

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

HIGOR DE OLIVEIRA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGONISTA DA INTERAÇÃO P53-
MDM2 DO COMPOSTO LQFM030 FRENTE À LINHAGEM TUMORAL K562**

Goiânia
2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

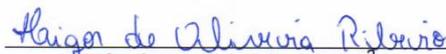
Nome completo do autor: Higor de Oliveira Ribeiro

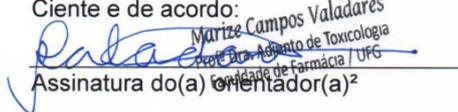
Título do trabalho: Avaliação do potencial antagonista da interação p53-MDM2 do composto LQFM030 frente à linhagem tumoral K562.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:

Marize Campos Valadares
Prof. Dra. Adjunta de Toxicologia
Departamento de Farmácia / UFG
Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 16 / 07 / 2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

HIGOR DE OLIVEIRA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGONISTA DA INTERAÇÃO P53-
MDM2 DO COMPOSTO LQFM030 FRENTE À LINHAGEM TUMORAL K562**

Dissertação de Mestrado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal
de Goiás para obtenção do Título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marize Campos
Valadares.

Goiânia

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ribeiro, Higor de Oliveira

Avaliação do potencial antagonista da interação p53-MDM2 do composto LQFM030 frente à linhagem tumoral K562 [manuscrito] / Higor de Oliveira Ribeiro. - 2016.
LXXVI, 76 f.: il.

Orientador: Prof. Prof. Dra. Marize Campos Valadares; co orientador Prof. Dra. Alane Pereira Cortez.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), , Goiânia, 2016.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Apoptose. 2. LQFM030. 3. Ciclo Celular. 4. Nutlin-3a. I. Campos Valadares, Prof. Dra. Marize, orient. II. Título.

CDU 615



Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



ATA DA SEÇÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aluno (a): Higor de Oliveira Ribeiro

Orientador (a): Profa. Dra. Marize Campos Valadares

Título da Dissertação: "Avaliação do potencial antagonista da interação P53-MDM2 do composto LQFM030 frente à linhagem tumoral K562".

Data: 12 de dezembro de 2016

Horário: 14:00 horas

Local: Sala da pós-graduação/anexo II da Faculdade de Farmácia

Sugestões*:

*Obs: sugestão de alteração de título da dissertação deve ser acompanhada de justificativa.

antes as sugestões de banca. Realize uma
revisão final do trabalho do trabalho.

Parecer da Banca Examinadora

Membro	Aprovado/R eaprovado	Assinatura
Profa. Dra. Marize Campos Valadares (FF/UFG) - Presidente	Aprovado	Marize Campos Valadares
Prof. Dr. Paulo Emilio Corrêa Leite (UFRJ)	Aprovado	Paulo Emilio Corrêa Leite
Dra. Thais Leite Nascimento (FF/UFG)	Aprovado	Thais Leite Nascimento
Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira (FF/UFG) - Suplente		

Parecer Final	Aprovado/Reprovado
	Aprovado

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela vida, pela sabedoria, por todas as minhas conquistas pessoais e profissionais, e por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais, que me ajudaram e me motivaram na realização deste mestrado e desta dissertação e por ter iluminado durante toda essa caminhada.

A meus pais Luiz Carlos Ribeiro e Aricelma Batista de Oliveira Ribeiro, pelo incentivo durante minha vida de estudante. Agradeço por acreditarem que esse dia iria chegar e por todo amor dedicado a mim.

A minha companheira Herika Maria de Jesus Gomes, pelo carinho e paciência. Sem ela não sei o que seria da minha vida. Te amo!

A Profa. Dr. Marize Campos Valadares, minha orientadora, pela dedicação, incentivo, oportunidade, orientação e paciência.

A Profa. Dr. Alane Pereira Cortez pela disponibilidade em ajudar e por todos os conhecimentos que tanto me ajudaram. E por sempre me ensinar a generosidade para com os outros e pelo saber de educar. Muito Obrigado!

Aos colegas do LFTC, que compartilharam alegrias, angústias, conhecimentos, ideias. Especialmente ao amigo Renato Ivan de Ávila por todas as ajudas e dicas durante os experimentos de citometria de fluxo e pelas dicas para a composição da dissertação.

A secretária Fernanda Maura Ferreira Bellato pela atenção, cuidado, paciência, carinho e prontidão em sempre nos atender e ajudar.

As instituições CAPES, CNPq, FAPEG, FINEP e FUNAPE pelo apoio financeiro.

Por fim a todos que têm confiança e admiração em mim e que torcem pelo meu sucesso, meu muito obrigado.

*"Desista..!
Não ! Desista você , De tentar me fazer desistir ! "*

Masashi Kishimoto

Resumo

O câncer engloba uma variedade enorme de tipos diferentes, sendo necessárias diversas abordagens terapêuticas para controle e/ou remissão. Uma abordagem considerada bastante promissora é a inibição da formação do complexo MDM2/p53. A formação deste complexo dificulta o desencadeamento do processo apoptótico. Já se encontra em fase clínica de investigação um exemplo promissor inibidor deste complexo, os Nutlins. O composto LQFM030 foi originado a partir da simplificação molecular do Nutlin-1, o qual já demonstrou atividade antitumoral contra o modelo do Tumor Ascítico de Ehrlich. Neste trabalho, investigamos mecanismos de citotoxicidade do composto LQFM030 na linhagem leucêmica K562. Na avaliação da citotoxicidade utilizando o método de exclusão do azul de tripano, obtivemos um valor de IC₅₀ de 0,56 mM, similar a resultados obtidos anteriormente. Para os demais ensaios mecanísticos, foi utilizado o IC₂₅ (0,283 mM) do composto LQFM030 e 0,01 mM do composto Nutlin-3a, para tratamento por 24 horas. O composto Nutlin-3a foi utilizado como padrão de comparação. As análises morfológicas das células K562 após o tratamento com o composto LQFM030 demonstrou fragmentação do núcleo e a condensação da cromatina, indicando morte celular desencadeada por apoptose, onde juntamente com citometria de fluxo indicam um processo de morte celular. Na investigação do ciclo celular, as células K562 tratadas com LQFM030 demonstraram um aumento da fase sub-G1, exposição da fosfatidilserina, diminuição do potencial de membrana mitocondrial, aumento da expressão de TNF-R1, caspases -3/7 e caspase -9; contudo, houve diminuição da caspase -8. Por sua vez, o tratamento das células leucêmicas com o Nutlin-3a não promoveu alterações no ciclo celular, exposição de fosfatidilserina corroborando com dados da literatura. Em conclusão o composto estudado, LQFM030, apresentou atividade biológica importante com capacidade de induzir morte em células leucêmica por mecanismos apoptóticos e interação com MDM2 e MDMX. O composto apresentou mecanismos em alguns aspectos semelhantes ao Nutlin-3a, porém também mostrou mecanismos distintos evidenciando a sua versatilidade em sua atuação biológica. A descoberta de novos agentes com múltiplos mecanismos é de grande importância para aumentar o arsenal terapêutico de combate ao câncer de forma complementar e, podendo ainda potencializar eficácia do tratamento.

Palavras chave: Apoptose, LQFM030, Ciclo Celular, Nutlin-3a

Abstract

The cancer encompasses a huge range of different types, requiring several therapeutic approaches for control and/or remission. An approach that has been considered quite promising is the inhibition of the formation of the MDM2/p53 complex. The formation of this complex hinders the triggering of the apoptotic process. The example of the Nutlins, inhibitors of this complex, have stood out as promising prototype drugs and are already in the clinical phase of investigation. The compound LQFM030 originated from the molecular simplification of Nutlin-1, which has already demonstrated antitumor activity against the Ehrlich Ascites Tumor model. In this work, we investigated the cytotoxic effect of compound LQFM030 against the K562 leukemic line, as well as some mechanisms of cytotoxicity. In the evaluation of cytotoxicity using the trypan blue exclusion method, we obtained an IC₅₀ value of 0.56 mM, similar to results obtained previously. For the other mechanics assays, IC₂₅ (0.283 mM) of compound LQFM030 and 0.01 mM of compound Nutlin-3a were used for treatment for 24 hours. The compound Nutlin-3a was used as the standard for comparison. Morphological analyzes of K562 cells after treatment with compound LQFM030 suggest core fragmentation and chromatin condensation, indicating apoptosis triggered cell death, which was confirmed by flow cytometric analyzes. In cell cycle investigation, LQFM030 treated K562 cells demonstrated increased sub-G1 phase, phosphatidylserine exposure, decreased membrane potential, increased expression of TNF-R1 and caspase -3/7 caspase -9; However, there was a decrease in caspase -8. In turn, the treatment of leukemic cells with Nutlin-3a did not promote changes in the cell cycle, exposure of phosphatidylserine corroborating with data from the literature. In conclusion the studied compound, LQFM030, presented important biological activity with the capacity to induce death in leukemic cells by apoptotic mechanisms and interaction with MDM2 and MDX. The compound presented mechanisms in some aspects similarities to Nutlin-3a, but also showed different mechanisms evidencing its versatility in its biological performance. The discovery of new agents with multiple mechanisms is of great importance to increase the therapeutic armamentarium of cancer in a complementary way and, in addition, it can enhance the effectiveness of the treatment.

Keywords: Apoptosis, LQFM030, Cell Cycle, Nutlin-3a

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. CÂNCER.....	19
1.1.2. LEUCEMIA.....	19
1.2. CICLO CELULAR.....	20
1.3. MECANISMO DE MORTE CELULAR.....	22
1.4. APOPTOSE.....	23
1.5. DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER.....	25
1.5.1. INIBIDORES DE MDM2.....	26
1.5.2. LQFM030.....	28
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. OBJETIVO GERAL.....	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3. METODOLOGIA.....	32
3.1. MATERIAL UTILIZADO.....	33
3.1.1. FÁRMACOS, DILUENTES, ANTICORPOS, SOLUÇÕES E CORANTES.....	33
3.1.2. EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS.....	34
3.2. PREPARO DA EMULSÃO DO COMPOSTO LQFM030.....	35
3.3. NUTLIN-3A.....	35
3.4. CULTURA CELULAR DA LINHAGEM K562.....	37
3.5. ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE.....	36
3.6. ANÁLISES DE EXPRESSÃO PROTEICA UTILIZANDO A TÉCNICA DA CITOMETRIA DE FLUXO.....	37
3.6.1. PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR.....	38
3.6.2. AVALIAÇÃO DAS CASPASES -3/7, -8 E -9.....	39
3.6.3. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL.....	40
3.6.4. AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS P27 SC1641 E NF-KB SC8414.....	41
3.6.5. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TNF-R1.....	42
3.6.6. ENSAIO DE APOPTOSE (ANEXINA V-FITC/IODETO DE PROPÍDEO).....	43

3.7.	ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR.....	44
3.7.1.	CITOCENTRIFUGAÇÃO.....	44
3.7.2.	MORFOLOGIA NUCLEAR.....	45
3.8.	PCR-RT.....	47
3.8.1.	EXTRAÇÃO DO RNA.....	47
3.8.2.	AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE E QUANTIFICAÇÃO DO RNA.....	48
3.8.3.	TRATAMENTO DO RNA TOTAL COM A DNASE.....	48
3.8.4.	TRANSCRIÇÃO DE CDNA.....	48
3.8.5.	PADRONIZAÇÃO DOS GENES CASPASES -3/7, -8 E -9 MDMX, P73, C-MYC E NF-KB PELA TÉCNICA DE RT-QPCR.....	49
3.9.	WESTERN BLOT.....	50
4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5.	RESULTADOS.....	53
5.1.	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO MTT.....	53
5.2.	ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA.....	53
5.3.	ANÁLISE DO CICLO CELULAR.....	54
5.4.	ANÁLISE DA EXTERNALIZAÇÃO DA FOSFATIDILSERINA.....	55
5.5.	ANÁLISE DO POTENCIAL MITOCONDRIAL.....	56
5.6.	ANÁLISE DA ATIVIDADE DAS CASPASES -3/7, -8, -9.....	57
5.7.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P27.....	60
5.8.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TNF-R1.....	62
5.9.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MDM2.....	63
5.10.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MDMX, P73, C-MYC E NF-KB... 	63
6.	DISCUSSÃO.....	66
7.	CONCLUSÃO.....	71
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Esquema demonstrando a divisão dinâmica do ciclo celular. Fonte: O autor.....	20
Figura 2. Divisão didática de morte celular. Fonte: O autor.....	21
Figura 3. Características bioquímicas das vias de apoptose. A Figura 3-a demonstra a via extrínseca de apoptose através dos estímulos dos receptores de morte, com posterior ativação da caspase -8, desencadeando a via de apoptose através da ativação das caspases efetores -3, -6 e -7. A Figura 3-b demonstra a condição de estresse celular, que levam a ativação da via intrínseca pela permeabilização da membrana mitocondrial, inibição da síntese de ATP e consequentemente da respiração mitocondrial. Esse processo aciona um conjunto de proteínas que levam a ativação das caspases -3 e -9 desencadeando o processo de apoptose. Fonte: <i>Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death</i> ; GALLUZZI et al., 2012.....	24
Figura 4: Simplificação molecular do composto Nutlin-1 dando origem ao composto LQFM030. Fonte: <i>Induction of apoptosis in Ehrlich ascites tumour cells via p53 activation by a novel small-molecule MDM2 inhibitor–LQFM030</i> ; MOTA et al., 2016.....	29
Figura 5: Fluxograma representando o delineamento experimental deste trabalho.....	32
Figura 6: Fluxograma representando o procedimento para avaliação da análise de citotoxicidade do composto LQFM030.....	37
Figura 7: Fluxograma representando o procedimento para progressão do ciclo celular do composto LQFM030.....	39
Figura 8: Fluxograma representando o procedimento para avaliação da atividade das caspases -3/7,-8 e -9 do composto LQFM030.....	40
Figura 9: Fluxograma representando o procedimento para avaliação da função mitocondrial.....	41

Figura 10: Fluxograma representando o procedimento para avaliação das proteínas p27 e NF-kB.....	42
Figura 11: Fluxograma representando o procedimento para avaliação do fator de necrose tumoral.....	43
Figura 12: Fluxograma representando o procedimento para ensaio de apoptose.....	44
Figura 13: Fluxograma representando o procedimento da citocentrifugação.....	45
Figura 14: Fluxograma representando o procedimento de coloração pelo corante Hoechst 33342.....	46
Figura 15: Fluxograma representando o procedimento de coloração pelo corante May Grünwald Giemsa.....	47
Figura 16. Viabilidade de células da linhagem tumoral K562 após 24 h de exposição em diferentes concentrações do composto LQFM030 (0,01 – 1,56 mM).....	53
Figura 17. Análise morfológica da linhagem tumoral K562, utilizando os respectivos corantes: May-Grünwald-Giemsa (A, B e C) e Hoesch 33342 (D, E e F), comparadas ao grupo controle não tratado (A e D), grupo tratado com o composto LQFM030 (0,283 mM) (B e E), e grupo tratado como o composto Nultin-3a (0,01 mM) (C e F), com tempo de tratamento de 24 horas.....	54
Figura 18. Alteração do ciclo celular após 24 horas de tratamento das células K562 com os compostos LQFM030 (0,283 mM) e Nultin-3a (0,01 mM) após 24 horas. Representação do percentual de células na fase sub-G1, S e G2/M quando comparados ao controle. (b) Comparação da intensidade de fluorescência do FITC entre células tratadas e não tratadas. As barras representam à média e desvio padrão de três experimentos independentes (* $p < 0.05$ comparado com o controle).....	54

Figura 19. Avaliação de apoptose das células K562 tratadas com os compostos LQFM030 (0,283 mM) e Nutlin-3a (0,01 mM) após 24 horas de exposição. Os dados são representados pelo percentual de células marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídio. (b) Comparação da intensidade de fluorescência do FITC entre células tratadas e não tratadas. As barras representam à média e desvio padrão de três experimentos independentes (* $p < 0.05$ comparado com o controle).....56

Figura 20. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em células K562 não tratadas e tratadas com o composto LQFM030 (0,283 mM) e com o composto Nutlin-3a (0,01 mM) após 24h de exposição. Os dados são representados pela média da intensidade de fluorescência de células marcadas com o corante MitoTracker® Red. (a) Histogramas mostrando a contagem de fluorescência (eixo x) X (eixo y). (b) Comparação da intensidade de fluorescência do FITC entre células tratadas e não tratadas. As barras representam à média e desvio padrão de três experimentos independentes (* $p < 0.05$ comparado com o controle).....57

Figura 21. Avaliação da atividade das caspases -3/7 (a), -8 (b) e -9 (c) em células K562 não tratadas e tratadas com o composto LQFM030 (0,283 mM) e com o composto Nutlin-3a (0,01 mM) após 24h de exposição. Os dados são representados pelo percentual de células marcadas com seu respectivo anticorpo e comparados ao controle. (d) Comparação da intensidade de fluorescência do FITC entre células tratadas e não tratadas. (e) Detecção por PCR em Tempo Real da alteração da expressão do mRNA das caspases -3/7, -8, -9. Os genes foram normalizados com o HPRT1 e a análise foi feita por delta delta ct. As barras representam à média e desvio padrão de três experimentos independentes (* $p < 0.05$ comparado com o controle).....59

Figura 22. Avaliação da expressão da proteína p27 em células K562 não tratadas e tratadas com o composto LQFM030 (0,283 mM) e com o composto Nutlin-3a (0,01 mM) após 24h de exposição. Os dados são representados pelo percentual de células marcadas com seu respectivo anticorpo e comparados ao controle. (b) Comparação da intensidade de fluorescência do FITC entre células tratadas e não tratadas. As barras representam à média e desvio padrão de três experimentos independentes (* $p < 0.05$ comparado com o controle).....60

Figura 23. Avaliação da expressão da proteína TNF-R1 em células K562 não tratadas e tratadas com o composto LQFM030 (0,283 mM) e com o composto Nutlin-3a (0,01 mM) após 24h de exposição. Os dados são representados pelo percentual de células marcadas com seu respectivo anticorpo e comparados ao controle. As barras representam a média do desvio padrão do experimento repetido três vezes (* $p < 0.05$ comparado com o controle).....62

Figura 24. Avaliação da expressão da proteína MDM2 em células K562 não tratadas e tratadas com o composto LQFM030 (0,283 mM) e com o composto Nutlin-3a (0,01 mM) após 24h de exposição.....63

Figura 25. Avaliação da expressão dos transcritos MDMX, p73, c-Myc e NF-kB em células K562 não tratadas e tratadas com o composto LQFM030 (0,283 mM) após 24h de exposição. O gene normalizador foi HPRT1 e as análises foram feitas pelo método delta delta ct (LIVAK et al., 2001). As barras representam a média do desvio padrão do experimento repetido três vezes (* $p < 0.05$ comparado com o controle).....65

Tabela 1. Sequência de “*primers*” utilizados na reação de polimerização em cadeia após transcrição reversa quantitativa.....49

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVEATURAS

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
ATCC	American Type Culture Collection
CDK	Quinases ciclina-dependentes (cyclin-dependent kinase)
c-MYC	Gene relacionado ao processo de apoptose
CML	Leucemia Mieloide Crônica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNp63	Isoforma delta-N da proteína p63
DNp73	Isoforma delta-N da proteína p73
E2F1	Fator de transcrição do ciclo celular
FAS	Receptor de superfície envolvido na ativação de apoptose
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Isotiocinato de fluoresceína (fluorescein isothiocyanate)
FSC	Forward Scatter Channel
GADD-45	Gene Growth Arrest DNA Damage Inducible
GHS	Global Harmonized System
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC50	Concentração inibitória de 50% da população de células
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IP	Iodeto de propídio
LQFM	Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal
Mdm2	Antagonista de p53 (murine double minute 2)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difenil brometo de tetrazolium

NF-kappaB	Fator nuclear do locus κ de imunoglobulina em células B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
OMS	Organização Mundial da Saúde
P21	Proteína p21
P27	Proteína p27
P53	Proteína p53
P57	Proteína p57
PBS	Tampão fosfato salina (phosphate buffer saline)
PBS-BSA	PBS com albumina sérica bovina
PBS-Tween 20	PBS com 0,05% de tween 20
PhRMA	Pharmaceutical Research and Manufacturers of America
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
SFB	Soro fetal bovino
SSC	Side Scatter Channel
TAp63	isoforma TA da proteína p63
TAp73	Isoforma TA da proteína p73
TNFR	Fator de necrose tumoral (tumor necrosis fator)
TNF-R1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
TP53	Gene p53
TP63	Gene p63
TP73	Gene p73
TRADD	receptor 1 de TNF associado ao domínio de morte (TNF-associated death domain)
TRAIL	Ligante relacionado ao fator de necrose tumoral

1. Introdução

1.1. Câncer

O câncer é um conjunto de doenças genéticas que tem como resultado comum o crescimento celular de forma desordenado, no qual algumas células apresentam a capacidade de invadir tecidos e órgãos, apresentam funções normais anormais e conseqüentemente, interferem nas funções dos órgãos (JÚNIOR et al., 2002; SACOMAN, 2007; INCA, 2016).

De acordo com a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, International Agency for Research on Cancer) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), na última década ocorreu um aumento de 20% na incidência de câncer no mundo, sendo que esse aumento pode alcançar a marca de aproximadamente 60% até o ano de 2030. Uma pesquisa conduzida pelo INCA no início do ano de 2016, válida para os anos de 2016 e 2017, demonstra que a estimativa de ocorrência de novos casos de câncer é cerca de 600 mil novos casos para o Brasil nesses respectivos anos. Esses dados demonstram que o câncer é um problema de saúde pública, cuja ação para prevenção, orientações sobre a doença e formas de tratamento são necessárias para a população (SIEGEL et al., 2011, INCA 2016).

O câncer é classificado de acordo com o tecido e/ou tipo de célula de origem. Os cânceres derivados de tecidos epiteliais são chamados de carcinomas e correspondem cerca de 90% dos cânceres humanos. Os derivados do tecido conjuntivo ou de tecidos musculares são chamados de sarcomas. Por sua vez, os cânceres que não se enquadram em nenhuma dessas categorias, como as leucemias e linfomas derivados de células hematopoiéticas e cânceres de origem das células do sistema nervoso representam cerca de 7% dos tipos de cânceres (ALBERTS et al., 2010).

1.1.2. Leucemia

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa caracterizada pela neoplasia de células pluripotentes da medula óssea e constitui 14% de todas as leucemias, com índice anual de 1,6 novos casos por 100 mil indivíduos, ocorrendo com maior frequência em adultos entre 25 e 60 anos de ambos os sexos, porém com predominância no sexo masculino (BERGANTINI et al., 2005; ASTER, 2008).

Sua origem está relacionada a alterações genéticas adquirida no cromossomo Philadelphia (cromossomo Ph), resultado de uma anormalidade que move o gene *ABL* do cromossomo 9 para uma posição do cromossomo 22 adjacente ao gene *BCR*. Esta fusão de pedaços de cromossomos é chamada de gene *BCR-ABL* (INCA, 2016; ASTER, 2008).

