TRIM44 promotes quiescent multiple myeloma cell occupancy and survival in the osteoblastic niche via HIF-1 α stabilization. **Leukemia**, v. 33, p. 469–486, 2019.

CHENG, D. *et al.* Down-regulation of RPS9 inhibits osteosarcoma cell growth through inactivation of MAPK signaling pathway. **Journal of Cancer**, v. 8, p. 2720–2728, 2017.

- CHEUNG, F. W. K. *et al.* Sodium 5,6-benzylidene-L-ascorbate induces oxidative stress, autophagy, and growth arrest in human colon cancer HT-29 cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 111, p. 412-424, 2010.
- CHRISTIANSON, D. W. Structural and Chemical Biology of Terpenoid Cyclases. **Chemical Reviews**, v. 117, p. 11570–11648, 2017.
- CHOI, S. H.; KIM, H. Y. Methionine sulfoxide reductase A regulates cell growth through the p53-p21 pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 416, p. 70–75, 2011..
- CORT, A. *et al.* Redox Control of Multidrug Resistance and Its Possible Modulation by Antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 4251912 - 4251929, 2016.
- COSTA, D. S. S. *et al.* O-Alkyl-N-Methylarylnitrones derived from hydroxybenzaldehydes. Synthesis and antineoplastic effects on human cancer cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 2053-2061, 2015.
- COTTER, T. G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 501-507, 2009.
- COUTO, A. C. *et al.* Tendência de mortalidade por leucemia infantil num período de 25 anos. **Jornal de Pediatria**, v. 86, p. 405-410, 2010.
- CUI, Z. *et al.* KANK1 inhibits cell growth by inducing apoptosis through regulating CXXC5 in human malignant peripheral nerve sheath tumors. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–11, 2017.
- CUPELLO, M. P. *et al.* Mutagenic and Cytotoxicity LQB 123 Profile: Safety and Tripanocidal Effect of a Phenyl-t-Butylnitronone Derivative. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 2483652 - 2483660, 2017.
- D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, v. 43, p. 582–592, 2019.
- DADSENA, S.; ZOLLO, C.; GARCÍA-SÁEZ, A. J. Mechanisms of mitochondrial cell death. **Biochemical Society transactions**, v. 49, n. 2, p. 663–674, 2021.
- DAI, D. N. *et al.* Elevated expression of CST1 promotes breast cancer progression and predicts a poor prognosis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 95, p. 873–886, 2017.
- DAI, J. J. *et al.* Involvement of Circular RNA SMARCA5/microRNA-620 axis in the regulation of cervical cancer cell proliferation, invasion and migration. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, p. 8589–8598, 2018.
- DAI, X. *et al.* Fa2h exhibits tumor suppressive roles on breast cancers via cancer stemness control. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 1–14, 2019.
- DILLER, L. Adult primary care after childhood acute lymphoblastic leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 365, p. 1417-1424, 2011.

- DE LUCA, A.; *et al.* Methionine sulfoxide reductase A down-regulation in human breast cancer cells results in a more aggressive phenotype. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 18628–18633, 2010.
- DAVID-WEST, G. *et al.* mTORC1/2 inhibition re-sensitizes platinum-resistant ovarian cancer by disrupting selective translation of DNA damage and survival mRNAs. **Oncotarget**, v. 9, p. 33064–33076, 2018
- DING, H. *et al.* p21 response to DNA damage induced by genistein and etoposide in human lung cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, p. 950-956, 2003.
- DOBLAS, S. *et al.* A. Phenyl-tert-butyl nitron induces tumor regression and decreases angiogenesis in a C6 rat glioma model. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, p. 63-72, 2008.
- DUNSAED, C. B. *et al.* Effect on cell survival and protein synthesis of benzylidene-glucose (BG) and the deuterated analogue P-1013 in cultured cells. **Anticancer research**, v. 15, p. 1921–1927, 1995.
- DUTTA, A.; CHAKRABORTY, A. Cinnamon in Anticancer Armamentarium: A Molecular Approach. **Journal of Toxicology**, v. 2018, p. 8978731-8978739, 2018.
- EGUCHI, H. *et al.* A. Increase in resistance to anticancer drugs involves occludin in spheroid culture model of lung adenocarcinoma A549 cells. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1–13, 2018.
- ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 495-516, 2007.
- ERICSON, K. *et al.* Genetic inactivation of AKT1, AKT2, and PDPK1 in human colorectal cancer cells clarifies their roles in tumor growth regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 2598–2603, 2010.
- EZOE, S. Secondary leukemia associated with the anti-cancer agent, etoposide, a topoisomerase ii inhibitor. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, p. 2444-2453, 2012.
- FALZONE, L.; SALOMONE, S.; LIBRA, M. Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p.1300-1326, 2018.
- FAN, H. *et al.* Aberrant Kank1 expression regulates YAP to promote apoptosis and inhibit proliferation in OSCC. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, p. 1850–1865, 2020.
- FERREIRA, B. I. *et al.* Adaptive mechanisms of resistance to anti-neoplastic agents. **MedChemComm**, v. 8, p. 53–66, 2017.
- FERNÁNDEZ, Á. F.; LÓPEZ-OTÍN, C. The functional and pathologic relevance of autophagy proteases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, p. 33–41, 2015.

FLOROS, K. V. *et al.* Alterations in mRNA expression of apoptosis-related genes BCL2, BAX, FAS, caspase-3, and the novel member BCL2L12 after treatment of human leukemic cell line HL60 with the antineoplastic agent etoposide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1090, p. 89–97, 2006.

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

FLOYD, R. A. *et al.* Nitrones as therapeutics. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 45, p. 1361-1374, 2008.

FLOYD, R. A. *et al.* Anti-cancer activity of nitrones in the Apc (Min/+) model of colorectal cancer. **Free Radical Research**, v. 44, p. 108-117, 2010.

FLOYD, R. A. *et al.* Anti-cancer activity of nitrones and observations on mechanism of action. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 373-379, 2011.

FOURNIER, M. L. *et al.* Delayed correlation of mRNA and protein expression in rapamycin-treated cells and a role for Ggc1 in cellular sensitivity to rapamycin. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 9, p. 271–284, 2010.

FUJII, R. *et al.* MiR-1 suppresses proliferation of osteosarcoma cells by up-regulating p21 via PAX3. **Cancer Genomics and Proteomics**, v. 16, p. 71–79, 2019.

FUJINO, M. *et al.* Distinct pathways of apoptosis triggered by FTY720, etoposide, and anti-Fas antibody in human T-lymphoma cell line (Jurkat cells). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, p. 939–945, 2002.

FULDA, S. Autophagy in cancer therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 7, p. 1–4, 2017.

GABRA, M. M.; SALMENA, L. microRNAs and acute myeloid leukemia chemoresistance: A mechanistic overview. **Frontiers in Oncology**, v. 7, p.255-274, 2017.

GALENKAMP, K. M. O. *et al.* TNF α sensitizes neuroblastoma cells to FasL-, cisplatin- and etoposide-induced cell death by NF- κ B-mediated expression of Fas. **Molecular Cancer**, v. 14, p. 1–14, 2015.

GHASABI, M. *et al.* MicroRNAs in cancer drug resistance: Basic evidence and clinical applications. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, p. 2152–2168, 2019.

GOUDARZI, K. M.; LINDSTRÖM, M. S. Role of ribosomal protein mutations in tumor development (Review). **International Journal of Oncology**, v. 48, p. 1313–1324, 2016.

GREMKE, N. *et al.* mTOR-mediated cancer drug resistance suppresses autophagy and generates a druggable metabolic vulnerability. **Nature communications**, v. 11, p. 4684-4699, 2020.

- GUÉRILLON, C. *et al.* ING1 and ING2: Multifaceted tumor suppressor genes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, p. 3753–3772, 2013.
- GU, Y.; ZHANG, M. Upregulation of the Kank1 gene inhibits human lung cancer progression in vitro and in vivo. **Oncology Reports**, v. 40, p. 1243–1250, 2018.
- GUO, D. *et al.* D-dopachrome tautomerase is over-expressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and acts cooperatively with macrophage migration inhibitory factor to promote cancer growth. **International Journal of Cancer**, v. 139, p. 2056–2067, 2016.
- GUO, X. *et al.* Displacement of Bax by BMF Mediates STARD13 3'UTR-Induced Breast Cancer Cells Apoptosis in an miRNA-Dependent Manner. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, p. 63–71, 2018.
- HAUG, J. S. *et al.* Directed cell killing (apoptosis) in human lymphoblastoid cells incubated in the presence of farnesol: effect of phosphatidylcholine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 1223, p. 133-140, 1994.
- HAYAKAWA, Y. *et al.* Report on the use of non-clinical studies in the regulatory evaluation of oncology drugs. **Cancer Science**, v. 107, p. 189-202, 2016.
- HE, S. J. *et al.* The dual role and therapeutic potential of high-mobility group box 1 in cancer. **Oncotarget**, v. 8, p. 64534–64550, 2017.
- HORIEN, C.; YUAN, P. Drug development. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, p. 1–3, 2017.
- HONG, Y. *et al.* Diacetyl Hexamethylene Diamine (CAHB) Exerts Pro-Apoptotic and Anti-Proliferative Function in Leukemic T Lymphocytes via Downregulating PI3K/Akt Signaling. **Medical Science Monitor**, v. 25, p. 5211–5218, 2019.
- HONGMEI, Z. Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review. **Biochemistry, Genetics and Molecular Biology, Apoptosis and Medicine**, capítulo 1, DOI: 10.5772/50129, 2012.
- HOU, Y. *et al.* miR-215 functions as a tumor suppressor and directly targets ZEB2 in human non-small cell lung cancer. **Oncology Letters**, v. 10, p. 1985–1992, 2015.
- HOWARD, C. M. *et al.* The cxcr4-lasp1-eif4f axis promotes translation of oncogenic proteins in triple-negative breast cancer cells. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 1–16, 2019.
- HU, M. *et al.* Novel role of microRNA-126 in digestive system cancers: From bench to bedside (review). **Oncology Letters**, v. 17, p. 31–41, 2019.
- HUANG, T. *et al.* Thrombospondin-1 is a multifaceted player in tumor progression. **Oncotarget**, v. 8, p. 84546–84558, 2017.
- IRIZARRY, R. A. *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. **Biostatistics**, v. 4, p. 249–264, 2003.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2020.. Ministério da Saúde. **Disponível em:** < <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. > acesso em maio de 2021. **ISBN 978-85-7318-389-4** (versão eletrônica), 2020.

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

INOUE, Y. *et al.* Modulation of Fas-FasL related apoptosis by PBN in the early phases of choline deficient diet-mediated hepatocarcinogenesis in rats. **Free Radical Research**, v. 41, p. 972 - 980, 2007.

ISHIBASHI, K. *et al.* Atg16L2, a novel isoform of mammalian Atg16L that is not essential for canonical autophagy despite forming an Atg12-5-16L2 complex. **Autophagy**, v. 7, p. 1500–1513, 2011.

JABBOUR, E. *et al.* Monoclonal antibodies in acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 125, p. 4010-4016, 2015.

JACOMIN, A. C. *et al.* What we learned from big data for autophagy research. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 6, p. 1–14, 2018.

JAKSIK, R. *et al.* Microarray experiments and factors which affect their reliability. **Biology Direct**, v. 10, p. 1–14, 2015.

JAMIL, S. *et al.* Etoposide induces cell death via mitochondrial-dependent actions of p53. **Cancer Cell International**, v. 15, p. 79-90, 2015.