O tratamento inicial da LMC pode ser realizado com hidroxiuréia, interferon- α , mesilato de imatinibe (Glivec®) e transplante alogênico de medula óssea. Um fator desfavorável ao tratamento é o grande número de mutações no sítio ativo da proteína *BCR-ABL*, que impede o efeito dos medicamentos relacionados ao tratamento e causa resistência aos mesmos. Como consequência, os pacientes portadores dessa doença, sofrem recaídas e seu quadro pode evoluir mais facilmente para outras fases da doença (CONDUTAS DO INCA, 2003; ASTER, 2008).

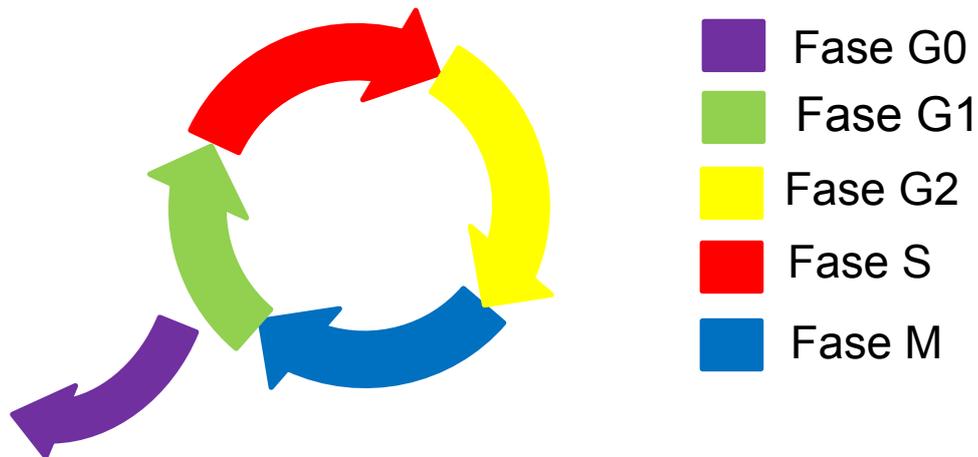
Além da resistência aos medicamentos, os inúmeros efeitos colaterais e reações adversas relacionadas à toxicidade dos medicamentos são outros problemas relacionados aos tratamentos convencionais da LMC. Neste contexto, diversos grupos de pesquisa trabalham na busca de novos candidatos a fármacos com potencial antileucêmico, que apresentem maior diversidade de mecanismos de indução de morte celular, com atuação nos diferentes estágios do ciclo celular e preferencialmente com menor toxicidade.

1.2. Ciclo Celular

O ciclo celular é um processo ordenado pelo qual as células somáticas se multiplicam, dividem seu material genético e originam duas células-filhas. Esse processo requer a presença de um importante mecanismo de controle que assegure que a divisão celular ocorra de maneira adequada (MALUMBRES; BARBCID, 2009).

Como conhecido, o ciclo celular é dividido em duas grandes etapas, apresentadas na Figura 1. A primeira etapa, a interfase, é dividida em fases denominadas: G₀, G₁, S e G₂, onde ocorre a duplicação do DNA e a preparação para a próxima etapa: a cariocinese ou mitose, na qual ocorre a fase M responsável pela finalização da divisão celular. O ciclo celular possui pontos de verificação em que a próxima fase só ocorre quando os processos fisiológicos da fase anterior estão finalizados. Em caso de erros durante processo de multiplicação, o ciclo celular pode ser atrasado ou interrompido (BARTEK; LUKAS, 2001).

Figura 1: Esquema demonstrando a divisão dinâmica do ciclo celular. Fonte: O autor.



Na interfase, o momento G0 (do inglês, *gap*, intervalo) do ciclo celular, as células estão em repouso, e não há atividade para estímulo do crescimento celular. Na fase G1, as células sofrem estímulos para aumentar de tamanho e iniciar o processo de divisão celular (EKHOLM et al., 2001). Na fase S, fase de síntese, ocorre a duplicação do material genético da célula, e ocorre também o “*checkpoint*” que assegura uma cópia idêntica do material genético da célula mãe na síntese do novo DNA. Na fase G2 do processo de crescimento celular ocorre a síntese de RNA, de proteínas e de outras estruturas necessárias para o início da divisão. Nesta fase, também se inicia a condensação da cromatina, que facilitará as fases de mitose. Esta fase basicamente prepara a célula para a divisão e o “*checkpoint*” dessa fase tem o intuito de analisar se a célula está pronta para se dividir. A divisão propriamente dita ocorre na fase M, fase da Mitose. Nesta fase, o DNA duplicado é separado e enviado a cada uma das células filhas, ocorrendo enfim a divisão da célula originando as células-filhas (SHERR, 2002).

O controle do ciclo celular é realizado por um grupo de genes que regulam a estabilidade e o reparo do DNA, assim como o crescimento celular. Um grupo de ciclinas e cinases dependentes de ciclinas (CDK) atua no controle primário do ciclo celular. Os complexos ciclinas-CDK, por sua vez, são também regulados pelos inibidores de ciclinas cinase-dependentes. Entre os inibidores de ciclinas cinase-dependentes, estão as proteínas p21, p27 e p57 que atuam na progressão do ciclo celular da fase G1 para S (ROY & BANERJEE, 2015).

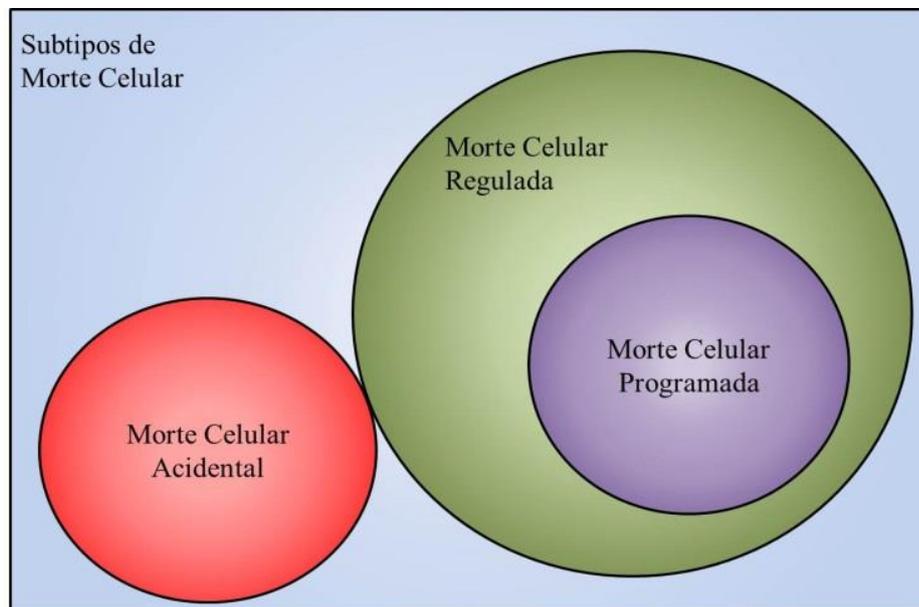
Além dos inibidores do ciclo celular, outras oncoproteínas também estão envolvidas na ativação do ciclo celular e sua inativação ou mesmo a diminuição leva a parada do ciclo celular como a proteína c-Myc. Em muitos tumores c-Myc está desregulada e superexpressa, e

atua hiperativando os complexos ciclina-CDK e antagonizando a atividade dos inibidores do ciclo celular p21 e p27 (BRETONES et al., 2015).

1.3. Mecanismo de Morte Celular

A morte celular pode ser classificada em duas categorias mutuamente exclusivas: morte acidental e morte regulada (Figura 2). A primeira é causada por alterações graves, incluindo físicos, químicos e mecânicos e é insensível a qualquer abordagem farmacológica ou genética. Já a morte regulada envolve todo o maquinário molecular (organelas, genes e proteínas) distintos para cada processo de morte e este pode sofrer alterações a intervenções farmacológicas. A morte celular programada (apoptose) é um dos possíveis tipos que ocorre como parte de um programa de desenvolvimento ou para preservar a homeostase do organismo (GALLUZI et al., 2015).

Figura 2. Divisão didática de morte celular. Fonte: O Autor.



Entre os diferentes tipos de morte celular programada, a autofagia, a necroptose e apoptose têm sido as mais estudadas. Na autofagia, as células eucarióticas em resposta a um estímulo estressante ou mesmo durante o desenvolvimento, ativam o processo inicial de morte. Nesse mecanismo, as organelas e porções do citoplasma são sequestrados em autofagossomos e entregues aos lisossomos para degradação (GALLUZI et al., 2012).

A necroptose é marcada pela tumefação celular e das organelas, formação extensiva de vacúolos intracelulares e ruptura rápida da membrana plasmática, além da ausência dos marcadores clássicos de apoptose, como condensação de cromatina e fragmentação nucleossomal de DNA (GALLUZI et al., 2012). Inicialmente pensava-se que a necroptose era apenas acidental, sem um mecanismo molecular definido. Porém, nos últimos anos ficou claro que a necrose pode ocorrer de forma regulada e está envolvida em múltiplos processos fisiológicos e patológicos (GALLUZI et al., 2012).

Por sua vez, a apoptose é um processo de morte celular programada, induzida por estímulos fisiológicos e altamente regulada por ativação de enzimas. Esse processo é conduzido por ativação de caspases, que não desencadeiam uma resposta inflamatória, porém causam alterações morfológicas e bioquímicas em células individuais (BERGANTINI et al., 2005; BRAS et al., 2005). Morfologicamente, as células apoptóticas são caracterizadas pela diminuição do volume celular, ocorrido devido às alterações no citoesqueleto (contração do citoplasma e agrupamento das organelas); condensação e agregação da cromatina na periferia do núcleo; condensação do núcleo, que muitas vezes pode se romper em vários fragmentos; fragmentação do DNA, aumento da permeabilidade mitocondrial; formação de bolhas no citoplasma e corpos apoptóticos; ausência de reações inflamatórias graves e sem perder a integridade da membrana (LIAO et al., 2005; YASUHARA et al., 2003).

1.4. Apoptose

O termo apoptose tem origem grega, que se significa “a queda das folhas das árvores no outono”, referenciando “a morte celular programada ou renovação”. O processo de apoptose foi primeiramente descrito por Kerr e colaboradores em 1972, baseado em um processo de morte celular que permite a eliminação segura e controlada das células (KERR et al., 1972).

O processo de apoptose ocorre em eventos patológicos e em eventos fisiológicos. Ela é uma estratégia padrão que pode ser desencadeada para eliminação de células senescentes ou envelhecidas, células infectadas por vírus e até mesmo para eliminação de células com lesões ou mutações ou danos irreparáveis no DNA, com características distintas da necroptose (DESAGUER & MARTINOU, 2000). A desregulação desse processo pode interromper o

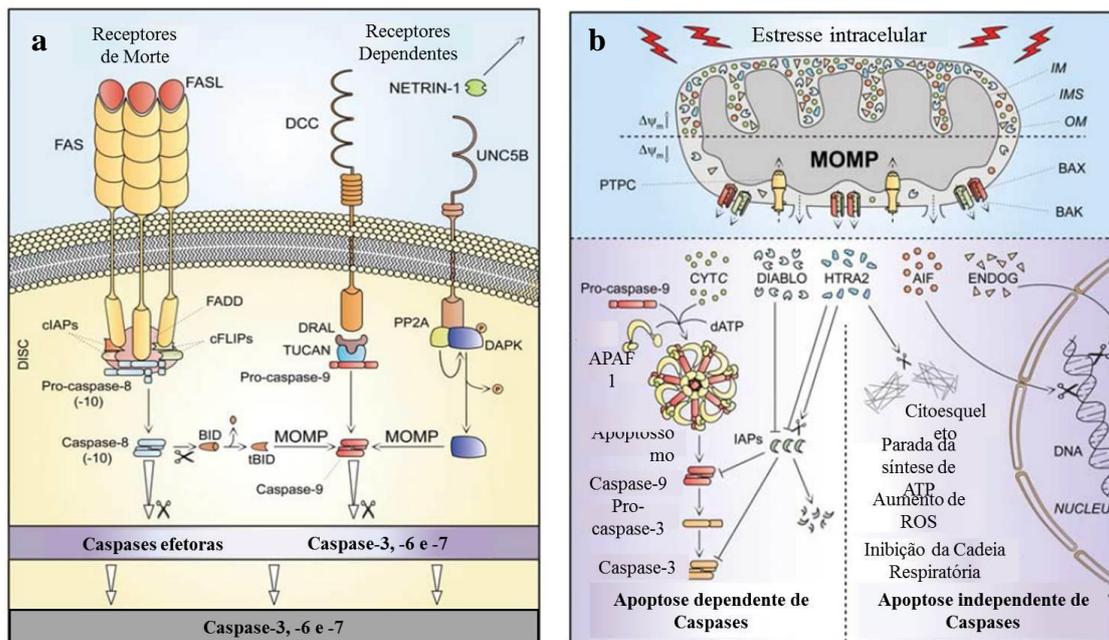
equilíbrio entre proliferação e morte celular, e, dessa forma, acarretar o surgimento e crescimento de tumores ou até mesmo do câncer.

A apoptose é marcada por várias alterações morfológicas nas células afetadas, como: diminuição do citoplasma; manutenção da integridade da membrana plasmática; condensação e agregação da cromatina na periferia do núcleo e fragmentação do mesmo; condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos (uma extensão da membrana plasmática com a formação de bolhas, denominadas “blebs”, que aumentam de número e tamanho até a completa ruptura da célula); fragmentação do DNA, e aumento da permeabilidade mitocondrial (LIAO et al., 2005; YASUHARA et al., 2003; KROEMER et al., 2007; HAIL et al., 2006).

Em casos de danos irreparáveis ao DNA, a apoptose é a principal escolha de tipo de morte celular. Para que tal fato ocorra, existem duas vias principais de indução de apoptose: a via extrínseca e a via intrínseca ou via mitocondrial (EUM E HAJRA & LIU, 2004; LEE, 2011). Durante o processo de apoptose, uma família de enzimas pertencentes à família das cisteíno-proteases são sintetizadas e convertidas para a forma ativa por clivagem proteolítica. O fator diferencial entre as duas vias são as características bioquímicas ativadas em cada uma delas, como descrito na Figura 3. (PORTT et al., 2011).

Para que ocorra o processo de apoptose pela via extrínseca, os receptores da morte devem ser estimulados pela família de proteínas: TNFR, TNFR1, Fas e TRAIL (PORTT et al., 2011). Em seguida, a ativação desses receptores leva ao recrutamento e ativação das caspases. Já o processo de apoptose pela via intrínseca é mediado pelas mitocôndrias. Porém, tanto a via extrínseca quanto a via intrínseca possuem grupos de caspases que são divididas em iniciadoras e efetoras. As iniciadoras convergem sinais para o grupo de caspases efetoras para que esse grupo possa executar o evento que resultará no processo de apoptose (HAJR E LIU, 2004; HAIL et al., 2006).

Figura 3. Características bioquímicas das vias de apoptose. A Figura 3-a demonstra a via extrínseca de apoptose através dos estímulos dos receptores de morte, com posterior ativação da caspase -8, desencadeando a via de apoptose através da ativação das caspases efetoras -3, -6 e -7. A Figura 3-b demonstra a condição de estresse celular, que levam a ativação da via intrínseca pela permeabilização da membrana mitocondrial, inibição da síntese de ATP e consequentemente da respiração mitocondrial. Esse processo aciona um conjunto de proteínas que levam a ativação das caspases -3 e -9 desencadeando o processo de apoptose. Fonte: *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death; Galluzzi et al., 2012.*



As caspases iniciadoras, como as caspases -8 e -9 clivam proformas inativas das caspases efetoras, como as caspases -3 e -7, que por sua vez, clivam proteínas que resultam no início de apoptose (HAJRA & LIU, 2004; ZHANG et al., 2004).

1.5. Desenvolvimento de fármacos para o tratamento do câncer

Tratamentos inovadores com novos fármacos para câncer têm proporcionado um aumento significativo na taxa de sobrevivência dos pacientes nas últimas décadas, chegando a um aumento de 50%, em cinco anos, para pacientes com hiperplasia prostática. Desde 1991, a taxa de mortalidade diminuiu em 20% e a taxa de sobrevivência para pacientes com leucemia quase triplicou (PhRMA, 2014).

Segundo a PhRMA (Pharmaceutical Research and Manufacturers of America) de 2000 a 2015, mais de 500 novos medicamentos foram aprovados pela Agência Americana FDA (U.S. Food and Drug Administration) para tratamento do câncer. Ainda em 2015, 836

medicamentos e vacinas contra o câncer estavam sendo desenvolvidos em fase clínica ou submetidos à aprovação do FDA.

O desenvolvimento de novos fármacos é laborioso e requer pelo menos 10 anos para que um novo medicamento saia do planejamento inicial para o mercado, sendo que os ensaios clínicos levam em média 6 anos. Além do planejamento e pesquisa/experimentação, o desenvolvimento de um novo fármaco requer a investigação pré-clínica da eficácia, toxicidade e perfis fármaco/toxico cinéticos utilizando modelos experimentais, *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (PRASAD et al., 2016). O custo médio total do desenvolvimento de um medicamento de sucesso está estimado em 2,6 bilhões de dólares. Dos milhares de compostos que são avaliados, menos de 12% são eventualmente aprovados para estudos clínicos (PhRMA, 2015). Essa baixa porcentagem, pode ser ainda maior na clínica, em decorrência da falha em detectar a falta de eficácia e de segurança do novo medicamento (HUGHES et al., 2011).

Apesar do grande avanço em pesquisas e do número crescente significativo de tratamentos disponíveis para o combate do câncer, ainda são problemas persistentes no tratamento: a baixa eficácia dos fármacos a pacientes restritos, o desenvolvimento de resistência aos fármacos e os efeitos colaterais dos mesmos (BROWN et al., 2009; CHEOK, et al., 2011; KARTAL-YANDIM et al., 2016). Considerando a grande gama de tipos de cânceres, o desenvolvimento de novas terapias mais eficazes e/ou menos tóxicas são necessárias e importantes para aumentar a eficiência no combate dos vários tipos da doença.

1.5.1. Inibidores de MDM2

O gene Tp53 está localizado no braço curto do cromossomo 17, na região p13.1. Na espécie humana, o gene apresenta peso molecular de 53 kilodaltons (kD), sendo formado por 11 éxons, dentre eles, as regiões situadas entre os éxons 5 e 9 são denominadas de sítios quentes de mutação. O gene Tp53 codifica uma proteína denominada proteína 53 (p53), que foi mapeada por Rotter e colaboradores em 1984. Essa proteína por sua vez, é constituída por 383 aminoácidos, e inicialmente ela foi reconhecida como uma proteína oncogênica, porém somente no ano de 1989 ela foi aceita como agente supressor tumoral. Ela é conhecida como “guardiã do genoma” e atua na inibição da proliferação celular, induz apoptose e senescência

além de manter a integridade de genoma (VASSILEV, 2004; VASSILEV, 2007; WANG & LI, 2010).

Usualmente, o processo da carcinogênese ocorre com a perda da atividade da proteína p53, quando há uma mutação no gene Tp53 e/ou inativação da proteína p53, levando a não parada do ciclo celular e a incapacidade das células em efetuar o reparo do DNA, gerando células geneticamente instáveis. A atividade pro-apoptótica e inibidora do crescimento celular exercida pelo p53 não estão restritas as células tumorais, ocorrem também em células de metabolismo normal. Esse gene está mutado em mais de 50% dos tumores, portanto o nível de p53 nestas células é objeto de rigoroso controle (KHOURY et al., 2012).

A perda da função da proteína p53 pode ocorrer por: a) alterações genéticas ocasionadas por mutação pontual ou “*missense*”, ocorrem quando há troca de um nucleotídeo; deleção genica ou “*non sense*” de um ou dois alelos do gene p53 e inserção de nucleotídeos na sequência de DNA; b) interações da proteína p53 com outras proteínas regulatórias do ciclo celular, como é o caso da interação com a proteína MDM2; c) interações com proteínas virais, como o ocorrido entre a interação do antígeno do vírus HPV com a proteína p53 que é degradada (WATSON et al., 2006).

A proteína MDM2 (do inglês: *Murine Doble 2 Minute*) possui atividade oncogênica, usualmente está superexpressa em muitos tumores e atua como um dos principais reguladores negativos da proteína supressora de tumor a p53. Essa proteína se liga ao gene p53 e inibe a transcrição da proteína p53, regulando os níveis da proteína p53 através de um mecanismo de retroalimentação positiva (MOMAND et al., 2000; KHOURY et al., 2012; FRY, 2012).

Em condições normais, ambos p53 e MDM2 possuem meia-vida curta e suas respectivas concentrações nucleares são mantida em níveis muito baixos, como resultado do funcionamento correto dos reguladores do ciclo celular. No entanto, em muitos tumores, com redução de p53, ocorre uma expressão elevada do MDM2 (JUNIOR et al., 2002). Portanto, acredita-se que o bloqueio da interação p53-MDM2 seja determinante para estagnar as consequências oncogênicas da superprodução de MDM2 e para restaurar a função de p53 (FETT-CONTE et al., 2002).

Desta forma, a via MDM2-p53 tem sido um importante alvo para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais. Diferentes estratégias têm sido utilizadas para que p53 tenha a sua atividade restaurada em células tumorais, desde a utilização de agentes que se ligam a p53 e promovem seu acúmulo dentro da célula (a exemplo o composto denominado RITA) até a utilização de inibidores de MDM2 tais como Nutlins e MI-219 (BROWN et al., 2009).

Os inibidores do complexo MDM2-p53 mais estudados são os compostos Nutlins. Os compostos Nutlins foram obtidos a partir de uma biblioteca de compostos análogos da cis-imidazolina e antagonizam a ação da proteína MDM2 através de sua ligação no sítio de p53 presente na MDM2. Inicialmente foi concebido que, em função de sua estrutura, os Nutlins só atuariam em células que possuem p53 não mutada (VASSILEV, 2004; VASSILEV, 2007; BROWN et al., 2009; CHEOK et al., 2011).

Vassilev e colaboradores (2004) avaliaram os efeitos dos compostos Nutlins sob células tumorais com p53 selvagem. O Nutlin-1 mostrou ser capaz de induzir o acúmulo da proteína p53 sem alterar o gene TP53 através da inibição da ligação MDM2-p53, além de induzir a expressão do gene p21. Ainda foi realizada a análise do ciclo celular para confirmar a ativação da função de p53 pelo Nutlin-1. Esse composto mostrou ser capaz de parar o ciclo celular nas fases G1 e G2.

Por sua vez, dados da literatura demonstram que o composto Nutlin-3a é capaz de aumentar a expressão dos genes p53 e p21, induzir a ativação das caspases iniciadoras -8 e -9 e da caspase efetora -3 em células com p53 não mutado e parar o ciclo celular na fase G1, G2 e S (LEE et al., 2013; MEIJER et al., 2013). O grupo coordenado por Vassilev (2004) também avaliou se Nutlin-3a poderia suprimir o crescimento de xenoinxertos de tumores de osteossarcoma humano em camundongos. O uso desse composto por via oral inibiu o crescimento do tumor, sem perda significativa de peso e sem anormalidades teciduais.