JARRY, A. *et al.* Interferon-Alpha Promotes Th1 Response and Epithelial Apoptosis via Inflammasome Activation in Human Intestinal Mucosa. **Cmgh**, v. 3, p. 72–81, 2017.

JIANG, B.; MOSKOVITZ, J. The functions of the mammalian methionine sulfoxide reductase system and related diseases. **Antioxidants**, v. 7, p. 1–9, 2018.

JIN, Q. *et al.* Overexpression of SMARCA5 correlates with cell proliferation and migration in breast cancer. **Tumor Biology**, v. 36, p. 1895–1902, 2015.

JONCZYK, R. *et al.* Living Cell Microarrays: An Overview of Concepts. **Microarrays**, v. 5, p. 11-40, 2016.

KAPADIA, B. *et al.* Fatty Acid Synthase induced S6Kinase facilitates USP11-eIF4B complex formation for sustained oncogenic translation in DLBCL. **Nature Communications**, v. 9, p.829-844, 2018.

KARPINICH, N. O. *et al.* The course of etoposide-induced apoptosis in Jurkat cells lacking p53 and Bax. **Journal of Cellular Physiology**, v. 208, p. 55-63, 2006.

- KATO, M. *et al.* Long-term outcome of 6-month maintenance chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children. **Leukemia**, v. 31, p. 580-584, 2016..
- KEPP, O. *et al.* Cell death assays for drug discovery. **Nature Reviews**, v. 10, p. 221-223, 2011.
- KERRU, N. *et al.* Recent advances (2015–2016) in anticancer hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 142, p. 179–212, 2017.
- KO, P.; DIXON, S. J. Protein palmitoylation and cancer. **EMBO reports**, v. 19, p. 1–14, 2018.
- KRÁLOVCOVÁ, D. *et al.* Quantitative analysis of expression level of BCL2 and BAX genes in Hep-2 and HL-60 cells after treatment with etoposide. **Acta medica (Hradec Králové) / Universitas Carolina, Facultas Medica Hradec Králové**, v. 51, p. 191–195, 2008.
- KREIS, N.; LOUWEN, F.; YUAN, J. The Multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in Cell Differentiation, Migration and Cancer Therapy. **Cancers**, v. 11, p. 1220-1243, 2019.
- KUDO, K. *et al.* Etoposide-related acute promyelocytic leucemia. **Leukemia**, v. 12, p. 1171-1175, 1998.
- KUTTAN, G. *et al.* Inhibition of tumor progression by naturally occurring terpenoids. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, p. 995-1007, 2011.
- KWON, H. *et al.* Cinnamon and its components suppress vascular smooth muscle cell proliferation by up-regulating cyclin-dependent kinase inhibitors. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 43, p. 621-636, 2015.
- LAWSON, M. H. *et al.* Two novel determinants of etoposide resistance in small cell lung cancer. **Cancer research**, v. 71, p. 4877-4887, 2011.
- LAN, Q. Y. *et al.* 3-cinnamoyl-4-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-one (CHP) inhibits human ovarian cell proliferation by inducing apoptosis. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, p. 155–163, 2015.
- LEBLANC, N. *et al.* Pax-5 inhibits breast cancer proliferation through miR-215 up-regulation. **Anticancer Research**, v. 38, p. 5013–5026, 2018.
- LEE, M. S. Overview of the minireviews on autophagy. **Molecules and Cells**, v. 41, p. 1–2, 2018.
- LEE, S. H. *et al.* Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm. **Cell Death and Differentiation**, v. 20, p. 64–76, 2013.
- LEE, W. H. *et al.* Potentiation of etoposide-induced apoptosis in HeLa cells by co-treatment with KG-135, a quality-controlled standardized ginsenoside formulation. **Cancer Letters**, v. 294, p. 74–81, 2010.

- LEE, Y. J. *et al.* Bcl-2 knockdown accelerates T cell receptor-triggered activation-induced Cell death in Jurkat T cells. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 18, p. 73–78, 2014.
- LEE, Y. Y. *et al.* BCLAF1 is a radiation-induced H2AX-interacting partner involved in cH2AX-mediated regulation of apoptosis and DNA repair. **Cell Death and Disease**, v. 3, p. 1–12, 2012.
- LI, X. *et al.* Down-regulated lncRNA SLC25A5-AS1 facilitates cell growth and inhibits apoptosis via miR-19a-3p/PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in gastric cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 23, p. 2920–2932, 2019.
- LI, X. *et al.* HYOU1 promotes cell growth and metastasis via activating PI3K/AKT signaling in epithelial ovarian cancer and predicts poor prognosis. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 23, p. 4126–4135, 2019.
- LI, Y.; SHIVELY, J. E. CEACAM1 Regulates Fas-mediated Apoptosis in Jurkat T-cells via its Interaction with β -cateni. **Experimental Cell Research**, v. 319, p. 1061–1072, 2013.
- LI, Y. *et al.* The role of Sox6 and Netrin-1 in ovarian cancer cell growth, invasiveness, and angiogenesis. **Tumor Biology**, v. 39, p. 1–2, 2017.
- LI, Y. *et al.* Collagen prolyl hydroxylase 3 has a tumor suppressive activity in human lung cancer. **Experimental Cell Research**, v. 363, p. 121–128, 2018.
- LI, Y. *et al.* WDR74 modulates melanoma tumorigenesis and metastasis through the RPL5–MDM2–p53 pathway. **Oncogene**, v. 39, p. 2741–2755, 2020.
- LI, Z. Y. *et al.* Cassane-type diterpenes from *Caesalpinia minax* induce apoptosis in pituitary adenoma: structure-activity relationship, ER stress and Wnt/ β -catenin pathways. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 2, p. 1-13, 2016.
- LIN, L. *et al.* C. The anticancer properties and apoptosis-inducing mechanisms of cinnamaldehyde and the herbal prescription Huang-Lian-Jie-Du-Tang (Huáng Lián Jiě Dú Tang) in human hepatoma cells. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 3, p. 227–233, 2013.
- LIN, Q. *et al.* Knocking down FAM83B inhibits endometrial cancer cell proliferation and metastasis by silencing the PI3K/AKT/mTOR pathway. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 115, p. 108939-108950, 2019.
- LIN, Z. *et al.* Benzylamine and methylamine, substrates of semicarbazide-sensitive amine oxidase, attenuate inflammatory response induced by lipopolysaccharide. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 1079-1089, 2011.
- LINDSTRÖM, M. S.; NISTÉR, M. Silencing of ribosomal protein S9 elicits a multitude of cellular responses inhibiting the growth of cancer cells subsequent to p53 activation. **PLoS ONE**, v. 5, p. e9578-e9592, 2010.