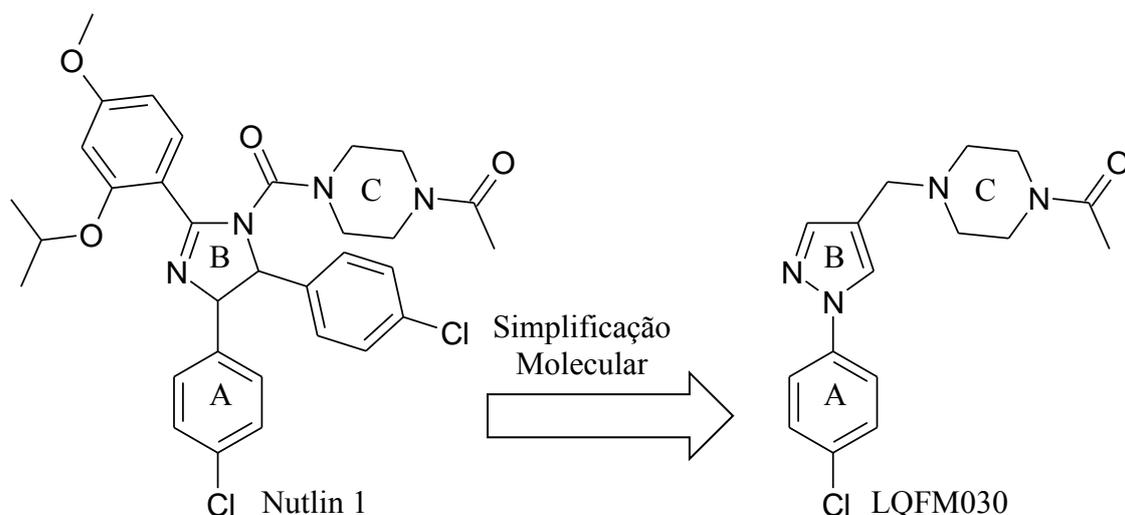
Apesar de sua importante função na supressão da proteína p53, MDM2 apresenta outras funções p53-independentes. Na ausência de p53, MDM2 também pode ter papel antiapoptótico e proliferativo através de sua interação com o fator de transcrição E2F1 (DAUJAT et al., 2001). Além do papel oncogene, MDM2 possui atividade mitogênica que é importante na recuperação de tecidos lesados, além de promover inflamação via ativação do fator de transcrição NF-kB (EBRAHIN et al., 2015).

1.5.2. LQFM030

O grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Ricardo Menegatti do Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM) da Faculdade de Farmácia da UFG, sintetizou e caracterizou uma família de moléculas com perfil antagonista de p53-MDM2, as quais são simplificações estruturais dos compostos Nutlins. Dentro desta família de moléculas está o

composto LQFM030, um composto heterociclo originalmente planejado a partir do protótipo Nutlin-1, através do emprego da estratégia de simplificação molecular, como demonstrado na Figura 1. Em estudos preliminares, este composto apresentou atividade antitumoral em carcinoma de mama *in vivo*, atividade antiangiogênica e inibidora de MDM2, que permitiram um depósito de patente no INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial).

Figura 4: Simplificação molecular do composto Nutlin-1 dando origem ao composto LQFM030. Fonte: *Induction of apoptosis in Ehrlich ascites tumour cells via p53 activation by a novel small-molecule MDM2 inhibitor–LQFM030*; MOTA et al., 2016.



Nestes estudos prévios, demonstramos que o composto LQFM030 foi capaz de inibir o crescimento tumoral dos animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) de maneira dose-dependente, com uma dose efetiva (DE50) de 150 mg/kg. Nestes animais, foi observado uma redução na angiogênese peritoneal, com marcante redução na produção de VEGF embora o tratamento não tenha restabelecido os parâmetros hematológicos e bioquímicos alterados nestes animais. O tratamento *in vitro* das células do TAE também apresentou atividade antiproliferativa e citotóxica concentração-dependente, aumentou a expressão da proteína p53 e ativou a via da p53 (através da ativação das proteínas p21 e p27 e redução da MDM2). O composto também causou retenção das células na fase G1 do ciclo celular e levou as células à apoptose. A apoptose pôde ser notada pela morfologia das células, pela fragmentação de DNA, pela externalização da fosfatidilserina e pela ativação de caspases iniciadoras e efetoras. Ainda foi observado que a transcrição do gene p53 não foi afetada pelo LQFM030, indicando que a regulação da p53 foi pós-transcricional. Assim como os Nutlins, LQFM030 apresentou atividade antitumoral *in vivo* e antiproliferativa *in vitro*, inibindo a interação p53-

MDM2 e reativando p53 e suas principais funções, a retenção no ciclo celular e a apoptose (MOTA et al., 2016).

O composto LQFM030 demonstrou em estudos anteriores atividade antitumoral contra células leucêmicas K562, embora dados da literatura documentem que esta linhagem celular possui a p53 mutada (ARVA et al., 2008; MOTA et al., 2016). Portanto, este trabalho investigou os efeitos do LQFM030 sobre a linhagem leucêmica K562 e os mecanismos de morte celular induzidos nesta linhagem, a qual apresenta a proteína p53 mutada. Estes estudos mecanísticos foram realizados em comparação com o Nutlin3-a, o qual apresenta capacidade de induzir apoptose em células p53-mutadas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar o potencial indutor de morte celular, mecanismos e potencial inibidor de MDM2 do composto LQFM030 em células K562. Na investigação dos mecanismos, comparar os achados encontrados com os efeitos do composto Nutlin-3a.

2.2. Objetivos específicos

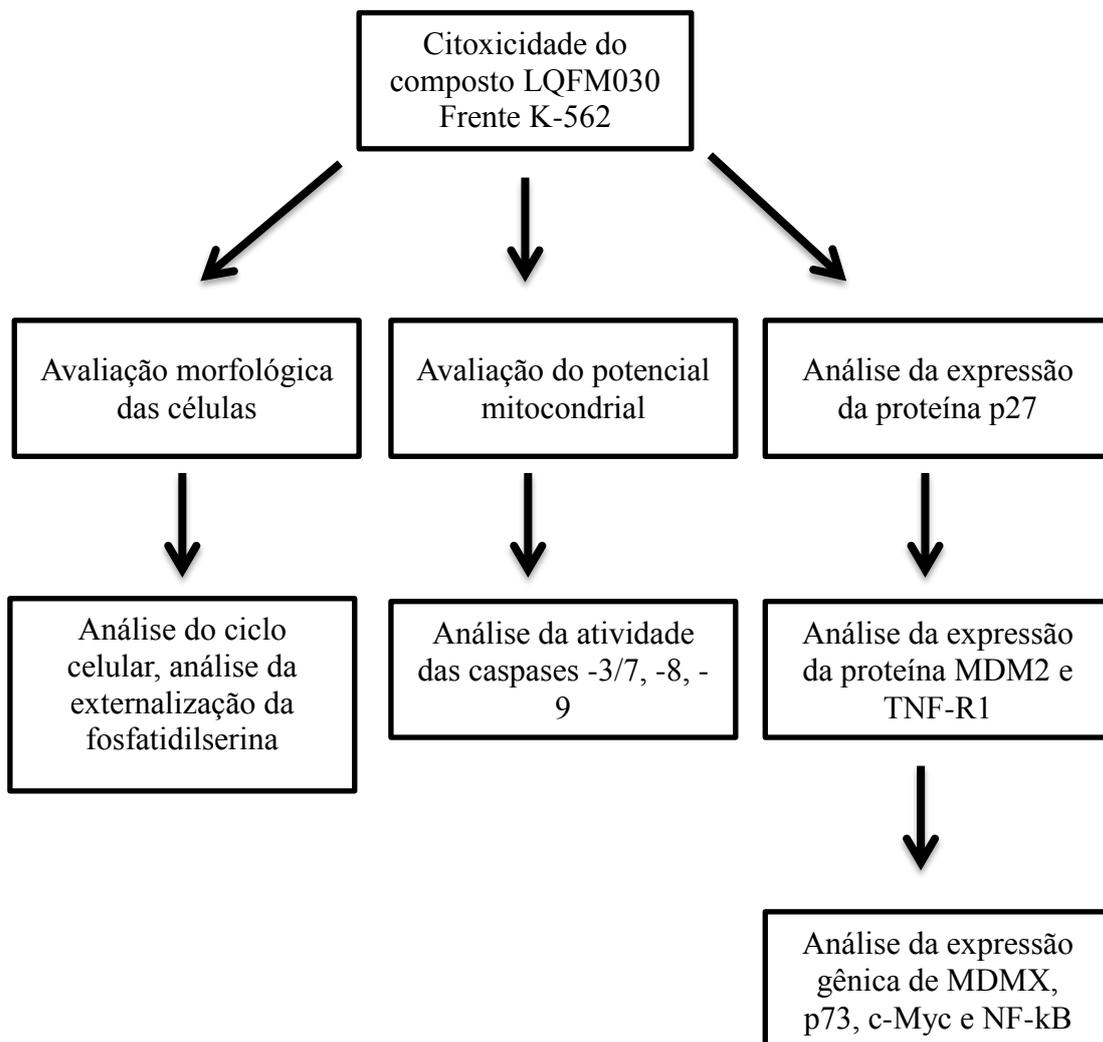
Como objetivos específicos, pretendemos em células tumorais K562 tratadas com o composto LQFM030, avaliar:

- Atividade;
- Alterações morfológicas e do ciclo celular;
- Mecanismos indutores de apoptose;
- Expressão de das proteínas MDM2 e MDMX;
- Vias envolvidas (p73, C-Myc e NF-kB) na atividade antitumoral.

3. Metodologia

A Figura 5 representa as análises realizadas e a sequência metodológica dos experimentos.

Figura 5: Fluxograma representando o delineamento experimental deste trabalho



3.1. Material utilizado

3.1.1. Fármacos, Diluentes, Anticorpos, Soluções e Corantes

- Álcool Etílico Absoluto (Labsynth®, São Paulo, SP, Brasil);
- Álcool Isopropílico (Vetec® Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Anticorpo monoclonal anti-GAPDH (Santa Cruz Biothechnologies®, Santa Cruz, CA, USA);
- Anticorpo monoclonal anti-MDM2 (Santa Cruz Biothechnologies®, Santa Cruz, CA, USA);
- Anticorpos utilizados para os procedimentos de citometria de fluxo (Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA, EUA);
- BlueStep™ Protein Marker (Amresco®, Solon, OH, USA);
- Brometo de Etídio (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA);
- DMSO (dimetilsulfóxido) (Vetec® Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Etanol P.A. (Synth®, São Paulo, SP, Brasil);
- Fosfatidilcolina de soja Lipoid S100. (Ludwigshafen, Alemanha);
- Hoechst 33342 (Invitrogen®, Eugene, OR, USA);
- Inibidores de proteases (Amresco®, Solon, OH, USA);
- Iodeto de propídio (IP) (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA);
- Kit Annexin V Apoptosis Detection (Bioscience®, NJ, EUA);
- Kit Caspa Tag TM (Millipore TM®, Temecula, CA, EUA);
- Kit Protein Standart Micro Standart (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA);
- Kit QuantiIscript® Reverse Transcription (Quiagen®, Valencia, CA, USA);
- Kit QuantiTEct® Reverse Transcription (Quiagen®, Valencia, CA, USA);
- May Grünwald Giemsa (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA);
- Membrana de PVDF (Amresco®, Solon, OH, USA);
- Metanol (J.T.Baker®, Cidade do México, México);
- MitoTracker® Red CM (Invitrogen® Grand Island, NY, USA);
- MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difenil brometo de tetrazolium) (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA);
- Nutlin-3a (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA);

- PBS-Tween 20 (AMRESCO®, Fountain Parkway Solon, OH, USA);
- Ponceau (Amresco®, Solon, OH, USA);
- Primers utilizados para os experimentos de PCR-RT (Integrated DNA Technologies®, San Diego, USA);
- Solução de fixação/permeabilização BD cytofix/cytoperm™ (BD Biosciences®, NJ, EUA);
- Soro Fetal Bovino (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA);
- RNase (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA);
- Roswell Park Memorial Institute 1640 (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA);
- Tampão de lise NP-40 (Amresco®, Solon, OH, USA);
- Taurodeoxicolato de sódio (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA);
- TBS-Tween 20 (Amresco®, Solon, OH, USA);
- TRIzol™ (Ambion/RNA, Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA).

3.1.2. Equipamentos e instrumentos laboratoriais.

- Agitador de Tubos Vortex Modelo AP 56 (Phoenix Lufarco®, Araraquara, SP, Brasil);
- Balança analítica (Ohaus®, Lindavista, Cidade do México, México);
- Banho-maria (Biomatic® 1053/522, Porto Alegre, RS, Brasil)
- Centrífuga Eppendorf (Thermo Electron Corporation®, Bervely, MA, EUA);
- Centrífuga Hettich Rotina 380R (Hettich®, Newport Pagnell, Buckinghamshire, England);
- Citômetro de Fluxo (BD FACSCANTO II®, BD Biosciences®, NJ, EUA);
- Espectrofotômetro (Thermo Scientific®, Wilmington, DE, EUA);
- Homogeneizador de placas orbital digital, modelo Orbit P4 (Labnet®, St. Louis, MO, USA);
- Microscópio de fluorescência modelo DMI 4000 B (Leica Microsystems®, Bannockburn, USA);
- Microscópio óptico modelo DM 2000 (Leica Microsystems®, Bannockburn, USA);
- Nanodrop 8000 (Thermo Scientific®, Wilmington, DE, EUA);
- Placas de 96 poços (TPP®, Trasadingen, Cantão Schaffhausen, Suíça)

- Ponteiras para micropipetas (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA);
- Rotor-Gene (Quiagen®, Valencia, CA, USA);
- Termobloco ThermoMixer C (Thermo Electron Corporation®, Beverly, MA, EUA);
- Ultrassom Modelo USC 750 (Unique®, Indaiatuba, SP, Brasil);
- Sistema Milli-Q Ultrapurificação de água. (Millipore Corporation®, MA, USA).

3.2. Preparo da emulsão do composto LQFM030

O LQFM030 é um composto heterociclo originalmente planejado a partir do protótipo Nutlin-1, através do emprego da estratégia de simplificação molecular. Ele foi sintetizado no Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM) da Faculdade de Farmácia da UFG, sob a coordenação do Prof. Dr. Ricardo Menegatti, e fornecido pelo mesmo laboratório (LQFM). O composto era mantido a - 20°C.

Devido à hidrofobicidade do composto LQFM030, as amostras foram preparadas para os testes em forma de emulsão água/óleo. Para esse preparo, foram pesados 5 mg do composto LQFM030, e misturados com 200 µL de etanol P.A. Em seguida, essa mistura foi agitada em vortex e levada ao ultra-som durante 10 minutos. Após isso, foram acrescentados 5 mg de fosfatidilcolina de soja. A mistura foi novamente agitada no vortex e depois levada ao ultra-som por 10 minutos. Por fim, com o recipiente em alta rotação no vortex, foram gotejado 800 µL de água ultrapura associada com agente emulsionante taurodeoxicolato de sódio na concentração de 1,25 mg/mL.

Para evitar possível perda de estabilidade a emulsão era preparada diariamente. Após determinação do IC₅₀ do composto LQFM030, todos os experimentos foram realizados com o valor do IC₂₅, para verificar as alterações sofridas pelas células.

3.3. Nutlin-3a

Para os experimentos com as células K562, o composto Nutlin-3a foi diluído em DMSO para o uso durante as análises. A concentração de (0,01mM) foi definida com base no trabalho de ARVA et al., 2008.

3.4. Cultura celular da linhagem K562

Foi utilizado neste estudo o modelo *in vitro* da leucemia mielóide crônica, a linhagem tumoral K562. Essa linhagem foi obtida pela *American Type Culture Collection* (ATCC), através do líquido pleural de uma paciente com 53 anos de idade, do sexo feminino, com diagnóstico de Leucemia mielóide crônica em crise blástica.

As células da linhagem tumoral K562 foram cultivadas em garrafas de 75cm², com meio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640), suplementado com 10% de soro fetal bovino, sendo que o Meio foi trocado a cada 48 horas, mantendo aproximadamente 1×10^6 células viáveis cada vez que o meio era trocado. As garrafas foram mantidas na horizontal, em estufa com atmosfera úmida, a 37°C, com CO₂ a 5%.

3.5. Análise de citotoxicidade

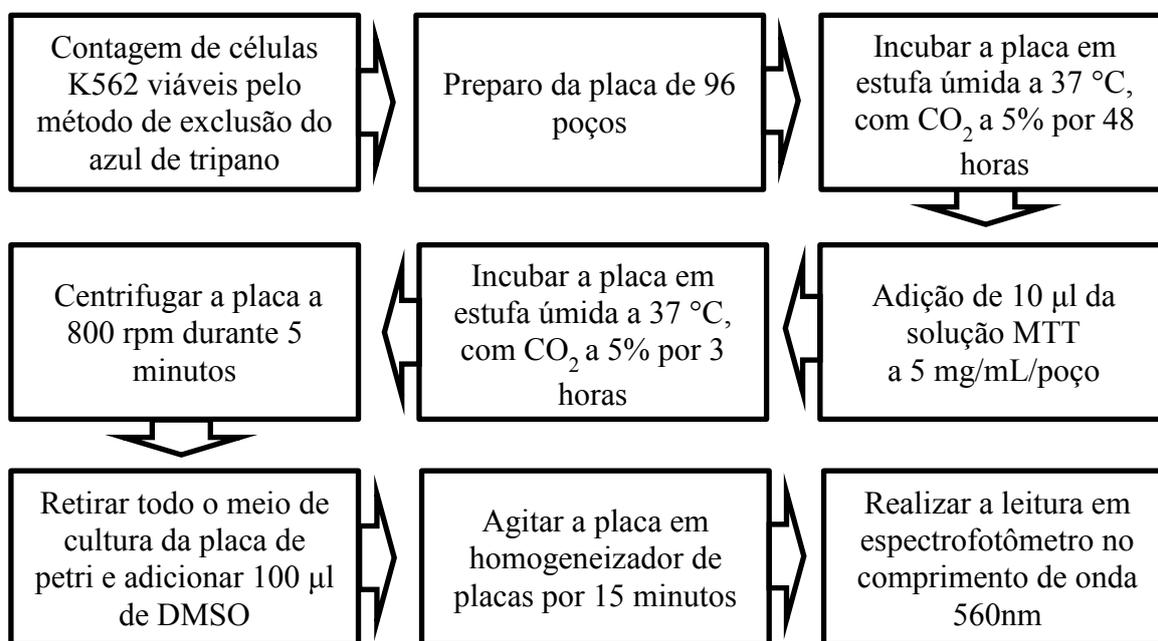
O efeito citotóxico do composto foi avaliado por meio do ensaio de citotoxicidade de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difenil brometo de tetrazolium). O MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difenil brometo de tetrazolium) é um sal amarelo solúvel, que se transforma em um produto azul insolúvel denominado formazan. Isso ocorre quando o MTT é metabolizado pela enzima succinato desidrogenase presente na mitocôndria. A intensidade da cor é determinada por meio do espectrofotômetro e é utilizada para quantificar a integridade da mitocôndria e a viabilidade celular.

O procedimento para análise do efeito citotóxico foi realizado de acordo com a sequência apresentada na Figura 6. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 90 µL de suspensão celular na concentração de 1×10^6 células viáveis/mL da linhagem tumoral K-562, suplementadas com 2% de soro fetal bovino, em meio RPMI, e incubadas com 10 µL do composto nas concentrações de 0,0112 mM a 1,56 mM, mantidas em estufa úmida a 37°C, com CO₂ a 5% por 48 horas. Em seguida, cada poço recebeu 10 µL de MTT, a 5 mg/mL e a placa foi novamente incubada na mesma estufa por mais 3 horas. Logo após esse período de incubação, a placa foi centrifugada a 800 rpm durante 5 minutos, para que os cristais de formazan se precipitassem e o sobrenadante fosse retirado. Por fim, adicionou-se 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço, e homogeneizou-se a placa em homogeneizador de

placas durante 15 minutos. A leitura em espectrofotômetro foi realizada em comprimento de onda 560 nm e a intensidade da coloração foi quantificada. A média da absorção do controle de células foi considerada 100% de viabilidade. A porcentagem de viabilidade foi obtida através da equação:

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \frac{[(\text{media da densidade optica de cada composto do teste} - \text{media da densidade optica do branco})] \times 100}{[(\text{media da densidade optica do controle} - \text{media da densidade optica do branco})]}$$

Figura 6: Fluxograma representando o procedimento para avaliação da análise de citotoxicidade do composto LQFM030.



3.6. Análises de expressão proteica utilizando a técnica da citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que se baseia no fluxo contínuo de células em suspensão através de um sistema de laser, que consegue avaliar o tamanho e várias especificidades individuais de cada célula. O parâmetro *Forward Scatter Channel* (FSC) avalia o tamanho de cada célula e o *Side Scatter Channel* (SSC) avalia a complexidade de cada uma delas. Ainda há também um sistema de fluorescência que através da marcação das células com anticorpos associados à fluorocromos, permite-se a identificação de proteínas e outras estruturas celulares.

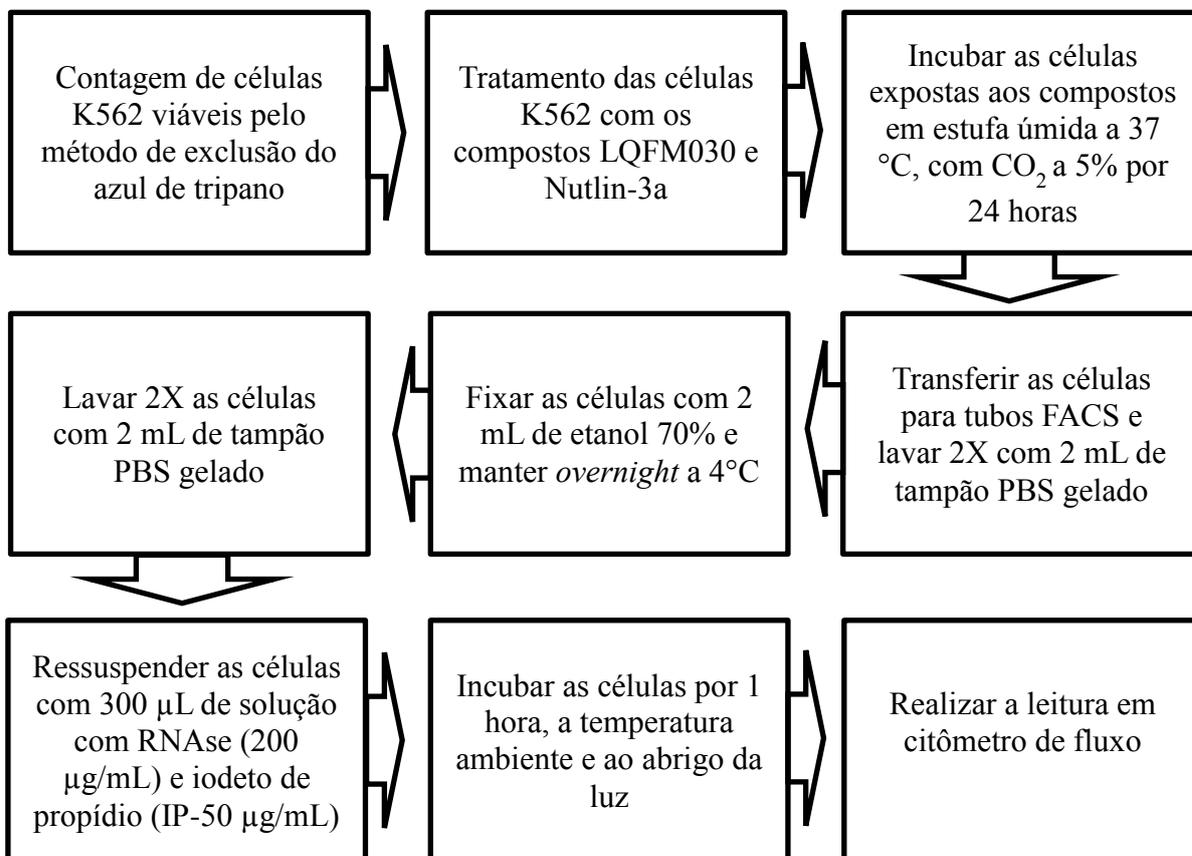
Para os ensaios de citometria de fluxo e observação das alterações decorridas sob o tratamento, as células K562 foram incubadas a 1×10^5 células/mL por um período de 24 horas de acordo com os seguintes grupos: um grupo tratado com 0,283 mM (IC25) do composto LQFM030, outro grupo tratado com 0,01mM do composto Nutlin-3a e um grupo controle sem nenhum tratamento.

3.6.1. Progressão do ciclo celular

Após o período de incubação, foi realizado o procedimento apresentado na Figura 7. As células foram transferidas para tubos FACS e lavadas com 2 mL de tampão PBS gelado por duas vezes e em seguida foram fixadas com 1mL de etanol 70% e armazenadas *overnight* a 4 °C.

Seguidamente as células foram lavadas com 2 mL de PBS gelado e ressuspendidas com 300 µL de solução contendo RNase (200 µg/mL) e iodeto de propídio (IP) (50 µg/mL). As células foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente foi realizada a leitura no citômetro de fluxo, com o comprimento de onda de 488nm.

Figura 7: Fluxograma representando o procedimento para progressão do ciclo celular do composto LQFM030.



3.6.2. Avaliação das caspases -3/7, -8 e -9

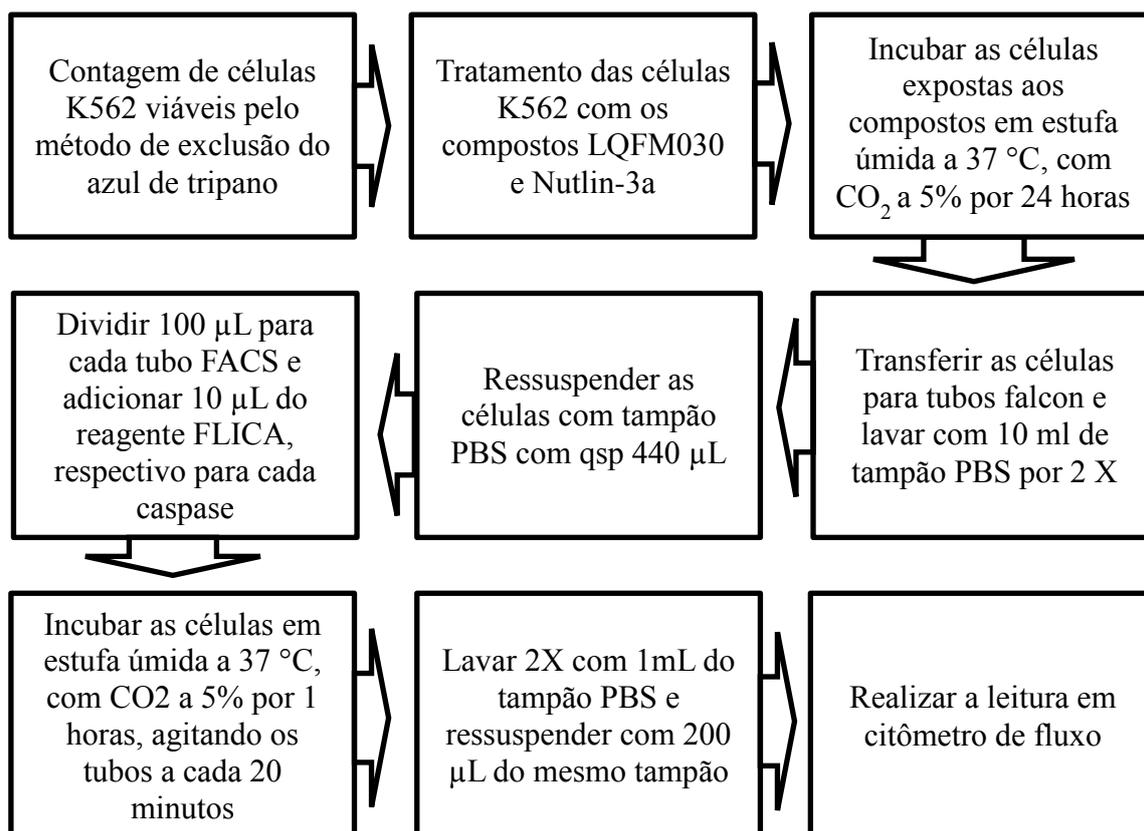
O ensaio para avaliação das caspases -3/7, -8 e -9, foi realizado utilizando o kit de ensaio *in situ* de caspase 3, 7, 8 e 9 Caspa Tag TM.

A sequência metodológica esta apresentada na Figura 8. Após o tratamento, as células foram transferidas para tubos falcon e lavadas com 10 mL de tampão PBS, por duas vezes, em seguida foram ressuspensas com mesmo tampão, com o volume total de 440 µL no tubo falcon. Em seguida, aproximadamente 100 µL foram divididos em tubos e foi adicionado em cada tubo 10 µL do reagente FLICA, contido no kit, respectivo para cada caspase.

Posteriormente, as células foram incubadas por 1 hora, em estufa úmida a 37°C, com CO₂ a 5%, sendo que, a cada 20 minutos os tubos eram agitados manualmente. Após esse período de incubação, as células foram lavadas com 1 mL de tampão PBS e então após essa

etapa, 200 μL do mesmo tampão foi adicionado em cada tubo para proceder à leitura no citômetro de fluxo, com comprimento de onda para excitação em 490 nm e emissão em 520 nm.

Figura 8: Fluxograma representando o procedimento para avaliação da atividade das caspases -3/7,-8 e -9 do composto LQFM030.



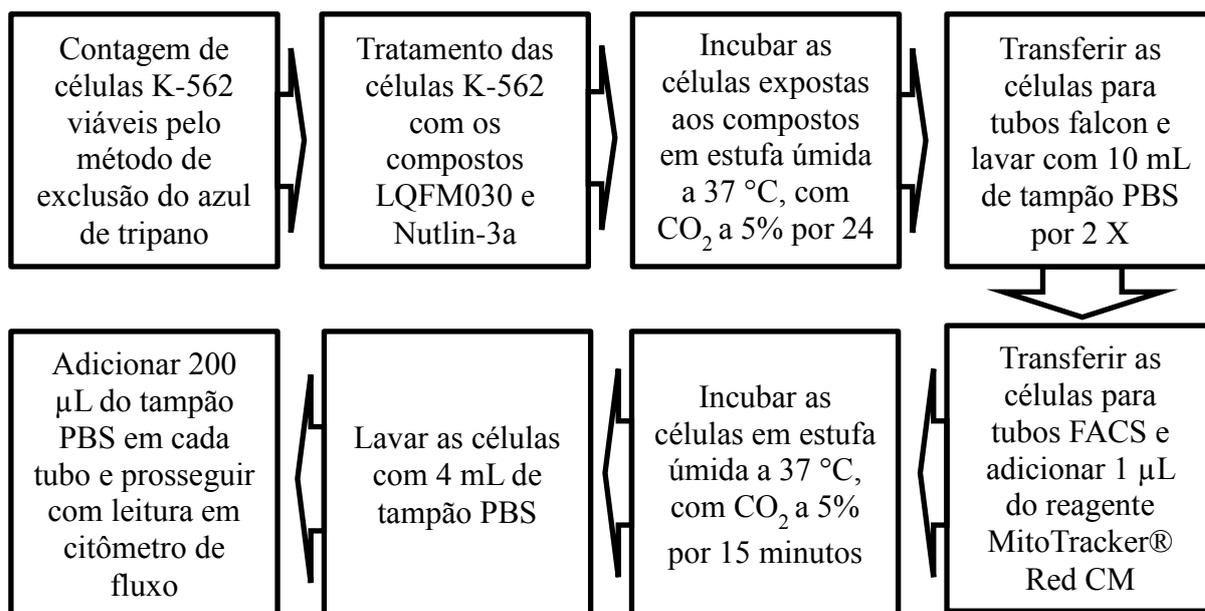
3.6.3. Avaliação da função mitocondrial

Para a avaliação da função mitocondrial, foi utilizado um corante não fluorescente chamado de *MitoTracker® Red CM*. Esse corante passa com facilidade por difusão pela membrana plasmática e acumula-se no ambiente lipídico das mitocôndrias metabolicamente ativas. Após esse acúmulo, sondas não fluorescente irão reagir com o grupo thiol dos peptídeos e proteínas presentes nas mitocôndrias para formar um aldeído fluorescente, sendo possível sua detecção dentro do seu espectro de excitação e emissão.

A Figura 9 demonstra o procedimento seguido para a avaliação da função mitocondrial. Após o tratamento das células, para essa avaliação, as células foram lavadas

com 10 mL de tampão PBS e posteriormente foram transferidas para tubos e adicionado 1 μ L do reagente *MitoTracker® Red CM* (10 nM). Em seguida esses tubos foram incubados por 15 minutos em estufa úmida a 37 °C, com CO₂ a 5%. Em seguida, as células foram lavadas com 4 mL de tampão PBS. Por fim foram adicionados 200 μ L do mesmo tampão e foi realizada a leitura no citômetro de fluxo.

Figura 9: Fluxograma representando o procedimento para avaliação da função mitocondrial.



3.6.4. Avaliação das proteínas p27 sc1641 e NF-kB sc8414

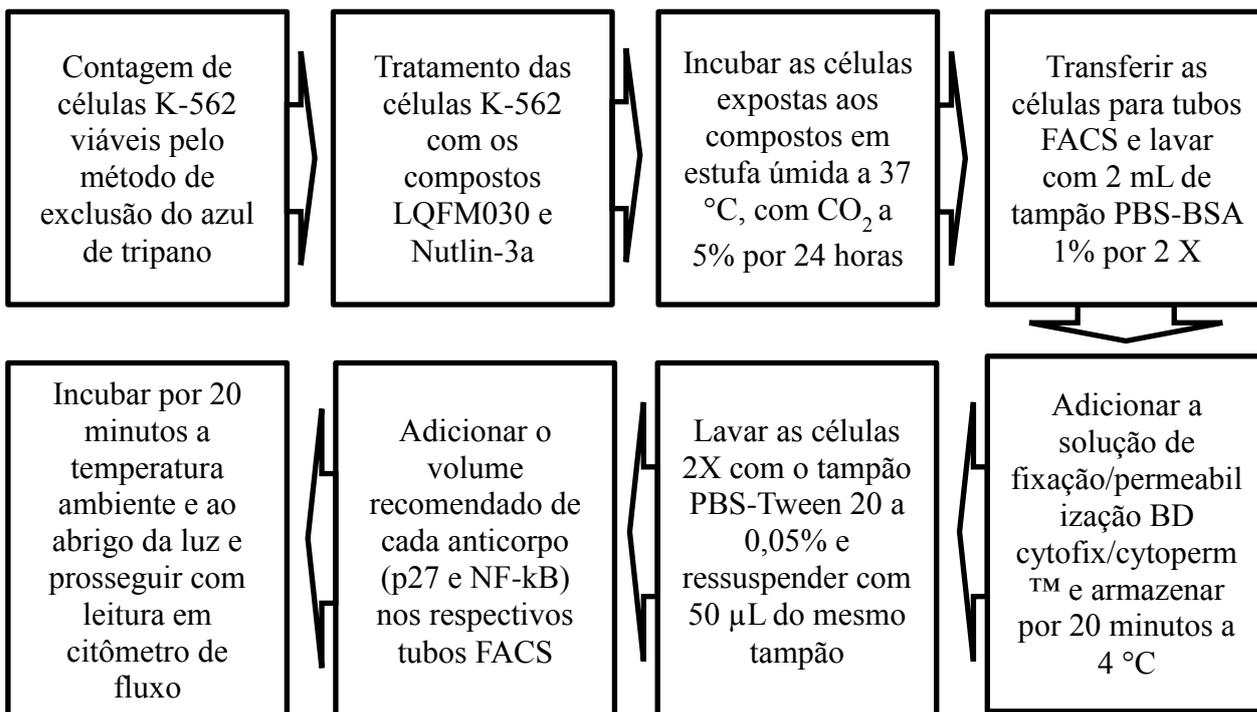
A proteína p27 está relacionada à progressão do ciclo celular e agressividade tumoral. Ela é um membro da família de inibidores do complexo quinases-ciclina-dependentes, responsável pela progressão do ciclo celular, sendo que sua inibição induz a interrupção do ciclo celular durante a transição da fase G1 para fase S.

NF-kB é um fator de transcrição relacionado à carcinogênese, regulação da resposta imune e do processo inflamatório.

Após o tratamento das células, o procedimento realizado para a avaliação das proteínas p27 e NF-kB está representado na Figura 10. As células foram lavadas com 2 mL de tampão PBS-BSA 1% por duas vezes, em seguida foi adicionado à solução de fixação/permeabilização *BD cytofix/cytoperm™*. Essa mistura foi armazenada por 20 minutos a 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com o tampão *PBS-Tween 20* a

0,05% e ressuspendidas com 50 μ L do mesmo tampão em cada tubo e adicionado 5 μ L de cada anticorpo (p27 – sc-1641 e NF-kB – sc-8414) nos respectivos tubos identificados. A fluorescência foi analisada no citômetro de fluxo após uma nova incubação de 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

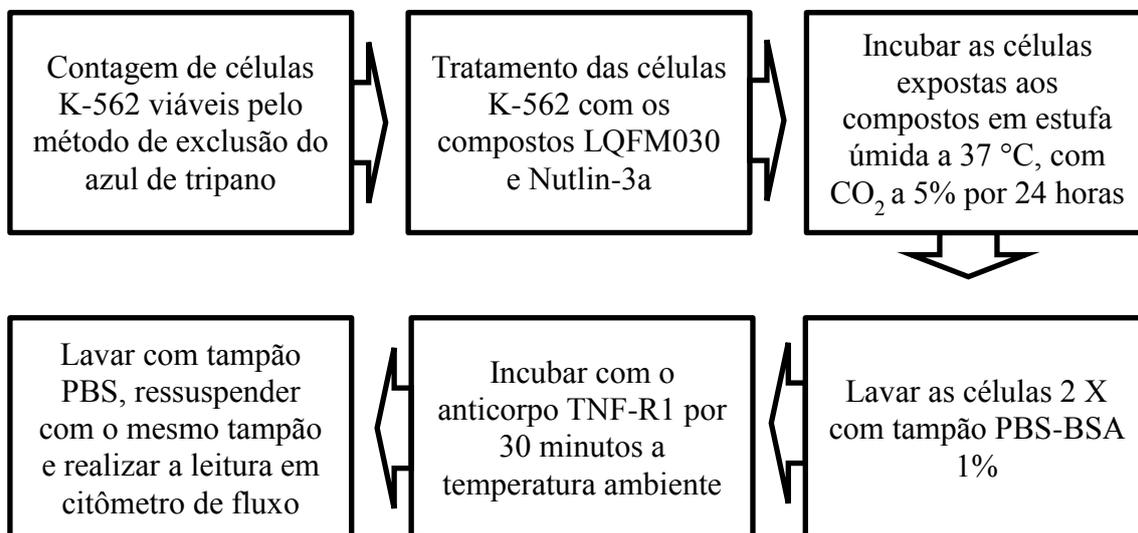
Figura 10: Fluxograma representando o procedimento para avaliação das proteínas p27 e NF-kB.



3.6.5. Avaliação da expressão da proteína TNF-R1

A Figura 11 representa o procedimento realizado para avaliação do fator de necrose tumoral (TNF-R1). Para esse experimento, as células foram expostas aos compostos por um período de 24 horas. Em seguida foram lavadas duas vezes com tampão *PBS-BSA 1%*. Posteriormente as células foram incubadas com 10 μ L do anticorpo TNF-R1 (sc-73195) e 90 μ L de PBS. Os respectivos tubos identificados foram incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. Após essa incubação, as células foram lavadas com PBS e ressuspendidas com o mesmo tampão. A fluorescência foi analisada no citômetro de fluxo no canal do FITC.

Figura 11: Fluxograma representando o procedimento para avaliação do fator de necrose tumoral.



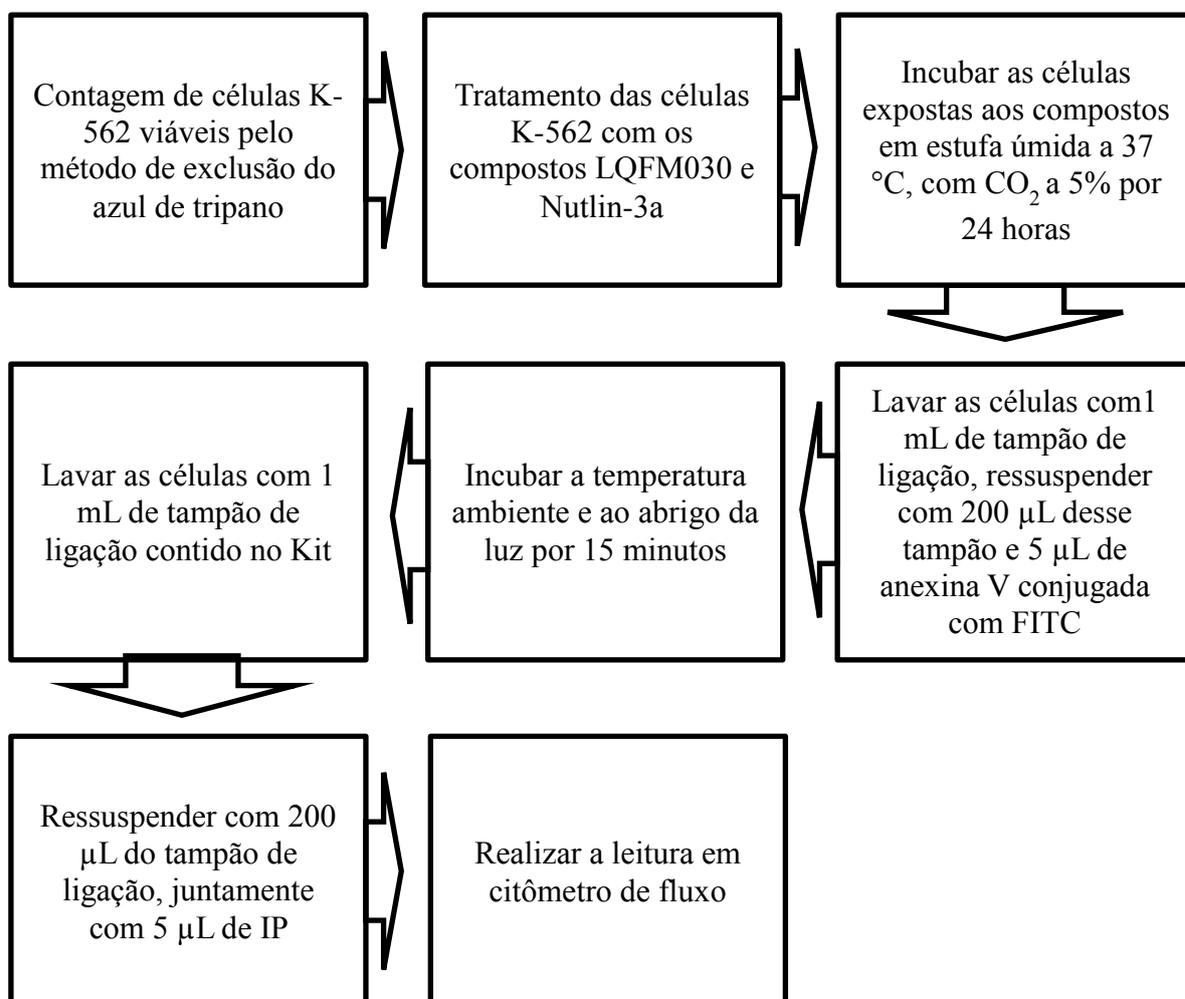
3.6.6. Ensaio de Apoptose (Anexina V-FITC/Iodeto de Propídeo)

Durante o processo de apoptose, ocorre a externalização da fosfatidilserina da membrana plasmática. A anexina V é uma proteína dependente de cálcio que possui alta afinidade pela fosfatidilserina fora da membrana plasmática. Já a utilização concomitante do marcador nuclear fluorescente iodeto e propídeo (IP) é um padrão para citometria de fluxo utilizado para diferenciar células viáveis das células não viáveis, por ser capaz de penetrar na membrana de células não viáveis.

Para essa análise, foi utilizado o Kit de detecção de apoptose por anexina V conjugada com FITC. O procedimento seguido está apresentado na Figura 12.

Após 24 horas de exposição das células K562 aos compostos, as células foram lavadas duas vezes com 1 mL de tampão de ligação. Posteriormente, elas foram incubadas com 200 µL desse tampão e 5 µL de anexina V conjugada com FITC, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 15 minutos. Em seguida, as células foram novamente lavadas com 1 mL de tampão de ligação e ressuspensas com 200 µL do mesmo tampão, juntamente com 5 µL de IP e analisadas por citometria de fluxo.

Figura 12: Fluxograma representando o procedimento para ensaio de apoptose.