LINKE, M., *et al.* mTORC1 and mTORC2 as regulators of cell metabolism in immunity. **FEBS letters**, v. 591, p. 3089–3103, 2017.

LIU, H. *et al.* Complement factor H-related 3 overexpression affects hepatocellular carcinoma proliferation and apoptosis. **Molecular Medicine Reports**, v. 20, p. 2694–2702, 2019.

LIU, J.; ZHU, H. TMEM106A inhibits cell proliferation, migration, and induces apoptosis of lung cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, p. 7825–7833, 2019.

LIU, P. Y. *et al.* The long noncoding RNA lncNB1 promotes tumorigenesis by interacting with ribosomal protein RPL35. **Nature Communications**, v. 10, p. 526–543, 2019.

LIU, Q. *et al.* Panduratin A Inhibits Cell Proliferation by Inducing G0/G1 Phase Cell Cycle Arrest and Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells. **Biomolecules & therapeutics**, v. 26, p. 328–334. 2018.

LIU, X. *et al.* PPM1K Regulates Hematopoiesis and Leukemogenesis through CDC20-Mediated Ubiquitination of MEIS1 and p21. **Cell Reports**, v. 23, p. 1461–1475, 2018.

LIU, X. L. *et al.* Membrane metallo-endopeptidase mediates cellular senescence induced by oncogenic PIK3CAH1047R accompanied with pro-tumorigenic secretome. **International Journal of Cancer**, v. 145, p. 817–829, 2019.

LIU, Y. *et al.* Cystatin SN affects cell proliferation by regulating the ER α /PI3K/AKT/ER α loopback pathway in breast cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 12, p. 11359–11369, 2019.

LIU, Y.; YAO, J. Research progress of cystatin SN in cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 12, p. 3411–3419, 2019.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LONG, Z. *et al.* Isoferulic acid inhibits human leukemia cell growth through induction of G2/M-phase arrest and inhibition of Akt/mTOR signaling. **Molecular medicine reports**, v. 21, p. 1035–1042, 2020.

LOPES, A. F. Avaliação de citotoxicidade de análogos de Alcalóides marinhos do tipo 3-Alquilpiridínicos em linhagem de leucemia Mielóide aguda. Dissertação de mestrado, Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de São João Del-rei, UFSJ, 2016.

LOSSI, L.; CASTAGNA, C.; MERIGHI, A. Caspase-3 Mediated Cell Death in the Normal Development of the Mammalian Cerebellum. **International journal of molecular sciences**, v. 19, p. 1–23, 2018.

LV, D. *et al.* HMGB1 promotes prostate cancer development and metastasis by interacting with brahma-related gene 1 and activating the Akt signaling pathway. **Theranostics**, v. 9, p. 5166–5182, 2019.

- MA, Q. *et al.* MAGI3 suppresses glioma cell proliferation via upregulation of PTEN expression. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 28, p. 502–509, 2015.
- MAHBUB, A. A. *et al.* Polyphenols act synergistically with doxorubicin and etoposide in leukaemia cell lines. **Cell Death Discovery**, v. 1, 15043-15055, 2015.
- MAHYAR-ROEMER, M.; ROEMER, K.. p21 Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents. **Oncogene**, v. 20, p. 3387-3398, 2001.
- MAIUTHED, A. *et al.* Apoptosis-inducing effect of hydroquinone 5-O-cinnamoyl ester analog of renieramycin m on non-small cell lung cancer cells. **Anticancer Research**, v. 37, p. 6259–6267, 2017.
- MATSON, J. P.; COOK, J. G. Cell cycle proliferation decisions: the impact of single cell Analyses. **FEBS Journal**, v. 284, p. 362–375, 2017
- MIRABILII, S. *et al.* Biological Aspects of mTOR in Leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 2396-2416, 2018.
- MIURA, R. *et al.* Inhibitory effect of carbonyl reductase 1 on ovarian cancer growth via tumor necrosis factor receptor signaling. **International Journal of Oncology**, v. 47, p. 2173–2180, 2015.
- MONTECUCCO, A.; ZANETTA, F.; BIAMONTI, G. Molecular mechanisms of etoposide. **EXCLI Journal**, v. 14, p. 95–108, 2015.
- MOURA, N. S. *et al.* Ensaios toxicológicos: um estudo sobre a utilização de testes *in vivo* e *in vitro*. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 8, p. 1945-1960, 2012.
- MUNIZ-FELICIANO, L. *et al.* RUBCN/rubicon and EGFR regulate lysosomal degradative processes in the retinal pigment epithelium (RPE) of the eye. **Autophagy**, v. 13, p. 2072–2085, 2017.
- NAGARSENKAR, A. *et al.* Synthesis and apoptosis inducing studies of triazole linked 3-benzylidene isatin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 124, p. 782-793, 2016.
- NAGATA, S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 36, p. 489-517, 2018.
- NAKAMAE, I. *et al.* Myeloid leukemia factor 1 stabilizes tumor suppressor C/EBPa to prevent Trib1-driven acute myeloid leukemia. **Blood Advances**, v. 1, p. 1682–1693, 2017.
- NAUMANN, E. C. *et al.* Membrane anchoring c-secretase modulators with terpene-derived moieties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 3852-3856, 2013.
- NAVAKAUSKIENĖ, R. *et al.* Cell cycle inhibitors in retinoic acid and etoposide-mediated biological responses. **Biologija**, v. 2, p. 64-67, 2002.

NIU, N.; WANG, L. In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. **Pharmacogenomics**, v. 16, p. 273–285, 2015.

OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Brazilian journal of biology. Revista brasleira de biologia*, v. 81, n. 4, p. 1133–1143, 2021.

OHSHIMA, K. *et al.* Argininosuccinate Synthase 1-Deficiency Enhances the Cell Sensitivity to Arginine through Decreased DEPTOR Expression in Endometrial Cancer. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–14, 2017.

OKADA, N. *et al.* Novel role of ASC as a regulator of metastatic phenotype. **Cancer Medicine**, v. 5, p. 2487–2500, 2016.

ONAL, M.; OVET, G.; ONAL, O. Review of Apoptosis. **MOJ Immunology**, v. 3, p. 1–4, 2016.

OPDENBOSCH, N. V.; LAMKANFI, M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. **Immunity**, v. 50, p. 1352–1364, 2019.

OUYANG, L. *et al.* Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, p. 487-498, 2012.

PADANAD, M. S. *et al.* Fatty Acid Oxidation Mediated by Acyl-CoA Synthetase Long Chain 3 Is Required for Mutant KRAS Lung Tumorigenesis. **Cell Reports**, v. 16, p. 1614–1628, 2016.

PADI, S. K. R. *et al.* Phosphorylation of DEPDC5, a component of the GATOR1 complex, releases inhibition of mTORC1 and promotes tumor growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, p. 20505–20510, 2019.

PAKO, J. *et al.* Assessment of the circulating klotho protein in lung cancer patients. **Pathology and Oncology Research**, v. 26, p. 233–238, 2020.

PAQUETTE, M.; EL-HOUJEIRI, L.; PAUSE, A. mTOR Pathways in Cancer and Autophagy. **Cancers (basel)**, v. 10, p. 18-33, 2018.

PARVEEN, A. *et al.* Dual Role of p21 in the Progression of Cancer and Its Treatment. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 26, p. 49–62, 2016.

PELLAND-MARCOTTE, M.-C. *et al.* Incidence of infections after therapy completion in children with acute lymphoblastic leukemia or acute myeloid leukemia: a systematic review of the literature. **Leukemia & Lymphoma**, v. 0, p. 1–11, 2019.

PESHES-YELOZ, N. *et al.* Role of Klotho Protein in Tumor Genesis, Cancer Progression, and Prognosis in Patients with High-Grade Glioma. **World Neurosurgery**, v. 130, p. e324–e332, 2019..

PETTERSEN, E. O. *et al.* (1991). Increased effect of benzaldehyde by exchanging the hydrogen in the formyl group with deuterium. **Anticancer research**, v. 11, p. 369–373, 1991.

- PETTERSEN, E. *et al.* Tumour necrotisation in nude mice xenografts by the reversible protein synthesis inhibitor zilascorb(2H). **British journal of cancer**, v. 67, p. 650–656, 1993.
- PIAO, S. *et al.* Ovarian tumor domain-containing protein 1 deubiquitinates and stabilizes p53. **Cellular Signalling**, v. 33, p. 22–29, 2017.
- PODSHIVALOVA, K. *et al.* Expression of the miR-150 tumor suppressor is restored by and synergizes with rapamycin in a human leukemia T-cell line. **Leukemia research**, v. 74, p. 1–9, 2018.
- POHL, S. O. *et al.* Crosstalk between cellular redox state and the anti-apoptotic protein Bcl-2. **Antioxid Redox Signal**, v. 29, p. 1215-1236, 2018
- PORTT, L, G. N. *et al.* Anti-apoptosis and cell survival: a review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, p. 238-259, 2011.
- POLLI, J. E. In vitro studies are sometimes better than conventional human pharmacokinetic in vivo studies in assessing bioequivalence of immediate-release solid oral dosage forms. **AAPS Journal**, v. 10, p. 289–299, 2008.
- PUCKETT, Y.; CHAN, O. Acute Lymphocytic Leukemia. In StatPearls. **StatPearls Publishing**, retirado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29083572/>, 2021.
- QIAN, H. R. *et al.* Interplay between apoptosis and autophagy in colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 8, p. 62759–62768, 2017.
- QIN, Y. R. *et al.* Characterization of tumor-suppressive function of SOX6 in human esophageal squamous cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 17, p. 46–55, 2011.
- RAMADAN, M. *et al.* C-(2-Chloroquinoline-3-yl)- N-phenyl nitron: new synthetic antioxidant inhibits proliferation and induces apoptosis of breast carcinoma MCF-7 cells. **Archives der Pharmazie**. v. 339, p. 242-249, 2006.
- RANDHAWA, J. K. ; FERRAJOLI, A. A review of supportive care and recommended preventive approaches for patients with chronic lymphocytic leukemia. **Expert Review of Hematology**, v. 9, p. 235-244, 2016.
- REMISZEWSKI, S. W. The discovery of NVP-LAQ824: from concept to clinic. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2393-2402, 2003.
- RISS, T. L. *et al.* Cell viability assays. Editores: Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, *et al.* . **Assay Guidance Manual. Bethesda (MD):** Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013. Retirado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/> Acesso em: janeiro de 2017.
- RODRIGUES, T.; SIEGLITZ, F.; BERNARDES, G. Natural product modulators of transient receptor potential (TRP) channels as potential anti-cancer agents. **Chemical Society Reviews**, v. 45, p. 6130-6137, 2016.