3.7. Análise da morfologia celular

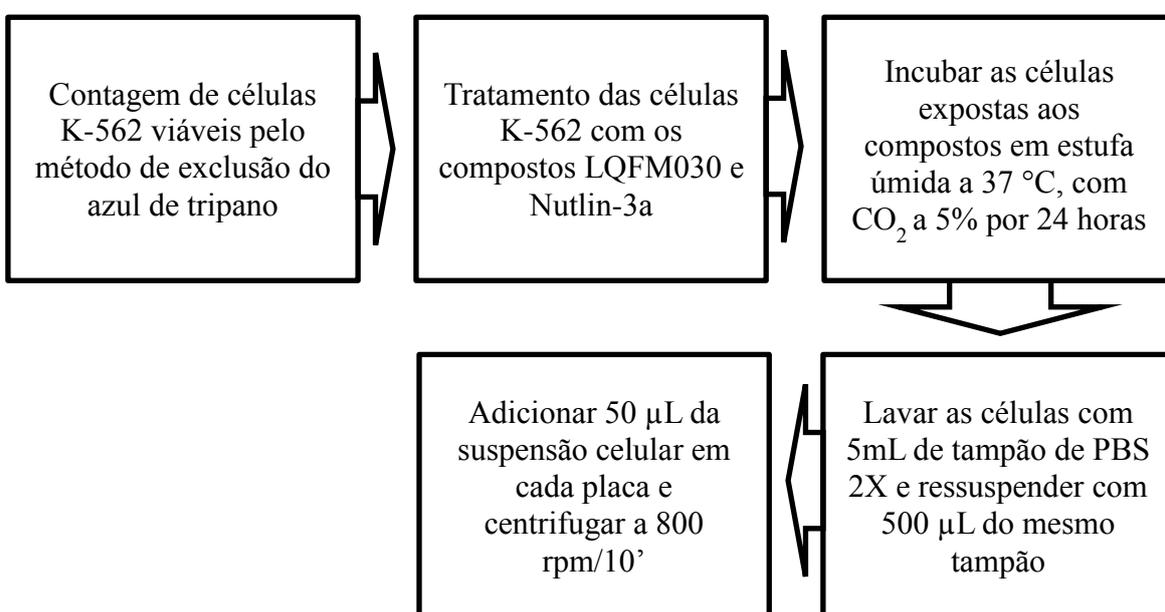
3.7.1. Citocentrifugação

Para que houvesse adesão das células à lâmina para posterior coloração, utilizou-se o método da citocentrifugação, um método que possibilita a análise de líquidos com baixa concentração celular, demonstrado na Figura 13. Para esse experimento foram utilizadas 5 mL

a 1×10^5 células/mL, tratadas com os compostos (0,01 mM do composto Nutlin-3a e 0,283 mM do composto LQFM030).

Após o período de exposição de 24 horas as células foram lavadas com tampão PBS e ressuspensas em 500 μ L do mesmo tampão. Em seguida, 50 μ L dessa suspensão foram adicionadas as placas e foram centrifugadas a 800 rpm por 10 minutos. Após o termino da citocentrifugação as células se depositam na região da lamina e a suspensão celular é absorvida pela membrana.

Figura 13: Fluxograma representando o procedimento da citocentrifugação.



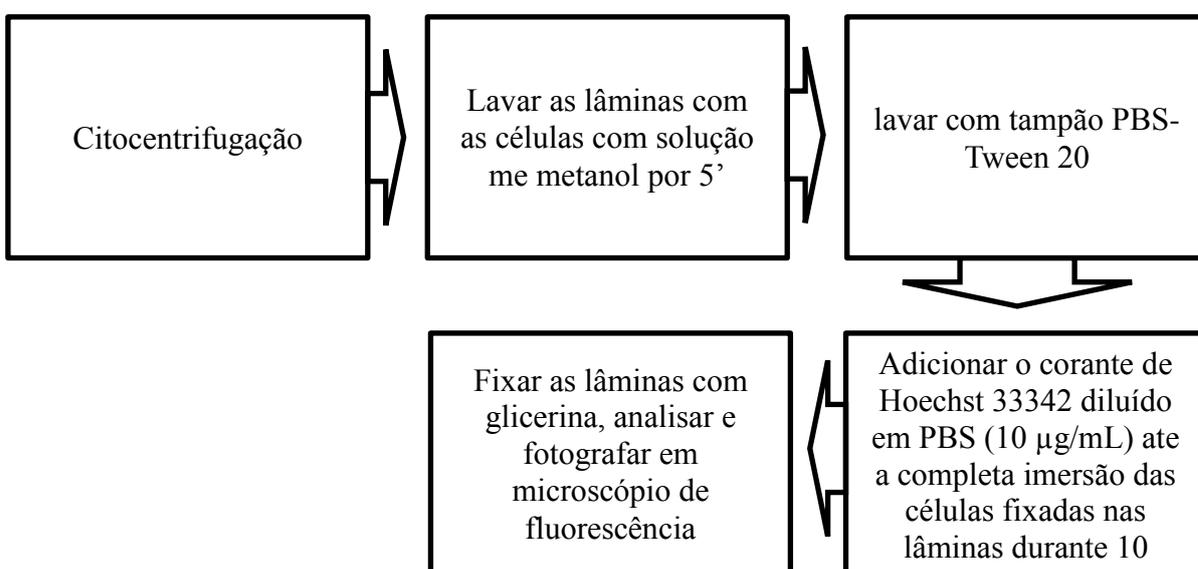
3.7.2. Morfologia nuclear

Para as análises das alterações morfológicas nucleares, afim de se observar as alterações decorridas sob o tratamento, as células K562 foram incubadas por um período de 24 horas de acordo com os seguintes grupos: um grupo tratado com 0,283 mM (IC25) do composto LQFM030, outro grupo tratado com 0,01mM do composto Nutlin-3a e dois grupos controles, um com o diluente DMSO, utilizado para dissolver o composto Nutli-3a e outro com o preparo da emulsão sem o composto LQFM030.

Após a citocentrifugação, foram realizados os procedimentos descritos na Figura 14. As lâminas com as células foram expostas a solução de metanol para fixação por 5 minutos, em seguida foram lavadas com 1 mL do tampão *PBS-Tween 20* para retirada do excesso de

metanol. Posteriormente o corante de Hoechst 33342, diluído em PBS com concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$ foram adicionados ate a completa imersão das células fixadas nas lâminas durante 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, a lamínula foi fixada com glicerina e as lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio de fluorescência utilizando o programa *LAS-AF*, *filtro A4*, sem inserção de cor.

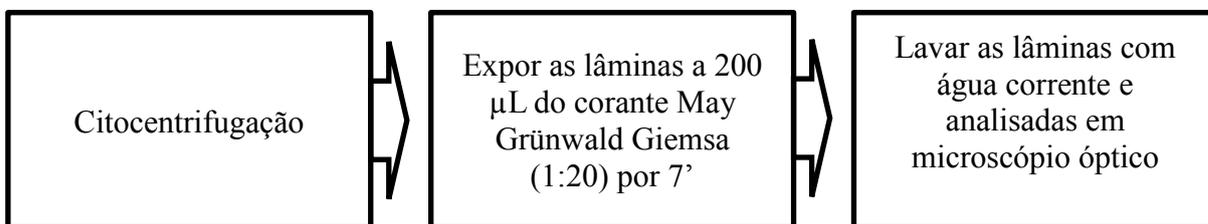
Figura 14: Fluxograma representando o procedimento de coloração pelo corante Hoechst 33342.



Outro corante utilizado foi o May Grünwald Giemsa. Utilizado para coloração de células, esta técnica é uma mistura de corantes pancrômicos, May Grünwald e Giemsa, com características neutras, dependentes do pH da solução corante, que são capazes de colorir os componentes do núcleo em tons rosados, devido ao pH ácido e em tons azulados os componentes do citoplasma, com maior predominância do pH básico.

Este procedimento está representado na Figura 15. Após a confecção das lâminas por citocentrifugação, as lâminas foram expostas a 200 μL do corante May Grünwald Giemsa com concentração final 1:20 durante 7 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente para retirar o excesso do corante. Após a secagem, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico e fotografadas com câmera acoplada utilizando objetiva de 40x.

Figura 15: Fluxograma representando o procedimento de coloração pelo corante May Grünwald Giemsa.



3.8. PCR-RT

3.8.1. Extração do RNA

Para este ensaio, o RNA total das células foi extraído pelo método do Trizol™. O Trizol™ é um reagente que apresenta uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Após o tratamento das células K562, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm/10 min e transferidas para tubos eppendorf de 2 mL, em que foram adicionados 1 mL de Trizol™ em cada tubo e foram mantidos sob agitação constante com finalidade de promover a lise celular. Em seguida, incubou-se em temperatura ambiente por 5 minutos para a separação completa das fases e foram adicionados 200 µL de clorofórmio.

Posteriormente os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados por 3 minutos a temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm/15min/4°C. O RNA ficou retido na fase aquosa, então essa fase foi transferida para um novo tubo eppendorf. Após isso, foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico a 100%. Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 10 minutos. Após o tempo, as amostras foram centrifugadas a 12000rpm/10min/4°C de modo a formar um pellet de RNA no fundo do tubo.

Para a lavagem do RNA, o sobrenadante foi removido cuidadosamente deixando apenas o pellet de RNA. Em seguida foi adicionado 1 mL de etanol 75% e agitadas as amostras em vórtex por cerca de 15 segundos e centrifugadas a 7500 rpm/5 min/4 °C. Esse procedimento foi realizado por duas vezes. O RNA isolado foi seco em termobloco

(ThermoMixer C) por aproximadamente 10 minutos a 37 °C. Após seco, ele foi ressuspenso com 50 µL de água RNAs-free e incubado novamente no termobloco a 55-60 °C por 10 minutos. As amostras foram então armazenadas a -20°C.

3.8.2. Avaliação da integridade e quantificação do RNA

A integridade do RNA foi observada por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, em voltagem de 80 V. O procedimento foi realizado para avaliar possíveis contaminações por DNA, degradações e a relação entre as bandas correspondentes aos RNA ribossomais 28S e 18S.

Para a quantificação do RNA, foi utilizado o aparelho nanodrop 8000 (Thermo Scientific). A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação de RNA por proteínas e solventes.

3.8.3. Tratamento do RNA total com a DNase

Para eliminar possíveis contaminações com DNA genômico, o RNA foi tratado com DNase livre de RNase contido no kit QuantiTEct® Reverse Transcription. Foram empregados 2 µL de gDNA Wipeout Buffer 7x para cada 1 µg como volume final ajustado para 14 µL com água RNase-free. A amostra foi incubada por 2 minutos a 42 °C e em seguida resfriada em gelo.

3.8.4. Transcrição de cDNA

Procedeu-se à síntese do cDNA, pelo método da transcriptase reversa, aos 14 µL obtidos através do tratamento com a DNase, foram adicionados 1 µL de Reverse-transcription Master Mix (QuantiIscript® Reverse Transcription), 4 µL de Quantiscript RT Buffer 5x e 1 µL de RT Primer Mix, obtendo um volume final de 20 µL. A mistura foi incubada a 42 °C por 15 minutos e em seguida incubou-se a 95 °C/3 min para inativar a transcriptase reversa. O cDNA foi armazenado a -20°C.

3.8.5. Padronização dos genes caspases -3/7, -8 e -9 MDMX, p73, c-Myc e NF-kB pela técnica de RT-qPCR

Foram utilizados “*primers*” construídos pelas IDT® para padronização e quantificação dos genes caspases -3/7, -8 e -9 MDMX, p73, c-Myc e NF-kB. A expressão gênica foi normalizada utilizando a expressão do gene HPRT1 e as análises foram realizadas pelo método de delta delta ct.

Tabela 1. Sequência de “*primers*” utilizados na reação de polimerização em cadeia após transcrição reversa quantitativa.

Primer	Sequência forward	Sequência reverse
HPRT1	TGACACTGGCAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
Caspase 3/7	5´ ATGGACCACGCAGGAAGGG 3´	5´ GGCAGCATCATCCACACATAACC 3´
Caspase -8	5´ GAAAAGCAAACCTCGGGGATAC 3´	5´CCAAGTGTGTTCCATTCTCCTGTC3´
Caspase -9	5´TGTCCTACTCTACTTTCCAG GTTTT´3´	5´GTGAGCCCCTGCTCAAAGAT 3´
MDMX	5'-GCC TTG AGG AAG GAT TGG TA 3´	5'-TCG ACA ATC AGG GAC ATC AT
P73	TA: GCACCACGTTTGAGCACCTCT ΔN: 5´- TGTACGTCGGTGACCCCGCACG-3	TA: GCAGATTGAACTGGGCCATGA ΔN: 5´- TCGGTGTGGAGGGGATGACA-3´
c-Myc	TGCTGCCAAGAGGGTCAAGT	GTGTGTTTCGCCTCTTGACATTC
NF-kB	5´-GTGCAGAGGAAACGTCAGAA- 3´	5´-GTGGGAAGCTATACC CTGGA- 3

Para cada gene, foram utilizados 10 µL do cDNA das amostras, misturados a uma solução contendo 175 µL de PCR Master Mix 2x Rotor-Gene SYBR Green, 17,5 µL de primer forward, 17,5 µL de primer reverse e 112 µL de água RNase-free. Os preparos foram distribuídos em microtubos para PCR e submetidos a 40 ciclos, sendo: desnaturação por 5 segundos em temperatura de 95 °C, anelamento e extensão por 10 segundos a 60 °C e ativação inicial por 5 minutos a 95 °C para termo-ativação da HotStarTaq Plus DNA polimerase. Os testes foram feitos em duplicata.

3.9. Western Blot

Proteínas extraídas das células K562, utilizando tampão de lise NP-40 e 0,1µL de inibidores de proteases foram utilizadas neste procedimento. 1×10^6 células/mL foram expostas ao composto LQFM030 (125 µM) por um período de 24 horas. Em seguida elas foram retiradas das garrafas de cultura no gelo, lavadas duas vezes com PBS gelado e centrifugadas a 2.000 rpm por 5 min. Após centrifugar e retirar o PBS, o pellet foi ressuspenso com 250µL do tampão de lise NP-40 e 0,1µL de inibidores de proteases, enquanto que essa mistura ainda era mantida sobre o gelo. As células foram então mantidas no gelo por 30 min, sendo submetidas ao vortex a cada 10 min. Após esse período, centrifugou-se a 13.000 rpm/10 min a 4 °C, retirando o sobrenadante em alíquotas e o armazenou a - 80°C até o momento do uso.

Os extratos de proteínas foram quantificados a 598 nm, pelo método do kit Protein Standard Micro Standard, utilizando-se diferentes concentrações de BSA como curva padrão. As amostras foram diluídas em tampão de amostra 6x (glicerol; SDS 10%; azul de bromofenol 1%; betamercaptoetanol 1% e água ultrapura) e fervidas por 5 min a 100 °C. Os extratos de proteínas (40 µg) em tampão de amostra foram submetidos à eletroforese em gel de poli-acrilamida 10% (30% bis-acrilamida; Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8; água destilada; SDS 10%; APS – persulfato de amônia 10% e Temed – tetrametil-etilenediamina) a 100 V, por aproximadamente 3h.

Utilizou-se o BlueStep™ Protein Marker como padrão de peso molecular. Em seguida as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF por eletroforese em tampão de transferência (Tris base, glicina, metanol e água destilada) a 100 V por 2h, no gelo. Após a eletroforese, a membrana foi corada em Ponceau 0,5% por 20 segundos, para verificar a eficiência da transferência, e posteriormente enxaguada em água destilada. A saturação de sítios inespecíficos foi realizada pela incubação com leite em pó desnatado comercial a 5%, por 1h, em agitador horizontal. As membranas foram incubadas overnight a 4 °C, em agitador horizontal, uma delas com o anticorpo monoclonal anti-MDM2 e a outra com o controle endógeno anti-GAPDH, ambos diluídos em BSA (MDM2 – 1:250; GAPDH – 1:1000).

Após esta incubação, a membrana foi mergulhada em TBS-Tween 20 por 30 min, em agitador horizontal, com a solução sendo renovada a cada 10 min. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário apropriado conjugado com fosfatase alcalina (1:1000 em BSA) por 1,5 h, à temperatura ambiente, em agitador horizontal. Após a incubação,

procedeu-se novamente à lavagem por 30 min em TBS-T. A reação foi revelada utilizando a fosfatase alcalina até o aparecimento das bandas. Após a revelação das bandas, a membrana foi mergulhada em “solução de parada” (TBS-T e EDTA 0,5 M, pH 8,0). A membrana revelada foi escaneada e a intensidade de marcação foi analisada com o auxílio do programa UVP pela comparação entre a área das bandas formadas com o controle endógeno.

4. Análise estatística

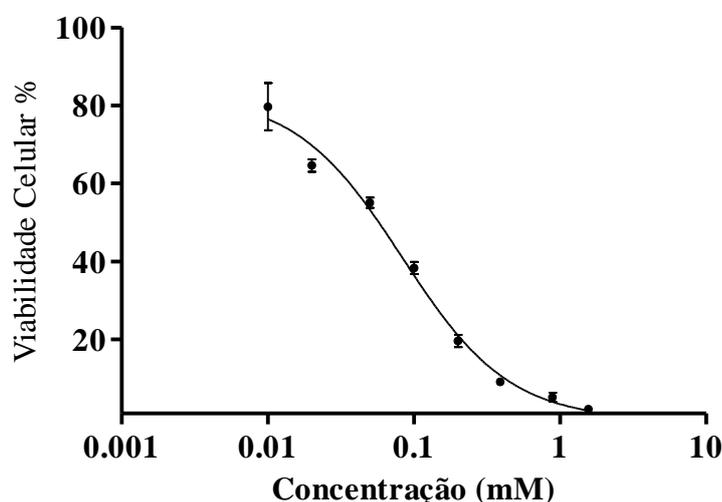
Os dados foram analisados utilizando o programa Graph pad prism (versão 5.0). Os experimentos foram realizados por três vezes independentes. Os resultados foram avaliados e transformados em porcentagem em relação ao controle e o IC50 foi obtido através da análise de regressão não-linear. As médias foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$. Os dados são apresentados graficamente em médias \pm desvio-padrão.

5. Resultados

5.1. Ensaio de citotoxicidade pelo método de redução do MTT

Para avaliação da capacidade citotóxica do composto LQFM030 frente às células K562 após 24h de exposição, foi realizado o ensaio de redução do MTT. Os resultados obtidos estão expressos na Figura 16. A viabilidade celular foi concentração-dependente e o valor do IC50 foi 0,56 mM.

Figura 16. Viabilidade de células da linhagem tumoral K562 após 24 h de exposição em diferentes concentrações do composto LQFM030 (0,01 – 1,56 mM).



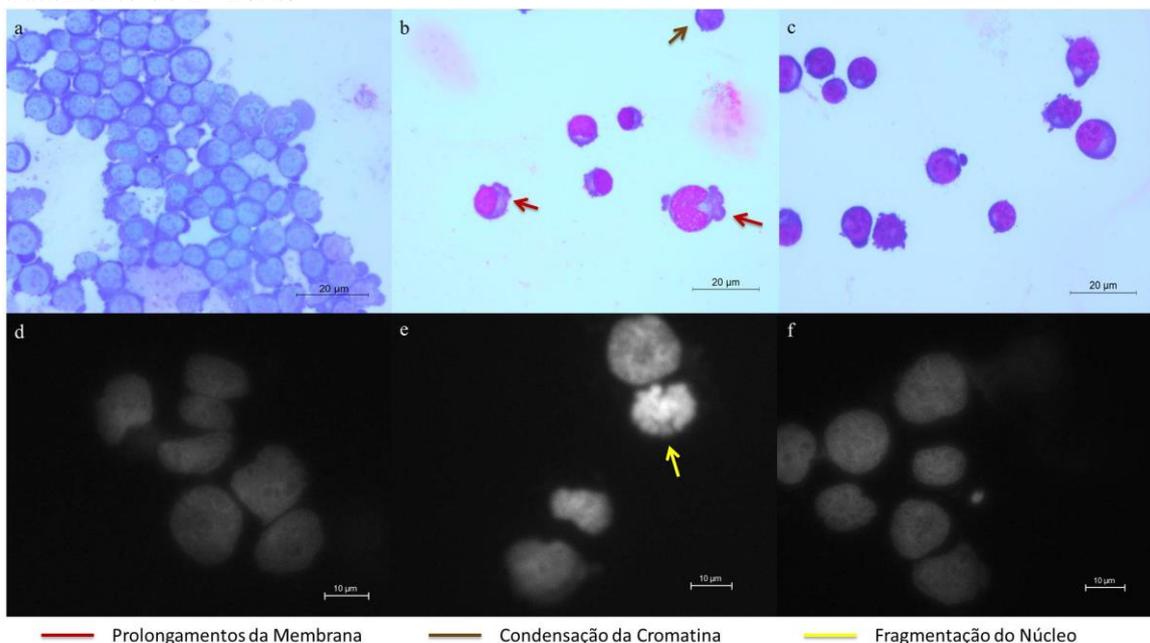
5.2. Análise morfológica por microscopia

Para avaliar os aspectos morfológicos das células K562 após o tratamento por 24h com o composto LQFM030 e Nutlin-3a, foi utilizado à microscopia óptica, com a coloração de May-Grünwald-Giemsa e microscopia de fluorescência com o corante Hoesch 33342.

A fragmentação do núcleo pode ser utilizada como indicativo de apoptose e podem ser observada em ambas as técnicas avaliadas. A Figura 17 mostra as células tumorais tratadas com o composto LQFM030 e Nutlin-3a. Nas células tratadas com o composto LQFM030 foi possível observar fragmentação do DNA, condensação da cromatina e a formação de prolongamentos da membrana (*blebs*). A condensação da cromatina e a fragmentação do DNA nuclear foi também observado após coloração com Hoesch (Figura 17E). Estes

resultados indicam um processo apoptótico após o tratamento com o composto LQFM030. Um padrão morfológico similar foi também observado após o tratamento com o Nutlin-3a.

Figura 17. Análise morfológica da linhagem tumoral K562, utilizando os respectivos corantes: May-Grünwald-Giemsa (A, B e C) e Hoesch 33342 (D, E e F), comparadas ao grupo controle não tratado (A e D), grupo tratado com o composto LQFM030 (0,283 mM) (B e E), e grupo tratado como o composto Nultin-3a (0,01 mM) (C e F), com tempo de tratamento de 24 horas.