- ROMANO, S. *et al.* Nucleolin-based targeting strategies for cancer therapy: from targeted drug delivery to cytotoxic ligands. **Drug Discovery Today**, v. 24, p. 1985–2001, 2019.
- ROY, P. *et al.* Influence of autophagy, apoptosis and their interplay in filaricidal activity of C-cinnamoyl glycosides. **Parasitology**, v.146, p. 1451-1461, 2019.
- RUSSI, S. *et al.* Adapting and surviving: Intra and extra-cellular remodeling in drug-resistant gastric cancer cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1–17, 2019.
- SAGULENKO, V. *et al.* Caspase-1 Is an Apical Caspase Leading to Caspase-3 Cleavage in the AIM2 Inflammasome Response, Independent of Caspase-8. **Journal of Molecular Biology**, v. 430, p. 238–247, 2018.
- SAKAIZAWA, T. *et al.* Potential role of ASC, a proapoptotic protein, for determining the cisplatin susceptibility of lung cancer cells. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 244, p. 133–144, 2018.
- SALIAKOURA, M. *et al.* The ACSL3-LPIAT1 signaling drives prostaglandin synthesis in non-small cell lung cancer. **Oncogene**, v. 39, p. 2948–2960, 2020.
- SAWADA, M. *et al.* Erratum: Influence of Bax or Bcl-2 overexpression on the ceramide-dependent apoptosis pathway in glioma cells (Oncogene (2000) 19 (3508-3520)). **Oncogene**, v. 25, p. 7440, 2006.
- SEBASTIANO, M. R.; KONSTANTINIDOU, G. Targeting long chain acyl-coa synthetases for cancer therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1–16, 2019.
- SCHROEDER, U. *et al.* Hydrolytically activated etoposide prodrugs inhibit MDR-1 function and eradicate established MDR-1 multidrug-resistant T-cell leukemia. **Blood**, v. 102, p. 246-253, 2003.
- SHI, J. Recent updates and future perspectives about amygdalin as a potential anticancer agent: A review. **Cancer medicine**, v. 8, p. 3004–3011, 2019.
- SEO, J. *et al.* Integration of MicroRNA, mRNA, and protein expression data for the identification of cancer-related MicroRNAs. **PLoS ONE**, v. 12, p. 1–22, 2017.
- SHAMLOO, B.; USLUER, S. p21 in Cancer Research. **Cancers**, v. 11, p. 1178, 2019.
- SHARMA, B.; KANWAR, S. S. Phosphatidylserine: A cancer cell targeting biomarker. **Seminars in Cancer Biology**, v. 52, p. 17–25, 2018.
- SHIM, H. S. *et al.* Peripheral and central oxidative stress in chemotherapy-induced neuropathic pain. **Molecular Pain**, v. 15, p.1-11, 2019.
- SMYTH, G. K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. **Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology**, v. 3, p.1-25, 2004.
- SOBRIDO-CAMEÁN, D.; BARREIRO-IGLESIAS, A. Of caspase-8 and fas in cell death after spinal cord injury. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, p. 1–9, 2018.

SØRENG, K. *et al.* SNX 18 regulates ATG 9A trafficking from recycling endosomes by recruiting Dynamin-2. **EMBO reports**, v. 19, p. 1–12, 2018.

SRIDHARAN, S.; BASU, A. Distinct Roles of mTOR Targets S6K1 and S6K2 in Breast Cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 21, p. 1199, 2020.

STYCZYNSKI, J. *et al.* Fludarabine, treosulfan and etoposide sensitivity and the outcome of hematopoietic stem cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. **Anticancer research**, v. 27, p. 1547-1552, 2007.

SU, X. *et al.* Autocrine and paracrine apoptosis are mediated by differential regulation of Fas ligand activity in two distinct Jurkat T cell populations. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 5288–5293, 1998.

SU, T. *et al.* FGF14 functions as a tumor suppressor through inhibiting PI3K/AKT/mTOR pathway in colorectal cancer. **Journal of Cancer**, v. 11, p. 819–825, 2020.

SUH, N. MicroRNA controls of cellular senescence. **BMB Reports**, v. 51, p. 493–499, 2018.

SUN, W. L. Ambra1 in autophagy and apoptosis: Implications for cell survival and chemotherapy resistance. **Oncology Letters**, v. 12, p. 367–374, 2016.

SUN, Y. *et al.* Myeloid leukemia factor 1 interfered with Bcl-XL to promote apoptosis and its function was regulated by 14-3-3. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 71, p. 807–821, 2015.

SUN, X. *et al.* RBMS2 inhibits the proliferation by stabilizing P21 mRNA in breast cancer 11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and Carcinogenesis. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 37, p. 1–14, 2018.

SUSNOW, N. *et al.* Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. **Seminar Cancer Biology**; v. 19, p. 42–49, 2009.

SVERCHINSKY, D. V. *et al.* Etoposide-induced apoptosis in cancer cells can be reinforced by an uncoupled link between Hsp70 and Caspase-3. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 1–15, 2018.

TAKELE ASSEFA, A.; VANDESOMPELE, J.; THAS, O. On the utility of RNA sample pooling to optimize cost and statistical power in RNA sequencing experiments. **BMC genomics**, v. 21, p. 312-326, 2020.

TAMILZHALAGAN, S. *et al.* Upregulated, 7q21-22 amplicon candidate gene SHFM1 confers oncogenic advantage by suppressing p53 function in gastric cancer. **Cellular Signalling**, v. 27, p. 1075–1086, 2015

TANG, L. *et al.* Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods. **Journal of experimental & clinical cancer research**, v. 37, p 87-102, 2018.

TANG, W. *et al.* INPP4B inhibits cell proliferation, invasion and chemoresistance in human hepatocellular carcinoma. **OncoTargets and Therapy**, v. 12, p. 3491–3507, 2019.

TANG, Yue *et al.* Fatty acid activation in carcinogenesis and cancer development: Essential roles of long-chain acyl-coa synthetases (review). **Oncology Letters**, v. 16, p. 1390–1396, 2018.