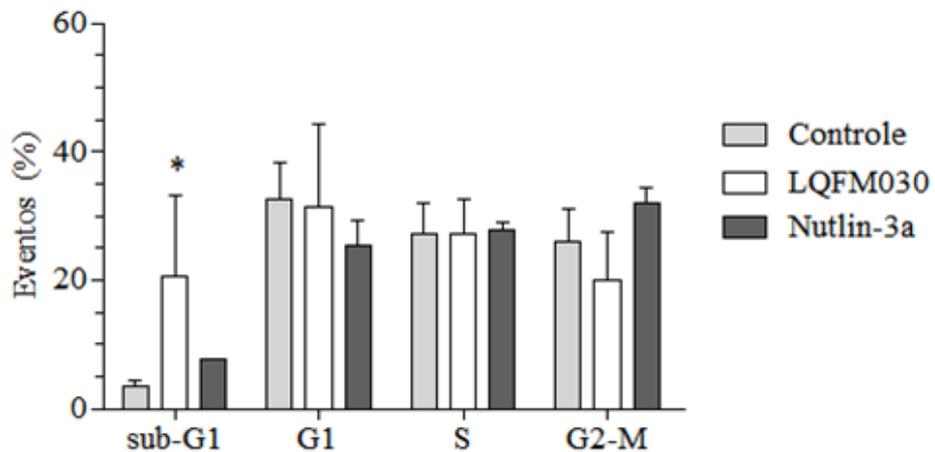
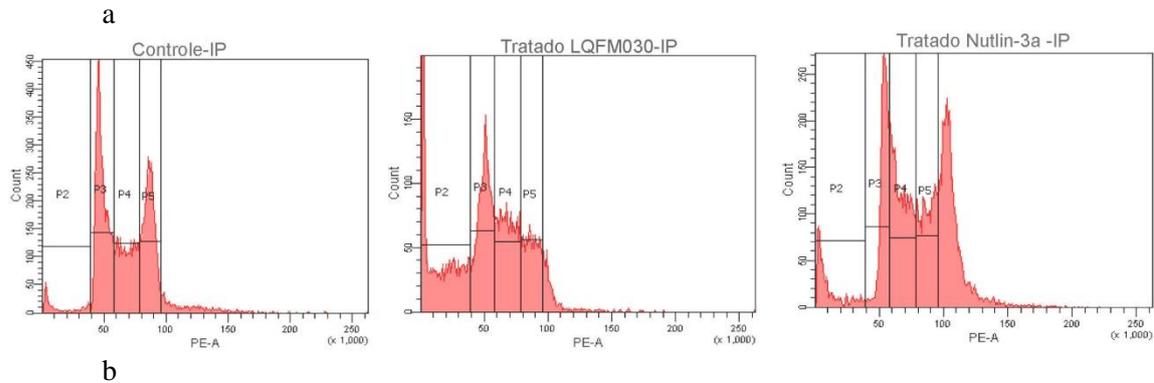


5.3. Análise do Ciclo Celular

A avaliação dos efeitos do composto LQFM030 sobre a progressão do ciclo celular das células K562, após 24 horas de tratamento, está apresentada na Figura 18. A análise revelou um aumento mais de 28 vezes de células na fase Sub-G1 no grupo tratado com o composto LQFM030, corroborando os dados morfológicos que indicavam um processo apoptótico. Nas fases G1 e S não foram observadas mudanças significativas ($P < 0,05$) entre controle e tratado. Já na fase G2/M observou-se uma redução, porém não significativa. O composto Nutlin-3a, por sua vez, não alterou de forma significativa ($P < 0,05$) o ciclo celular em células K562. Resultados similares foram observados por Arva et al., 2008 em células K562 tratadas com o composto Nutlin-3a.

Figura 18. Alteração do ciclo celular após 24 horas de tratamento das células K562 com os compostos LQFM030 (0,283 mM) e Nutlin-3a (0,01 mM) após 24 horas. Representação do percentual de células na fase sub-G1, S e G2/M quando comparados ao controle. (b) Comparação da intensidade de fluorescência do FITC entre células tratadas e não tratadas. As

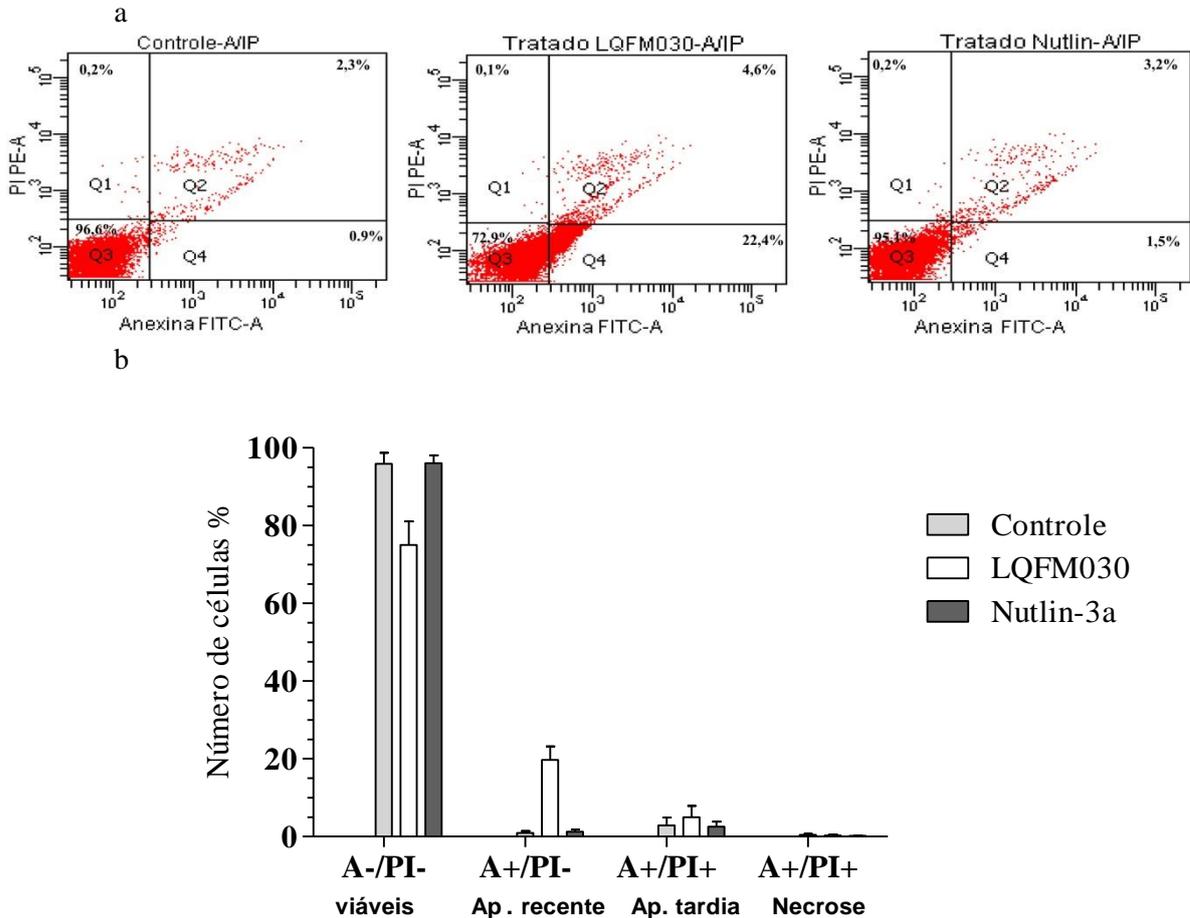
barras representam à média e desvio padrão de três experimentos independentes (* $p < 0.05$ comparado com o controle).



5.4. Análise da Externalização da Fosfatidilserina

Uma das características comumente observadas no processo apoptótico é a externalização da fosfatidilserina. Utilizando citometria de fluxo, as células foram marcadas com anexina e iodeto de propídeo após o tratamento com o LQFM030 ou Nutlin-3a. Após 24 horas de exposição, 21,5% das células apresentaram apoptose recente e 2,3% apresentaram apoptose tardia, quando comparadas com o controle (Figura 19). Os resultados obtidos indicam que a morte celular induzida pelo composto LQFM030 é por mecanismos apoptóticos. Já os resultados obtidos com o Nutlin-3a não revelaram um processo de apoptose recente e/ou tardia após 24 h de tratamento. Esses resultados corroboram dados da literatura que sugerem que as células K562 não sofrem apoptose após exposição com Nutlin-3a (Arva et al., 2008; Peterson et al., 2011; Trino et al., 2016).

Figura 19. Avaliação de apoptose das células K562 tratadas com os compostos LQFM030 (0,283 mM) e Nutlin-3a (0,01 mM) após 24 horas de exposição. Os dados são representados pelo percentual de células marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídio. (b) Comparação da intensidade de fluorescência do FITC entre células tratadas e não tratadas. As barras representam a média do desvio padrão do experimento repetido três vezes (* $p < 0.05$ comparado com o controle).



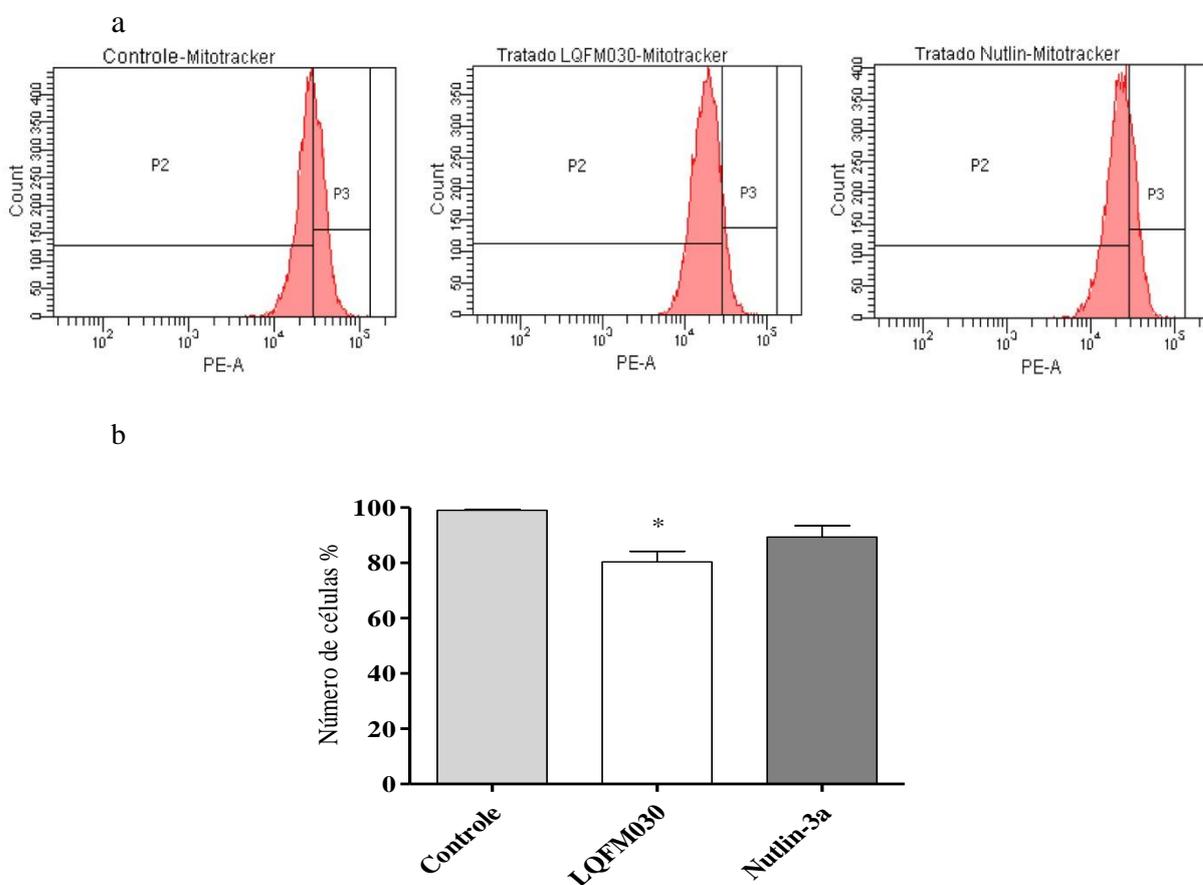
5.5. Análise do Potencial Mitocondrial

Com o objetivo de se investigar os efeitos do composto em estudo e Nutlin-3a sobre o potencial de membrana mitocondrial das células K562, foi utilizada a técnica de coloração com o *MitoTracker*[®] Red.

A Figura 20 apresenta os efeitos do composto LQFM030 e Nutlin-3a comparados ao grupo controle, com tempo de tratamento de 24 horas. O tratamento com o composto LQFM030 promoveu uma redução significativa ($P < 0.05$) do potencial de membrana mitocondrial de 21,7%, em relação ao grupo controle não tratado. De forma similar, o

tratamento das células K562 com o composto Nutlin-3a promoveu uma redução do potencial de membrana mitocondrial de 10,7%.

Figura 20. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em células K562 não tratadas e tratadas com o composto LQFM030 (0,283 mM) e com o composto Nutlin-3a (0,01 mM) após 24h de exposição. Os dados são representados pela média da intensidade de fluorescência de células marcadas com o corante MitoTracker® Red. (a) Histogramas mostrando a contagem de fluorescência (eixo x) X (eixo y). (b) Comparação da intensidade de fluorescência do FITC entre células tratadas e não tratadas. As barras representam a média do desvio padrão do experimento repetido três vezes (* $p < 0.05$ comparado com o controle).



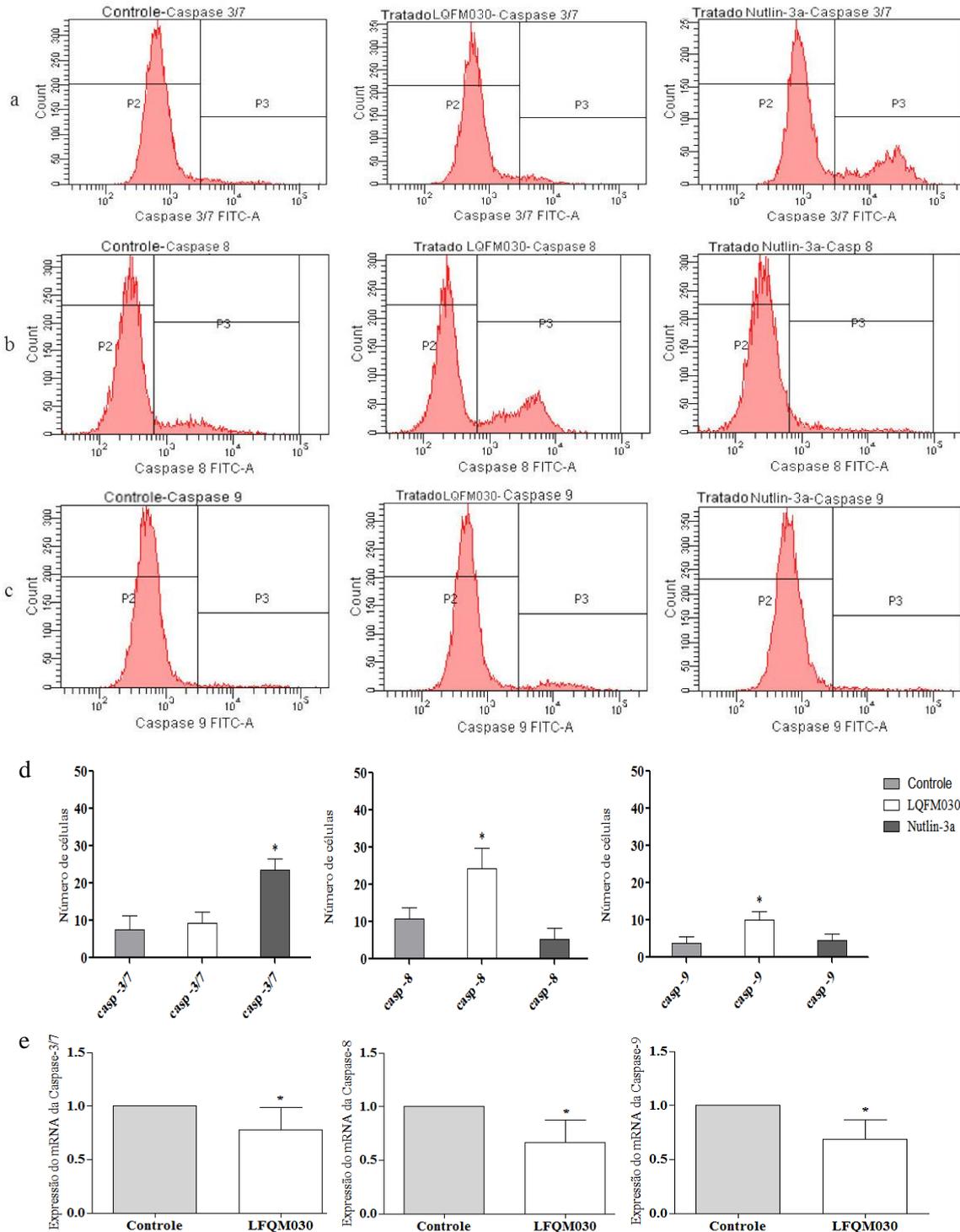
5.6. Análise da atividade das Caspases -3/7, -8, -9

Para confirmar o evento do processo de morte celular por apoptose, foi realizado o ensaio para avaliação da expressão de caspases -3/7, -8 e -9 em células K562 tratadas com o composto LQFM030 e Nutlin-3a. Na Figura 21 estão representados os resultados dessa avaliação. O tratamento com o composto LQFM030 induziu um aumento da atividade das

caspace -8 e -9 (Figura 21b). Estes dados indicam que o composto LQFM030 induz apoptose por ambas vias, a via extrínseca e intrínseca. Ao compararmos o grupo de células K562 tratado com o composto Nutlin-3a, notamos um aumento significativo ($P < 0.05$) apenas nas caspases -3/7, praticamente dobrando a atividade desta protease.

A fim de determinar alterações na transcrição dos genes que codificam as caspases -3, -8 e -9 foi realizado o ensaio de PCR em tempo real. Diferentemente do observado nos ensaios de detecção de atividade, a transcrição dos mRNA diminuíram após tratamento das células por 24 h com o composto LQFM030 (Figura 21e).

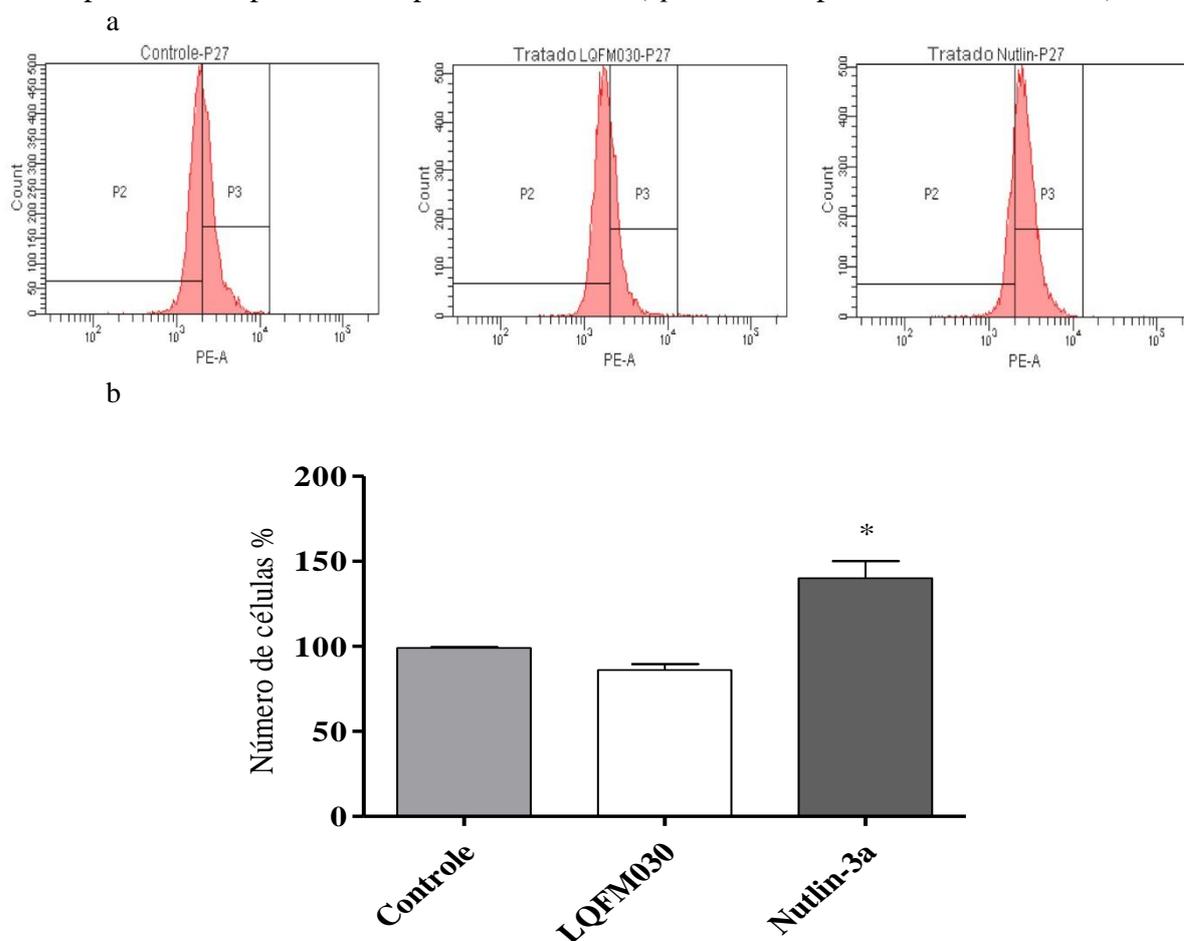
Figura 21. Avaliação da atividade das caspases -3/7 (a), -8 (b) e -9 (c) em células K562 não tratadas e tratadas com o composto LQFM030 (0,283 mM) e com o composto Nutlin-3a (0,01 mM) após 24h de exposição. Os dados são representados pelo percentual de células marcadas com seu respectivo anticorpo e comparados ao controle. (d) Comparação da intensidade de fluorescência do FITC entre células tratadas e não tratadas. (e) Detecção por PCR em Tempo Real da alteração da expressão do mRNA das caspases -3/7, -8, -9. Os genes foram normalizados com o HPRT1 e a análise foi feita por delta delta ct. As barras representam a média do desvio padrão do experimento repetido três vezes (* $p < 0.05$ comparado com o controle).



5.7. Análise da expressão da proteína p27

Para contribuir para a elucidação do mecanismo envolvido na morte celular induzida pela ação do composto LQFM030, foi avaliada a ação desse composto sobre a proteína p27. Assim como a proteína p21, a proteína p27 também é conhecida como inibidor do complexo proteico ciclina E/CDK2, sendo um importante regulador negativo do ciclo celular. Conforme demonstrado na Figura 22, não houveram mudanças significativas na expressão da proteína p27 após o tratamento com LQFM030. Contudo, Nutlin-3a promoveu o aumento de p27 de forma significativa ($P < 0.05$) (Fig. 12b).

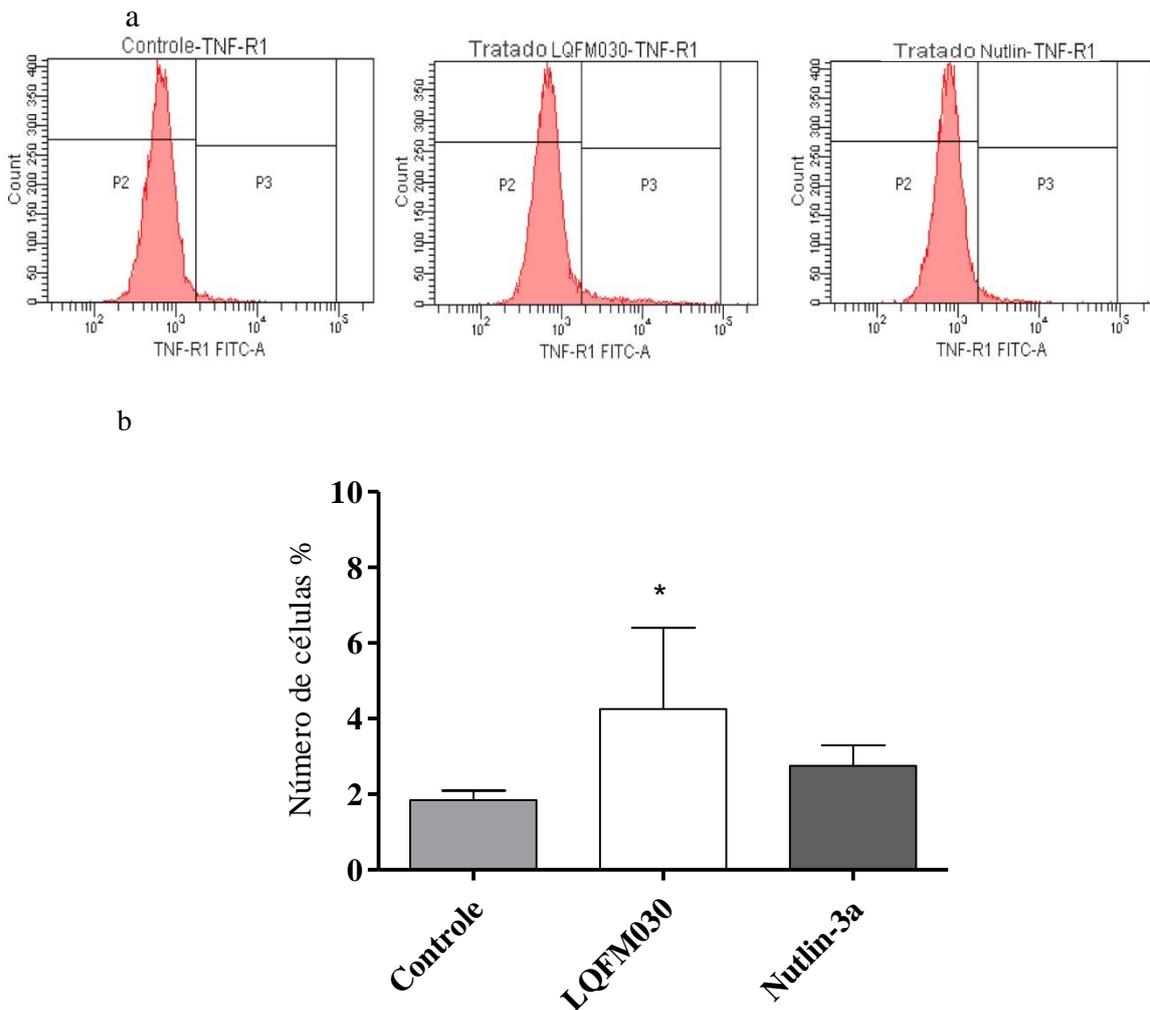
Figura 22. Avaliação da expressão da proteína p27 em células K562 não tratadas e tratadas com o composto LQFM030 (0,283 mM) e com o composto Nutlin-3a (0,01 mM) após 24h de exposição. Os dados são representados pelo percentual de células marcadas com seu respectivo anticorpo e comparados ao controle. (b) Comparação da intensidade de fluorescência do FITC entre células tratadas e não tratadas. As barras representam a média do desvio padrão do experimento repetido três vezes ($*p < 0.05$ comparado com o controle).



5.8. Análise da expressão da proteína TNF-R1

A estimulação do receptor de morte TNF-R1 pode levar à morte celular através da ativação da caspase -8, associada ao NF- κ B (Fator Nuclear kappa B). A indução das caspases -3/7, -6, e -8 é realizada através do complexo TRADD e FADD, que finalmente podem induzir a apoptose mediada por TNF-R1 (Tschopp e Micheau, 2003). No presente estudo, os dados demonstrados na Figura 23 revelaram que o composto LQFM030 alterou de forma significativa ($P < 0.05$) a expressão do receptor. Já o composto Nutlin-3a não alterou a expressão de TNF-R1.

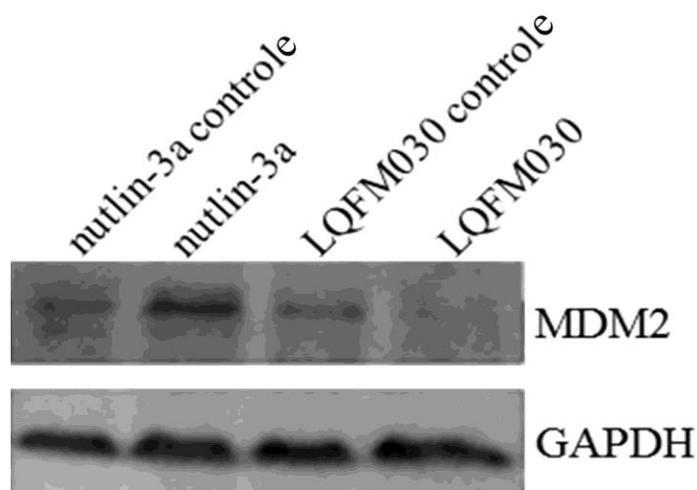
Figura 23. Avaliação da expressão da proteína TNF-R1 em células K562 não tratadas e tratadas com o composto LQFM030 (0,283 mM) e com o composto Nutlin-3a (0,01 mM) após 24h de exposição. Os dados são representados pelo percentual de células marcadas com seu respectivo anticorpo e comparados ao controle. . As barras representam a média do desvio padrão do experimento repetido três vezes ($*p < 0.05$ comparado com o controle).



5.9. Análise da expressão da proteína MDM2

Uma vez que LQFM030 foi desenhado a partir do inibidor de MDM2, alterações na expressão de MDM2 em K562 após o tratamento foram avaliadas por *western blot* (Figura 24). Como observado na Figura 24, a expressão de MDM2 diminuiu. Por sua vez, o composto Nutlin-3a não demonstrou alteração na expressão de MDM2.

Figura 24. Avaliação da expressão da proteína MDM2 em células K562 não tratadas e tratadas com o composto LQFM030 (0,283 mM) e com o composto Nutlin-3a (0,01 mM) após 24h de exposição.



5.10. Análise da expressão gênica de MDMX, p73, c-Myc e NF-κB

Os efeitos do composto LQFM030A sobre a expressão do mRNA dos genes de MDMX, p73, c-Myc e NF-κB foram avaliados por ensaios de PCR em tempo real. A expressão gênica foi normalizada utilizando a expressão do gene HPRT1.

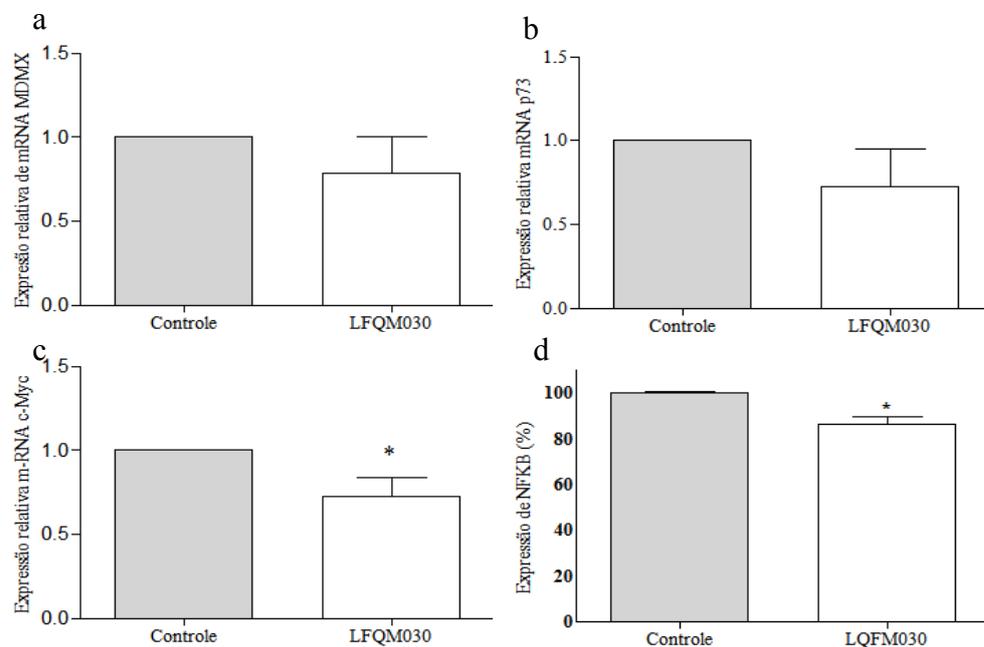
MDMX, juntamente com MDM2, regula as atividades de p53 e suas proteínas homólogas p63 e p73 (Zdzalik et al., 2010). Estudos anteriores revelaram que o Nutlin-3a também interage com MDMX, contudo com baixa afinidade (Joseph et al., 2010). Desta forma, com intuito de observar se o composto LQFM030 também pode alterar a expressão do transcrito de MDMX em células K562, ensaios de PCR em tempo real foram conduzidos. Como observado na Figura 25, LQFM030 foi capaz de diminuir a transcrição do gene MDM2, porém este composto não foi capaz interagir com o gene MDMX (Figura 25a).

Por p73 possuir atividades similares a p53 e porque K562 possui p53 mutada, também foi avaliado se LQFM030 seria capaz de alterar a expressão do transcrito de p73. De acordo com os resultados obtidos, a transcrição de p73 diminuiu em K562 após o tratamento, sugerindo que o fator de transcrição p73 talvez não esteja envolvido na apoptose desencadeada pelo composto (Figura 25).

O fator de transcrição c-Myc está superexpresso em muitos tumores e está envolvida na proliferação celular e na progressão do tumor. Este fator de transcrição também está em altas concentrações em pacientes com leucemia mieloide crônica e está relacionada a uma resposta pobre ao tratamento com imatinibe (Albajar et al., 2011). Após o tratamento das células K562 com o composto LQFM030 observamos uma diminuição do transcrito de c-Myc.

MDM2 possui outras funções na carcinogênese além de regular negativamente p53. MDM2 atua como agonista do fator de transcrição NF-kB promovendo proliferação e inflamação. NF-kB, por sua vez, também atua aumentando a produção de MDM2, já que o gene que codifica esta proteína é um de seus alvos (Thomasova et al., 2012). Essa atuação de MDM2 pode ser exemplificada através de sua inibição por Nutlin-3a que leva a uma diminuição de proliferação de células vasculares e supressão da inflamação (Hashimoto et al., 2011). Análises da expressão de mRNA em células K562 após tratamento com LQFM030 revelaram que este composto também foi capaz de diminuir a transcrição de NF-kB, corroborando com os dados da literatura.

Figura 25. Avaliação da expressão dos transcritos MDMX, p73, c-Myc e NF-kB em células K562 não tratadas e tratadas com o composto LQFM030 (0,283 mM) após 24h de exposição. O gene normalizador foi HPRT1 e as análises foram feitas pelo método delta delta ct (LIVAK et al., 2001).



6. Discussão

Considerando o papel fundamental que a oncoproteína MDM2 tem no desenvolvimento e progressão de tumores através de sua superexpressão em muitos cânceres, inclusive em leucemias, e seu papel como regulador negativo da p53 levou-o a ser um alvo para intervenção farmacológica (VASSILEV, 2007; SHEN & MAKI, 2011; WADE et al., 2013). Na última década, uma grande variedade de inibidores de MDM2 foram sintetizados entre eles os Nutlins, MI-291, RG7112, AMG232 e alguns já se encontram na fase de triagem clínica (VASSILEV, 2004; BROWN et al., 2009; SHEN & MAKI, 2011; HOE et al., 2014).

Os Nutlins (análogos de cis-imidazolina) inibem MDM2 ligando-se com alta afinidade ao sítio de ligação da p53 na proteína MDM2 e são citotóxicos para uma variedade de tumores p53 ativo e p53 mutados (VASSILEV, 2004; LAU et al., 2008; SECCHIERO et al., 2011). Em vista do potencial antitumoral que os Nutlins possuem, análogos dos Nutlins foram sintetizados pelo grupo do Prof. Dr. Ricardo Meneghetti e entre estes compostos, o LQFM030 se mostrou bastante promissor. LQFM030 foi originado a partir da simplificação molecular do Nutlin-1 e sua síntese é mais simples e menos custosa (MOTA et al., 2016). Conforme detalhado anteriormente, estudos iniciais, realizados pelo nosso grupo, revelaram que este composto possui ação antitumoral por induzir apoptose em células de carcinoma mamário de Ehrlich. O composto LQFM030 também reduziu a proliferação tumoral, além de apresentar atividade antiangiogênica *in vivo* (MOTA et al., 2016b). Diante dos resultados promissores, com diversidade de alvo de ação farmacológico, o potencial antitumoral do composto LQFM030 foi avaliado em células de leucemia mielóide crônica K562. Esta linhagem celular apresenta deficiência em alguns genes envolvidos na regulação do ciclo celular, tais como: p15INK4b, p16INK4a, p14ARF e p53 (DURLAND-BUSBICE & REISMAN, 2002; VAQUÉ et al., 2005).

As análises morfológicas iniciais das células K562 indicavam um possível evento de apoptose após o tratamento com o composto LQFM030. Os resultados foram confirmados observando o aumento da fase sub-G1 nos ensaios do ciclo celular e exposição da fosfatidilserina. De forma similar, LQFM030 também foi capaz de induzir apoptose em células de carcinoma mamário de Ehrlich que possuem p53 ativa (MOTA et al., 2016). Nestas células o composto LQFM030 aumentou o número de células em G1 e G2/M, e praticamente suprimiu as células na fase S, diferentemente do observado em nossos resultados. Em K562, as células não pararam em G1, a fase S não apresentou nenhuma diferença com o controle e

além de diminuir o número de células na fase G2/M. Outra diferença observada após exposição com o composto LQFM030 em células tumorais de Ehrlich e K562 foi à expressão da proteína p27. Uma das funções da proteína p27 é regular a progressão da fase G1 para fase S através de sua atividade inibidora de cinase dependente de cíclica (BELLETTI et al., 2005; ROY & BANERJEE, 2015). No carcinoma mamário p27 aumentou de forma significativa, entretanto em K562 p27 não houve alterações significativas.

Embora o composto Nutlin-3a seja capaz de induzir apoptose em células p53-mutada, não foram detectadas mudanças significativas no ciclo celular e na exposição de fosfatidilserina, indicando que este composto não é capaz de desencadear apoptose em células K562. Esses dados estão de acordo com os obtidos por Peterson e colaboradores (2011). Apesar do composto Nutlin-3a não promover apoptose em K562, em outras células p53 deficientes já foi observado que este composto é capaz de induzir de apoptose, provocando a parada do ciclo celular na fase G1 (LAU et al., 2008).

LQFM030 também foi capaz de diminuir o potencial da membrana da mitocôndria e induzir a ativação das caspases. Tanto a caspase -8 quanto a caspase -9 tiveram as suas atividades dobradas após o tratamento das células tumorais com o composto, resultados similar aos resultados obtidos com Ehrlich (MOTA et al., 2016). Já caspase -3/7 não apresentou aumento na atividade. Os resultados obtidos com a ativação das caspases confirmam que a morte desencadeada pelo composto LQFM030 é apoptose e ocorre tanto pela via intrínseca quanto pela extrínseca. Apesar do Nutlin-3a não ter desencadeado apoptose em células K562, foi observado um aumento significativo das atividades da caspase -3/7. O significado desta ativação é desconhecido, porém é sabido que as caspases estão envolvidas em outros processos fisiológicos além da morte celular (NHAN et al., 2006; SHALINI et al., 2015). Por outro lado, os transcritos das caspases -3/7, -8 e -9 diminuíram após o tratamento com LQFM030. Diferentes explicações podem ser dadas para estes resultados. O primeiro seria que a quantidade da proteína não reflete, necessariamente, a quantidade de transcrito devido os controles pós-transcricionais ou pós-traducionais. Sabe-se que somente 40% da quantidade de uma proteína podem ser explicada pelo seu transcrito (VOGEL & MARCOTTE, 2012). No processo apoptótico também foi relatado a não paridade entre mRNA e proteína com outros marcadores. Na apoptose desencadeada pela privação de insulina em células de sertoli somáticas há redução do mRNA dos genes Bax e p53, porém as suas respectivas proteínas mostram-se aumentadas (DIAS et al., 2013). Outra explicação seria

o período em que há a paridade entre os mRNA das caspases e suas respectivas proteínas em células tratadas com o composto LQFM030 não foi avaliado.

A via extrínseca de apoptose é desencadeada via receptores de morte (Fas/CD95, TNFR1 e TRAIL1 e 2) e dependentes (netrin-1, DCC e UNC5B) (GALLUZZI et al., 2012). Uma vez que caspase -8 foi ativada após o tratamento com LQFM030, foi verificado se o receptor TNFR1 poderia estar envolvida processo. Os nossos dados sugerem que o receptor TNFR1 está ligado ao desencadeamento da via extrínseca.

Em ensaios anteriores, LQFM030 foi capaz de inibir a expressão de MDM2 em células p53 selvagem (Ehrlich) (MOTA et al., 2016). Apesar de K562 não possuir p53 ativa, outras proteínas da família p53, como p73 e p63 possuem atividades similares a p53 e são moduladas por MDM2. E além da atividade reguladora da família p53, MDM2 também possui atividades p53-independentes (DAUJAT et al., 2001; THOMASOVA et al., 2012). De forma similar ao obtido em carcinoma mamário de Ehrlich, LQFM030 também foi capaz de inibir a expressão de MDM2 em K562. De acordo com os resultados obtidos, o composto LQFM030 apresentou atividades antitumorais também em células p53 deficientes K562. A importância deste resultado recai no fato que pacientes que se encontram em fase acelerada e em crise blástica (~30%) possuem maior propensão de promover alterações no gene p53 do que pacientes na fase crônica da leucemia mielóide crônica (MITELMAN, 1993; AHUJA et al., 1998). Assim, independente se as células tumorais possuem p53 ativa ou não, este composto é capaz de controlar crescimento e induzir a morte por apoptose. O composto Nutlin-3a, por sua vez, aumentou a concentração de MDM2. Essa capacidade de aumentar MDM2 em células p53 deficientes, além de tumores p53 selvagens, já foi relatado. Em células HCT116 P53^{-/-}, o composto Nutlin-3a foi capaz de aumentar a expressão de MDM2, contudo em células H1299, também p53-deficiente, Nutlin não promoveu nenhuma alteração na expressão de MDM2 (DU et al., 2009; LI et al., 2014).

A fim de determinar a modulação de outros genes supressores de tumor e oncogenes nas células K562 tratadas com LQFM030, os transcritos de MDMX, p73, c-Myc e NF-κB também foram avaliados. Os transcritos MDMX não apresentaram alterações significativas. No entanto o gene MDM2 diminuiu, indicando que LQFM030 também é capaz de modular MDM2. Lembrando que assim como MDM2, MDMX também modula p53, p73 e possui funções p53-independentes (BIDERMAN et al., 2012).

A família de fatores de transcrição p53 é composta pelas isoformas p53, p73 e p63 e possuem importantes funções no desenvolvimento, diferenciação e resposta ao estresse celular

(MURRAY-ZMIJEWSKI et al., 2006; BOURDON, 2007). Os genes p73 e p63 dão origem a proteínas que podem possuir ação agonista ou antagonista de p53, isto por codificarem diferentes proteínas que possuem diferentes domínios (isoformas) (MURRAY-ZMIJEWSKI et al., 2006; MULLER et al., 2006). p73 tem recebido especial atenção porque suas isoformas podem atuar em funções opostas, tanto como supressora de tumor quanto como oncogene. Duas isoformas de p73 se destacam, a supressora de tumor TAp73 que possui o tamanho completo e a isoforma DNp73 que possui a porção N-terminal truncada, e tem a função de dominante negativo com TAp73 e atua como oncogene (STIEWE & PUTZER, 2002; MARABESE et al. 2007; LOGOTHETI et al., 2013). A isoforma TAp73 está superexpressa em uma grande diversidade de tumores, e geralmente está co-expressa com DNp73 (LOGOTHETI et al., 2013). p73 também está superexpresso em tumores hematológicos, incluindo as leucemia mielóide crônica e leucemia mielóide aguda (TSCHAN et al., 2000). O tratamento das células K562 com o composto LQFM030 levou a diminuição do transcrito TAp73. É sabido que p73 está superexpressa em K562, principalmente TAp73 (PETERS et al., 1999; TSCHAN et al., 2000). Apesar de nossos dados indicarem a diminuição da isoforma que possui papel de supressora de tumor, a razão entre TAp73/DNp73 é que parece predizer a contribuição da tumorigênese e quimioresistência (LUCENA-ARAUJO et al., 2015). Estudos avaliando a isoformas DNp73 poderão ajudar no entendimento do papel destas isoformas em K562 tratadas com LQFM030.

c-Myc é um fator de transcrição que regula positivamente a proliferação celular e está superexpresso em muitos tumores sólidos e hematológicos. Em leucemias, especialmente em CML, é observada uma alta expressão de c-Myc que está ligado a uma baixa resposta ao imatinibe (ALABAJAR et al., 2011). Por sua atuação na proliferação, no aumento da síntese proteica e no metabolismo energético, a diminuição ou a inativação de c-Myc resulta na parada do ciclo celular (ALABAJAR et al., 2011; BRETONES et al., 2015). Assim, devido a sua importância na tumorigênese à modulação da transcrição de c-Myc foi também avaliada. De forma significativa, observamos a diminuição da transcrição de c-Myc. Este dado sugere que a diminuição de c-Myc possa ser um dos fatores responsáveis pela diminuição da proliferação celular e indução de apoptose desencadeada pelo composto LQFM030.

Outro importante fator de transcrição é o NF-kB, responsável pela regulação de diversos genes e a sua inibição desencadeia apoptose. É reconhecido como o mediador central na resposta imunológica, sua alta atividade está ligada a inflamação crônica no qual é determinante para o desenvolvimento tumoral e quimioresistência (DEY et al., 2008). Mais de

200 genes estão sob a sua regulação, entre eles está o MDM2. NF-kB estimula a expressão de MDM2 que por sua vez aumenta a expressão de NF-kB (DEY et al. 2008; THOMASOVA et al., 2012). Assim, a expressão de NF-kB também foi avaliada em células K562 após tratamento com o composto LQFM030, e foi também verificado uma diminuição em sua transcrição. Estes resultados são muito promissores, uma vez que atualmente existe uma procura por moléculas que sejam capazes de regular simultaneamente os dois maiores fatores de transcrição, p53/p73 e NF-kB que estão envolvidos na carcinogênese e na regulação da resposta imune, para fins terapêuticos (DEY et al., 2008; THOMASOVA et al., 2012).