TANGCHIRAKHAPHAN, S. *et al.* Mechanism of apoptosis induction associated with ERK1/2 upregulation via goniotalamin in melanoma cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, p. 3052–3058, 2018.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood cancer journal**, v. 7, p. e577-e589, 2017.

THIMOTEO, R. R. C. Estudo da relação estrutura-atividade antineoplásica *in vitro* de análogos cíclicos da terpenila-nitrona LQB-278. 2017. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Nucleares; Ecologia) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017).

THOMAS, M. P. *et al.* Apoptosis Triggers Specific, Rapid, and Global mRNA Decay with 3' Uridylated Intermediates Degraded by DIS3L2. **Cell Reports**, v. 11, p. 1079–1089, 2015.

TIAN, Y. *et al.* Maslinic acid induces autophagy by down-regulating HSPA8 in pancreatic cancer cells. **Phytotherapy Research**, v. 32, p. 1320–1331, 2018.

TORRES-AYUSO, P. *et al.* Diacylglycerol kinase- ζ regulates mTORC1 and lipogenic metabolism in cancer cells through SREBP-1. **Oncogenesis**, v. 4, p. 1–12, 2015.

VAZANOVA, A. *et al.* Differential mRNA expression of the main apoptotic proteins in normal and malignant cells and its relation to *in vitro* resistance. **Cancer cell international**, v. 18, p. 33-43,, 2018.

VIEGAS JUNIOR, C. *et al.* Structural modifications in (-)-Cassine and LASSBio-767: strategies for the discovery and optimization of new drug candidates. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 117-127, 2009.

VIEGAS JUNIOR, C. *et al.* Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1829-1852, 2007.

VO, T. T.; FRUMAN, D. A. INPP4B is a tumor suppressor in the context of PTEN deficiency. **Cancer Discovery**, v. 5, p. 697–700, 2015.

WALSBY, E.J. *et al.* The topoisomerase II inhibitor voreloxin causes cell cycle arrest and apoptosis in myeloid leukemia cells and acts in synergy with cytarabine. **Haematologica**, v. 96, p. 393-399, 2011.

WANG, C. Z. *et al.* MiR-101: A potential therapeutic target of cancers. **American Journal of Translational Research**, v. 10, p. 3310–3321, 2018.

- WANG, L. *et al.* LncRNA TATDN1 contributes to the cisplatin resistance of non-small cell lung cancer through TATDN1/miR-451/TRIM66 axis. **Cancer Biology and Therapy**, v. 20, p. 261–271, 2019.
- WANG, M. *et al.* Effects of mammalian target of rapamycin on proliferation, apoptosis and differentiation of myoblasts undergoing mechanical stress. **American Journal of Translational Research**, v. 10, p. 4173-4182, 2018.
- WANG, Q. H. *et al.* High expression of eukaryotic initiation factor 3M predicts poor prognosis in colon adenocarcinoma patients. **Oncology Letters**, v. 19, p. 876–884, 2020.
- WANG, S. *et al.* Inhibitory Effects of Benzaldehyde, Vanillin, Muscone and Borneol on P-Glycoprotein in Caco-2 Cells and Everted Gut Sac. **Pharmacology**, v. 101, p. 269–277, 2018.
- WANG, Y. *et al.* Mitotic MELK-eIF4B signaling controls protein synthesis and tumor cell survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, p. 9810–9815, 2016.
- WANG, Y. S.; *et al.* Long non-coding RNA CPS1-IT1 is a positive prognostic factor and inhibits epithelial ovarian cancer tumorigenesis. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 21, p. 3169–3175, 2017.
- WEI, C. *et al.* TRIM44 activates the AKT/mTOR signal pathway to induce melanoma progression by stabilizing TLR4. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 38, p. 1–13, 2019.
- WEI, W. *et al.* Dihydroartemisinin triggers c-Myc proteolysis and inhibits protein kinase B/glycogen synthase kinase 3 β pathway in T-cell lymphoma cells. **Oncology Letters**, v. 16, p. 6838–6846, 2018.
- WERMUTH, C. G. Selective optimization of side activities: another way for drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 1303-1314, 2004.
- WERMUTH, C. G. The practice of medicinal chemistry. **Elsevier Science**, terceira edição, cap. 18, 2008.
- WHITEHEAD, T. P. *et al.* Childhood Leukemia and Primary Prevention. **Public Access**. v. 25, p. 1032–1057, 2017.
- WÖHRLE, J. *et al.* Digital DNA microarray generation on glass substrates. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1–9, 2020.
- WOLF, J. *et al.* A mammosphere formation RNAi screen reveals that ATG4A promotes a breast cancer stem-like phenotype. **Breast Cancer Research**, v. 15, p.R109-R122, 2013.
- WRONA, E. *et al.* Leukemia Inhibitory Factor: A Potential Biomarker and Therapeutic Target in Pancreatic Cancer. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 69, p. 2-10, 2021.

WU, C. *et al.* TMEM106a is a novel tumor suppressor in human renal cancer. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 42, p. 853–864, 2018.

WU, Y. *et al.* Interaction between caspase-3 and caspase-5 in the stretch-induced programmed cell death in the human periodontal ligament cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, p. 13571–13581, 2019.

WU, L. *et al.* The deubiquitinating enzyme OTUD1 antagonizes BH3-mimetic inhibitor induced cell death through regulating the stability of the MCL1 protein. **Cancer Cell International**, vol. 19, p. 1–11, 2019.

WU, T.; *et al.* HMGB1 overexpression as a prognostic factor for survival in cancer: A meta-analysis and systematic review. **Oncotarget**, v. 7, p. 50417–50427, 2016.

XIAOGUANG, Z. *et al.* Long noncoding RNA CPS1-IT1 suppresses cell proliferation and metastasis in human lung cancer. **Oncology Research**, v. 25, p. 373–380, 2017.