Hanahan e Weiberg (2000 e 2011) postularam 10 processos biológicos que são característicos das células tumorais: manutenção de sinais autoproliferativos, evasão de supressores de crescimento, resistência à morte, replicação ilimitada, indução de angiogênese, invasão e metástases, instabilidade genômica, inflamação indutora de tumor, reprogramação da bioenergética celular e evasão da resposta imune. Hainaut e Plymoth. (2013) por sua vez, pontuaram a importância de desenvolver e direcionar um fármaco que tenha a capacidade de interferir nas rotas de conexão que ligam esses 10 processos biológicos. O composto LQFM030 foi capaz de intervir nos diferentes processos biológicos característicos das células tumorais. O composto foi capaz de interferir na proliferação celular através da diminuição de c-Myc, conhecido mitógeno, *in vitro* e, *in vivo* foi capaz de controlar e reduzir a proliferação tumoral sendo categorizado no grupo 5, não tóxico, do Global Harmonized System (GHS). Revelou atividades antiangiogênicas *in vivo*, através da diminuição de VEGF, além de diminuir um dos principais reguladores da inflamação, NF-kB. Além do mais, LQFM030 foi capaz de modular as vias p53-dependentes e p53-independentes através da regulação da ação de MDM2/MDMX. A importância fica mais ressaltada devido à ligação já estabelecida da inflamação crônica com o desenvolvimento tumoral através do eixo p53/MDM2/NF-kB e que todos os genes modulados pelo composto LQFM030 descritos acima são, atualmente, alvos para o desenvolvimento terapias antitumorais. Concluindo, o composto LQFM030 apresentou-se muito versátil em sua atuação biológica e muito promissor em sua atividade antitumoral com mecanismos diferentes daqueles apresentados pelo Nutlin-3a.

7. Conclusão

O composto LQFM030 apresentou atividade citotóxica contra as células tumorais K562, com IC50 de 0,56 mM.

As análises morfológicas das células K562 indicam um possível evento de apoptose após o tratamento com o composto LQFM030, confirmado pela exposição da fosfatidilserina e pelo aumento da fase sub-G1, diminuição da transcrição de c-Myc, e de p27.

O composto LQFM030 foi capaz de diminuir o potencial da membrana mitocôndria e induzir a ativação das caspases -8 e -9, confirmando morte celular pela via intrínseca (ativando TNFR) e pela extrínseca.

O tratamento das células K562 com o composto LQFM030 levou a diminuição do transcrito TAp73. Independente de p53 ativa ou não em células tumorais, o composto LQFM030 é capaz de controlar crescimento e induzir a morte por apoptose, através da inibição da expressão de MDM2.

No presente trabalho, o composto Nutlin3-a não foi capaz de induzir apoptose nas células tumorais de maneira significativa como o composto LQFM030.

8. Referências Bibliográficas

- AHUJA, H.; BAR-ELI, M.; ADVANI, S.H.; BENCHIMOL, S.; CLINE, M.J. Alterations in the p53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 86, n.17, p.6783-6787, 1989.
- ALBAJAR, M.; GÓMEZ-CASARES, M.T.; LLORCA, J.; MAULEON, I.; VAQUÉ, J.P.; ACOSTA, J.C.; BERMÚDEZ, A.; DONATO, N.; DELGADO, M.D.; LEÓN, J. MYC in chronic myeloid leukemia: induction of aberrant DNA synthesis and association with poor response to imatinib. **Mol. Cancer Res**. v.9, n.5, p.564-576, 2011.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artemed. 4º ed., cap.12, p.1205-1268, 2010.
- ARVA, N.C.; TALBOTT, K.E.; OKORO, D.R.; BREKMAN, A.; QIU, W.G.; BARGONETTI, J. Disruption of the p53-Mdm2 complex by Nutlin-3 reveals different cancer cell phenotypes. **Ethn Dis**. v.18, n.2, p.1-8, 2008.
- ASTER, J. C. Os sistemas hematopoiético e linfoide. In.: **Robbins Patologia Básica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 8ª ed., cap.12, p.461-523. 2008.
- BARTEK, J.; LUKAS, J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. **Curr Opin Cell Biol**. v.13, n.6, p.738-747, 2001.
- BELLETTI, B.; NICOLOSO, M.S.; SCHIAPPACASSI, M.; CHIMIENTI, E.; BERTON, S.; LOVAT, F.; COLOMBATTI, A.; BALDASSARRE, G. p27(kip1) functional regulation in human cancer: a potential target for therapeutic designs. **Curr Med Chem**. v.12, n.14, p.1589-605, 2005.
- BERGANTINI, A.P.F.; CASTRO, F.A.; SOUZA, A.M.; FETT-CONTE, A.C. Leucemia Mielóide Crônica e o sistema Faz-FasL. **Res Bras Hematol Hemoter**. v.27, n.2, p.120-125, 2005.
- BIDERMAN, L.; MANLEY, J.L.; PRIVES, C. Mdm2 and MdmX as Regulators of Gene Expression. **Genes Cancer**. V.3, n.3-4, p.264-273, 2012.
- BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S.A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry**. v.70, p.231-239, 2005.
- BRETONES, G.; DELGADO, M.D.; LEÓN, J. Myc and cell cycle control. **Biochim Biophys Acta**. v.1849, n.5, p.506-16, 2015.
- BOURDON, J.C. p53 and its isoforms in cancer. **Br J Cancer**. v.97, n.3, p.277-282, 2007.
- BROWN, C.J.; LAIN, S.; VERMA, C.S.; FERSHT, A.R.; LANE, D.P. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. **Nat Rev Cancer**. v.9, n.12, p.862-73, 2009.
- CHEOK, C.F.; VERMA, C.S.; BASELGA, J.; LANE, D.P. Translating p53 into the clinic. **Nat Rev Clin Oncol**. v.8. n.1, p.25-37, 2011.

DA MOTA, M.F.; CORTEZ, A.P.; BENFICA, P.L.; RODRIGUES, B.D.; CASTRO, T.F.; MACEDO, L.M.; CASTRO, C.H.; LIÃO, L.M.; DE CARVALHO, F.S.; ROMEIRO, LA.; MENEGATTI, R.; VERLI H, VILLAVICENCIO, B.; VALADARES, M.C. Induction of apoptosis in Ehrlich ascites tumour cells via p53 activation by a novel small-molecule MDM2 inhibitor - LQFM030. **J Pharm Pharmacol**. 2016, Jun 28. doi: 10.1111/jphp.12573.

DAUJAT, S.; NEEL, H.; PIETTE, J. Preferential expression of Mdm2 oncogene during the development of neural crest and its derivatives in mouse early embryogenesis. **Mech Dev**. v.103, n.1-2, p.163-165, 2001.

DEY, A.; TERGAONKAR, V.; LANE, D.P. Double-edged swords as cancer therapeutics: simultaneously targeting p53 and NF- κ B pathways. **Nat Rev Drug Discov**. v.7, n.12, p.1031-1040, 2008.

DESAGHER, S.; MARTINOU, J.C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol**. v.10, n.9, p.369-377, 2000.

DIAS, T.R.; RATO, L.; MARTINS, A.D.; SIMÕES, V.L.; JESUS, T.T.; ALVES, M.G.; OLIVEIRA, P.F. Insulin deprivation decreases caspase-dependent apoptotic signaling in cultured rat sertoli cells. **ISRN Urol**. v.2013, Article ID 970370, 8 pages, 2013.

DU, W.; WU, J.; WALSH, E.M.; ZHANG, Y.; CHEN, C.Y.; XIAO, Z.X. Nutlin-3 affects expression and function of retinoblastoma protein: role of retinoblastoma protein in cellular response to Nutlin-3. **J Biol Chem**. v.284, n.39, p.26315-21, 2009.

DURLAND-BUSBICE S.; REISMAN, D. Lack of p53 expression in human myeloid leukemias is not due to mutations in transcriptional regulatory regions of the gene. **Leukemia**. v.16, n.10, p.2165–2167, 2002.

EBRAHIM M, MULAY SR, ANDERS HJ, THOMASOVA D. MDM2 beyond cancer: podoptosis, development, inflammation, and tissue regeneration. **Histol Histopathol**. v.30, n.11, p.1271-1282, 2015.

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

Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer
José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: **INCA**, 2015.

GALLUZZI, L.; BRAVO-SAN PEDRO, J.M.; VITALE, I.; AARONSON, S.A.; ABRAMS, J.M.; ADAM, D.; ALNEMRI, E.S.; ALTUCCI, L.; ANDREWS, D.; ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M.; BAEHRECKE, E.H.; BAZAN, N.G.; BERTRAND, M.J.; BIANCHI, K.; BLAGOSKLONNY, M.; BLOMGREN, K.; BORNER, C.; BREDESEN, D.E.; BRENNER, C.; CAMPANELLA, M.; CANDI, E.; CECCONI, F.; CHAN, F.K.; CHANDEL, N.S.; CHENG, E.H.; CHIPUK, J.E.; CIDLOWSKI, J.A.; CIECHANOVER, A.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L.; DE LAURENZI, V.; DE MARIA, R.; DEBATIN, K.M.; DI DANIELE, N.; DIXIT, V.M.; DYNLACHT, B.D.; EL-DEIRY, W.S.; FIMIA, G.M.; FLAVELL, R.A.; FULDA, S.; GARRIDO, C.; GOUGEON, M.L.; GREEN, D.R.; GRONEMEYER, H.; HAJNOCZKY, G.; HARDWICK, J.M.; HENGARTNER, M.O.; ICHIJO, H.; JOSEPH, B.; JOST, P.J.; KAUFMANN, T.; KEPP, O.; KLIONSKY, D.J.;

KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LEMASTERS, J.J.; LEVINE, B.; LINKERMANN, A.; LIPTON, S.A.; LOCKSHIN, R.A.; LÓPEZ-OTÍN, C.; LUGLI, E.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MARINE, J.C.; MARTIN, S.J.; MARTINOU, J.C.; MEDEMA, J.P.; MEIER, P.; MELINO, S.; MIZUSHIMA, N.; MOLL, U.; MUÑOZ-PINEDO, C.; NUÑEZ, G.; OBERST, A.; PANARETAKIS, T.; PENNINGER, J.M.; PETER, M.E.; PIACENTINI, M.; PINTON, P.; PREHN, J.H.; PUTHALAKATH, H.; RABINOVICH, G.A.; RAVICHANDRAN, K.S.; RIZZUTO, R.; RODRIGUES, C.M.; RUBINSZTEIN, D.C.; RUDEL, T.; SHI, Y.; SIMON, H.U.; STOCKWELL, B.R.; SZABADKAI, G.; TAIT, S.W.; TANG, H.L.; TAVERNARAKIS, N.; TSUJIMOTO, Y.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P.; VILLUNGER, A.; WAGNER, E.F.; WALCZAK, H.; WHITE, E.; WOOD, W.G.; YUAN, J.; ZAKERI, Z.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death Differ.** v.22, n.1, p.58-73, 2015.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J.M.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L.; EL-DEIRY, W.S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D.R.; HENGARTNER, M.O.; KEPP, O.; KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUÑEZ, G.; PETER, M.E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D.C.; SHI, Y.; SIMON, H.U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differ.** v.19, n.1, p.107-120, 2012.

HAIL, N.Jr.; CARTER B.Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. **Apoptosis.** v.11, n.6, p.889–904, 2006.

HAINAUT, P.; PLYMOUTH, A. Targeting the hallmarks of cancer: towards a rational approach to next-generation cancer therapy. **Curr Opin Oncol.** v.25, n.1, p.50-51, 2013.

HAJRA, K.M.; LIU, J.R. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis.** v.9, n.6, p.691-704, 2004.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell.** v.144, n.5, p.646-74, 2011.

HASHIMOTO, T.; ICHIKI, T.; IKEDA, J.; NARABAYASHI, E.; MATSUURA, H.; MIYAZAKI, R.; INANAGA, K.; TAKEDA, K.; SUNAGAWA, K. Inhibition of MDM2 attenuates neointimal hyperplasia via suppression of vascular proliferation and inflammation. **Cardiovasc Res.** v.91, n.4, p.711–719, 2011.

HUGHES, R.A.; MIKLOS, A.E.; ELLINGTON, A.D. Gene synthesis: methods and applications. **Methods Enzymol.** v.498, n.1, p.277-309, 2011.

JÚNIOR, G.B.C.; KLUMB C.E.K.; MAIA, R.C. p53 e as Hemopatias Malignas. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v.48n.3, p. 419-427, 2002.

JOSEPH, T.L.; MADHUMALAR, A.; BROWN, C.J.; LANE, D.P.; VERMA, C.S. Differential binding of p53 and Nutlin to MDM2 and MDMX: computational studies. **Cell Cycle.** v.15, n.6, p.1167-1181, 2010.

- KARTAL-YANDIM, M; ADAN-GOKBULUT, A; BARAN, Y. Molecular mechanisms of drug resistance and its reversal in cancer. **Crit Rev Biotechnol.** v.36, n.4, p.716-26, 2016.
- KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v.26, n.4, p.239-57, 1972.
- KHOO K.H.; VERMA, C.S.; LANE, D.P. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. **Nat Rev Drug Discov.** v.13, n.3, p.217-236, 2014.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiol Rev.** v.87, n.1, p.99-163, 2007.
- LAU, L.M.; NUGENT, J.K.; ZHAO, X.; IRWIN, M.S. HDM2 antagonist Nutlin-3 disrupts p73-HDM2 binding and enhances p73 function. **Oncogene.** v.27, n.7, p.997-1003, 2008.
- LI, H.; ZHANG, Y.; STRÖSE, A.; TEDESCO, D.; GUROVA, K.; SELIVANOVA, G. Integrated high-throughput analysis identifies Sp1 as a crucial determinant of p53 mediated apoptosis. **Cell Death Differ.** v.21, n.9, p.1493-502, 2014.
- LIAO, X.; TANG, S.; THRASHER, J. B.; GRIEBLING, T. L.; LI, B. Small-interfering RNA-induced androgen receptor silencing leads to apoptotic cell death in prostate cancer. **Mol Cancer Ther.** v. 4, n. 4, p.505-515, 2005.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods.** v.25, n.4, p.402-408, 2001.
- LOGOTHETI, S.; PAVLOPOULOU, A.; GALTSIDIS, S.; VOJTESEK, B.; ZOUMPOURLIS, V. Functions, divergence and clinical value of TAp73 isoforms in cancer. **Cancer Metastasis Rev.** v.32, n.3-4, p.511-534, 2013.
- LOZZIO, C.B.; LOZZIO, B.B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. **Blood.** v.45, n.3, p.321-334, 1975.
- LUCENA-ARAÚJO, A.R.; KIM, H.T.; THOMÉ, C.; JACOMO, R.H.; MELO, R.A.; BITTENCOURT, R.; PASQUINI, R.; PAGNANO, K.; GLÓRIA, A.B.; CHAUFFAILLE, M.L.; ATHAYDE, M.; CHIATTONE, C.S.; MITO, I.; BENDLIN, R.;
- SHERR, C; J.; McCORMICK, F. The Rb and p53 pathway in cancer. **Cancer Cell.** v.2, n2, p.103-111, 2002.
- SOUZA, C.; BORTOLHEIRO, C.; COELHO-SILVA, J.L.; SCHRIER, S.L.; TALLMAN, M.S.; GRIMWADE, D.; GANSER, A.; BERLINER, N.; RIBEIRO, R.C.; LO-COCO, F.; LÖWENBERG, B.; SANZ, M.A.; REGO, E.M. High $\Delta Np73/TAp73$ ratio is associated with poor prognosis in acute promyelocytic leukemia. **Blood.** v.126, n.20, p.2302-2306, 2015.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat Rev Cancer.** v.9, n.3, p.153-166, 2009.
- MARABESE, M.; VIKHANSKAYA, F.; BROGGINI, M. p73: A chiaroscuro gene in cancer. **Eur J Cancer.** v.43, n.9, p.1361-1372, 2007.

MICHEAU, O.; TSCHOPP, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. **Cell**. v.114, n.2, p.181-190.

MITELMAN, F. The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. **Leuk Lymphoma**. v.11, n.1, p.11–15, 1993.

MÜLLER, M.; SCHLEITHOFF, E.S.; STREMMEL, W.; MELINO, G.; KRAMMER, P.H.; SCHILLING, T. One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity. **Drug Resist Updat**. v.9, n.6, p.288–306, 2006.

MURRAY-ZMIJEWSKI, F.; LANE, D.P.; BOURDON, J.C. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. **Cell Death Differ**. v.13, n.6, p.962–972, 2006.

NHAN, T.Q.; LILES, W.C.; SCHWARTZ, S.M. Physiological functions of caspases beyond cell death. **Am J Pathol**. v.169, n.3, p.729-737, 2006.

PhRMA 2015. BIOPHARMACEUTICAL RESEARCH & DEVELOPMENT PROCESS. 2015.

PETERS, U.R.; TSCHAN, M.P.; KREUZER, K.A.; BASKAYNAK, G.; LASS, U.; TOBLER, A.; FEY, M.F.; SCHMIDT, C.A. Distinct Expression Patterns of the p53-Homologue p73 in Malignant and Normal Hematopoiesis Assessed by a Novel Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assay and Protein Analysis. **Cancer Res**. v.59, n.17, p.4233-4236, 1999.

PETERSON, L.F.; MITRIKESKA, E.; GIANNOLA, D.; LUI, Y.; SUN, H.; BIXBY, D.; MALEK, S.N.; DONATO, N.J.; WANG, S.; TALPAZ, M. p53 stabilization induces apoptosis in chronic myeloid leukemia blast crisis cells. **Leukemia**. v.25, n.5, p.761-769, 2011.

PORTT, L.; NORMAN, G.; CLAPP, C.; GREENWOOD, M.; GREENWOOD, M.T. Anti-apoptosis and cell survival: a review. **Biochim Biophys Acta**. v.1813, n.1, p.238–259, 2011.

PRASAD, S.; GUPTA, S.C.; AGGARWAL, B.B. Serendipity in Cancer Drug Discovery: Rational or Coincidence? **Trends Pharmacol Sci**. v.37, n.6, p. 435-50, 2016.

ROY, A.; BANERJEE, S. p27 and leukemia: cell cycle and beyond. **J Cell Physiol**. v.230, n.3, p.504-509, 2015.

SACOMAN, J. L. Atividade anticâncer e mecanismo de morte celular dos extratos brutos e frações de *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae) e *Potomorphe umbellata* (L.) Miquel (piperaceae). 2007. 124 p. Dissertação de Mestrado em Biologia celular e estrutural, Universidade Estadual de Campinas. São Paulo. 2007.

SHEN, H.; MAKI, C.G. Pharmacologic activation of p53 by small-molecule MDM2 antagonists. **Curr Pharm Des**. v.17, n.6, p.560-568, 2011.

SHALINI, S.; DORSTYN, L.; DAWAR, S.; KUMAR, S. Old, new and emerging functions of caspases. **Cell Death Differ**. v.22, n.4, p.526-539, 2015.

SECCHIERO, P.; BOSCO, R.; CELEGHINI, C.; ZAULI, G. Recent Advances in the Therapeutic Perspectives of Nutlin-3. **Curr Pharm Des.** v.17, n.6, p. 569-577, 2011.

SIEGEL, R.; WARD, E.; BRAWLEY, O.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. **CA Cancer J Clin.** v.61, n.4, p.212-236, 2011.

STIEWE, T.; PÜTZER, B.M. Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene? **Cell Death Differ.** v.9, n.3, p.237-245, 2002.

THOMASOVA, D.; MULAY, S.R.; BRUNS, H.; ANDERS, H.J. p53-Independent Roles of MDM2 in NF- κ B Signaling: Implications for Cancer Therapy, Wound Healing, and Autoimmune Diseases. **Neoplasia.** v.14, n.12, p.1097-1101, 2012.

TRINO, S.; IACOBUCCHI, I.; ERRIQUEZ, D.; LAURENZANA, I.; DE LUCA, L.; FERRARI, A.; DI RORÀ, A.G.; PAPAYANNIDIS, C.; DERENZINI, E.; SIMONETTI, G.; LONETTI, A.; VENTURI, C.; CATTINA, F.; OTTAVIANI, E.; ABBENANTE, M.C.; RUSSO, D.; PERINI, G.; MUSTO, P.; MARTINELLI, G. Targeting the p53-MDM2 interaction by the small-molecule MDM2 antagonist Nutlin-3a: a new challenged target therapy in adult Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia patients. **Oncotarget.** v.15, n.11, p.12951-12961, 2016.

TSCHAN, M.P.; GROB, T.J.; PETERS, U.R.; LAURENZI, V.D.; HUEGLI, B.; KREUZER, K.A.; SCHMIDT, C.A.; MELINO, G.; FEY, M.F.; TOBLER, A.; CAJOT, J.F. Enhanced p73 expression during differentiation and complex p73 isoforms in myeloid leukemia. **Biochem Biophys Res Commun.** v.277, n.1, p.62-65, 2000.

VAQUÉ, J.P.; NAVASCUES, J.; SHIIO, Y.; LAIHO, M.; AJENJO, N.; MAULEON, I.; MATAILLANAS, D.; CRESPO, P.; LEÓN, J. Myc antagonizes Ras-mediated growth arrest in leukemia cells through the inhibition of the Ras-ERK-p21Cip1 pathway. **J Biol Chem.** v.280, n.2, p.1112-1122, 2005.

VASSILEV, L.T.; VU, B.T.; GRAVES, B.; CARVAJAL, D.; PODLASKI, F.; FILIPOVIC, Z.; KONG, N.; KAMMLOTT, U.; LUKACS, C.; KLEIN, C.; FOTOUHI, N.; LIU, E.A. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. **Science** v.303, n.5659, p.844-848, 2004.

VASSILEV, L.T. MDM2 inhibitors for cancer therapy. **Trends Mol Med.** 2007 v.13, n.1, p.23-31, 2007.

VOGEL, C.; MARCOTTE, E.M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nat Rev Genet.** v.13, n.4, p.227-232, 2012.

WADE, M.; YAO-CHENG LI, Y.C.; WAHL, G.M. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. **Nature Reviews Cancer.** v.13, n.2, p.83-96, 2013.

WANG, Z.; LI, B. Mdm2 links genotoxic stress and metabolism to p53. **Protein Cell.** v.1, n.12, p.1063-1072, 2010.

YASUHARA, S.; ZHU, Y.; MATSUI, T.; TIPIRNENI, N.; YASUHARA, Y.; KANEKI, M.; ROSENZWEIG, A.; MARTYN, J. A.. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. **J. Histochem. Cytochem.** v. 51, n.7, p.873-885, 2003.

ZDZALIK, M.; PUSTELNY, K.; KEDRACKA-KROK, S.; HUBEN, K.; PECAK, A.; WLADYKA, B.; JANKOWSKI, S.; DUBIN, A.; POTEMPA, J.; DUBIN, G. Interaction of regulators Mdm2 and Mdmx with transcription factors p53, p63 and p73. **Cell Cycle.** v.9, n.22, p.4584-4591, 2010.

ZHANG, Q.; ZENG, S.X.; LU, H. Targeting p53-MDM2-MDMX Loop for Cancer Therapy. **Subcell Biochem.** v.85, p.281–319, 2014.