XIANG, X. *et al.* Q. Expression of HSP90AA1/HSPA8 in hepatocellular carcinoma patients with depression. **OncoTargets and Therapy**, v. 11, p. 3013–3023, 2018.

XIE, C. *et al.* Retinoblastoma cells activate the AKT pathway and are vulnerable to the PI3K/mTOR inhibitor NVP-BE235. **Oncotarget**, v. 8, p. 38084–38098, 2017.

XU, J. *et al.* Long noncoding RNA GMAN promotes hepatocellular carcinoma progression by interacting with eIF4B. **Cancer Letters**, v. 473, p. 1–12, 2020.

XU, Q. *et al.* mTOR regulates cell survival after etoposide treatment in primary AML cells. **Blood**, v. 106, p. 4261–4268, 2005.

XU, T. *et al.* The progression of hmgb1-induced autophagy in cancer biology. **OncoTargets and Therapy**, v. 12, p. 365–377, 2019..

XU, X. *et al.* Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. **Bioscience Reports**, v. 39, p. BSR20180992- BSR20181009, 2019.

XUAN, N. T.; HAI, N. Van. Changes in expression of klotho affect physiological processes, diseases, and cancer. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, p. 3–8, 2018.

YAN, Y. Q. *et al.* Induction of apoptosis and autophagic cell death by the vanillin derivative 6-bromine-5-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde is accompanied by the cleavage of DNA-PKcs and rapid destruction of c-Myc oncoprotein in HepG2 cells. **Cancer Letters**, v. 252, p. 280–289, 2007.

YANG, F. *et al.* MicroRNA-32 inhibits the proliferation, migration and invasion of human colon cancer cell lines by targeting E2F transcription factor 5. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 23, p. 4156–4163, 2019.

YANG, S. W. *et al.* ATG4A promotes tumor metastasis by inducing the epithelial-mesenchymal transition and stem-like properties in gastric cells. **Oncotarget**, v. 7, p. 39279–39292, 2016.

YANG, X. *et al.* Epigenetic modulations of noncoding RNA: a novel dimension of Cancer biology. **Molecular Cancer**, v. 19, p. 64-76, 2020.

YAO, J. *et al.* MicroRNA-215 acts as a tumor suppressor in breast cancer by targeting AKT serine/threonine kinase 1. **Oncology Letters**, v. 14, p. 1097–1104, 2017.

YAO, S. *et al.* Down-regulation of HPGD by miR-146b-3p promotes cervical cancer cell proliferation, migration and anchorage-independent growth through activation of STAT3 and AKT pathways. **Cell Death and Disease**, v. 9, p. 1055-1065, 2018.

YAO, Y. *et al.* Fatty acid 2-hydroxylation inhibits tumor growth and increases sensitivity to cisplatin in gastric cancer. **EBioMedicine**, v. 41, p. 256–267, 2019.

YOO, B. H. *et al.* Oncogenic RAS-induced downregulation of ATG12 is required for survival of malignant intestinal epithelial cells. **Autophagy**, v. 14, p. 134–151, 2018.

YOON, Y. J. *et al.* 2'-Hydroxycinnamaldehyde inhibits proliferation and induces apoptosis via signal transducer and activator of transcription 3 inactivation and reactive oxygen species generation. **Cancer Science**, v. 110, p. 366–378, 2019

YU, L.; CHEN, Y.; TOOZE, S. A. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. **Autophagy**, v. 14, p. 207–215, 2018.

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

YU, Wenxi *et al.* DGKZ Acts as a Potential Oncogene in Osteosarcoma Proliferation Through Its Possible Interaction With ERK1/2 and MYC Pathway. **Frontiers in Oncology**, v. 8, p 655-666, 2019.

YU, X. Y. *et al.* TATDN1 promotes the development and progression of breast cancer by targeting microRNA-140-3p. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 23, p. 5293–5300, 2019.

YU, Xiaolan. *et al.* Baicalein inhibits breast cancer growth via activating a novel isoform of the long noncoding RNA PAX8-AS1-N. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, p. 6842–6856, 2018.

ZAGNI, C. *et al.* Hydroxamic Acid-Based Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors Bearing a Pyrazole Scaffold and a Cinnamoyl Linker. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 945-960, 2019.

ZEQUN, N. *et al.* The role and potential mechanisms of LncRNA-TATDN1 on metastasis and invasion of non-small cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 7, p. 18219–18228, 2016.

ZHANG, J.; NEY, P. A. Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, p. 939–946, 2009.

ZHANG, W. *et al.* LncRna CPS1-IT1 Suppresses Cell Proliferation, Invasion and Metastasis in Colorectal Cancer. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 567–580, 2017.

ZHANG, Z. *et al.* Breast cancer metastasis suppressor OTUD1 deubiquitinates SMAD7. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–16, 2017.

ZHAO, Y. *et al.* Racial Differences in Four Leukemia Subtypes: Comprehensive Descriptive Epidemiology. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1–10, 2018.

ZHENG, Y. *et al.* Metallothionein 1H (MT1H) functions as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma through regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway. **BMC cancer**, v. 17, p. 161-172, 2017.

ZHUANG, Y. *et al.* Upregulation of AIOLOS induces apoptosis and enhances etoposide chemosensitivity in Jurkat leukemia cells. **Oncology Reports**, v. 33, p. 1319-1325, 2015.

ZHOU, Y. *et al.* HYOU1, regulated by LPLUNC1, is up-regulated in nasopharyngeal carcinoma and associated with poor prognosis. **Journal of Cancer**, v. 7, p. 367–376, 2016.

ZHOU, Z. *et al.* Epigenetic regulation of long non-coding RNAs in gastric cancer. **Oncotarget**, v. 9, p. 19443–19458, 2017.

ZHU, X. *et al.* High expression of TRIM44 is associated with enhanced cell proliferation, migration, invasion, and resistance to doxorubicin in hepatocellular carcinoma. **Tumor Biology**, v. 37, p. 14615–14628, 2016.