



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARIANA FLAVIA DA MOTA

Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* e antitumoral *in vivo* do composto LQFM030 no tumor ascítico de Ehrlich

Goiânia
2013

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS 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: Mariana Flavia da Mota

Título do trabalho: Avaliação da atividade antiproliferativa in vitro e antitumoral in vivo do composto LQM030 no tumor ascítico de Ehrlich

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

Data: 17 / 07 / 2019

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.

²A assinatura deve ser escaneada.

MARIANA FLAVIA DA MOTA

**Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* e antitumoral
in vivo do composto LQFM030 no tumor ascítico de Ehrlich**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Goiás para obtenção do
Título Doutor em Ciências da
Saúde.

Orientadora: Marize Campos
Valadares

Co-orientadora: Alane Pereira Cortez

**Goiânia
2013**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno(a): Mariana Flavia da Mota

Orientador(a): Marize Campos Valadares

Co-Orientador(a): Alane Pereira Cortez

Membros:

1. Marize Campos Valadares

2. Ricardo Meneghati

3. Carlos Henrique Castro

4. Rejane da Silva Sena Barcelos

5. Simone Gonçalves da Fonseca

Data: 06/12/13

“Não sou forte! Forte é o Deus que habita em mim. Ele me faz forte para vencer os obstáculos que encontro pelo caminho, Ele me faz forte para saber esperar o momento certo para cada coisa, Ele me faz forte para ir além do que eu possa imaginar...” (Pe. Marcelo Rossi).

Dedico este trabalho...

A Deus, meu pai, meu tudo,
minha força, sem a qual eu não
teria chegado até aqui.

À minha mãe Rosa Amelia da
Mota, meu alicerce, mulher
guerreira que deu o sangue para
que eu trilhasse pelos caminhos
do estudo, meu apoio e minha
amiga.

Ao meu filho Erick Machado
Mota, razão do meu viver e
minha grande motivação para
galgar mais esta conquista.

Ao meu esposo Eder Rodrigues
Machado, meu grande
incentivador, companheiro de
todas as horas, que tanto
contribuiu com esta vitória.

Este título também é de vocês!
Amo vocês!!!!!!!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, meu pai, pela força, pela saúde e por ter mais uma vez me ajudado e me iluminado todo o tempo. Com Deus, tudo é possível!!!

À minha orientadora Marize, pelo voto de confiança e por me ajudar a crescer e a ser independente.

Ao Prof. Dr. Ricardo Menegatti, pela produção do composto e pela disponibilidade em ajudar sempre, pela grande gentileza, solicitude, rapidez em responder e interesse nos resultados.

À Profa. Dra. Eliana Martins Lima, pela ajuda com a formulação da emulsão que deu tão certo.

À Profa. Dra. Aline Carvalho Batista, por mais uma vez disponibilizar seu Laboratório e seu microscópio e ser sempre tão gentil.

À Profa. Dra. Vera Saddi, por disponibilizar seu Laboratório e seu fotodocumentador e ao seu aluno Caio Bruno, pelo auxílio com a fotodocumentação dos géis de RNA. A ambos agradeço também pela gentileza e pela troca de experiências.

À Dra. Alane Pereira Cortez, por todo o auxílio com os experimentos de Biologia Molecular, companheirismo e compreensão.

À Dra. Elisandra Gava de Castro, por toda a troca de experiências e pela indicação do Prof. Carlos.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Castro, por disponibilizar seu Laboratório e todos os reagentes e materiais necessários para a realização dos testes de Western Blotting. Obrigada pela atenção e ensinamentos!

À mestranda Larissa Matuda Macedo dos Laboratórios de Fisiologia de órgãos isolados e de Fisiologia autonômica e cardíaca do ICB/UFG pelo imenso auxílio com os testes de western blotting, mesmo estando também na correria de terminar seu mestrado. Muito obrigada!!!

Ao Laboratório Rômulo Rocha/FF/UFG nas pessoas da Profa. Joana D'arc e Thalyta Renata Araújo Santos, pelo auxílio com a análise dos parâmetros bioquímicos dos camundongos.

À minha estagiária Thalyta, por ter sido meu braço direito, pelo grande auxílio com os experimentos in vivo e por ter sido tão disposta a ajudar. Agradeço também pelo carinho e amizade que são tão importantes em momentos difíceis como este. Você foi muito importante em todos os momentos, inclusive por me ouvir, aconselhar e oferecer seu ombro amigo!

Aos meus colaboradores Bruna, Paulo Henrique e Renato, pessoas eficientes, prontas a ajudar sempre, que contribuíram muito com a realização deste trabalho. Agradeço o empenho, a dedicação, as dicas, as discussões sobre metodologias e resultados e o imenso auxílio com os experimentos, inclusive aos fins de semana.

À amiga Polyana, por toda a troca de experiências desde o mestrado, muito importante para a minha formação como pesquisadora e doutoranda. Agradeço ainda por todas as dicas e discussões a respeito de metodologias e resultados e o fundamental auxílio com a citometria de fluxo.

À IQUEGO, na pessoa do Osmar, pelo fornecimento dos animais e a solicitude e boa vontade com que sempre me atendeu.

Aos colegas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho: Linauri, Larissa, Soraia, Rosineide, Marcelo, Alexandre, Thaís, Flávio e Gabriel.

Ao ex-Secretário de Segurança Pública e Justiça do Estado de Goiás, João Furtado de Mendonça Neto, pela concessão de adequação de carga horária, imprescindível para a realização deste trabalho.

À Superintendente da Polícia Técnico-Científica de Goiás, Dra. Rejane da Silva Sena Barcelos, pelo apoio e empenho para a concessão da adequação da carga horária e pela recomendação à Profa. Vera Saddi.

Ao ex-Gerente do Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues, Alexandre Pascoal Vêncio, pelo incentivo para que fosse feita a adequação da carga horária.

Às colegas Neide e Laryssa, pelo apoio e compreensão a mim concedidos durante a realização deste trabalho.

Ao colega Ian, pela ajuda com o documento de solicitação da adequação da carga horária.

À Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fernanda Bellato, por continuar sempre solícita e ajudar tanto, cuidar de mim com tanto carinho, mesmo eu não sendo mais aluna do Programa.

À minha querida mãe, por sempre me apoiar, por cuidar do meu filho, por ter me ajudado a ser quem sou hoje, por ouvir meus cada vez mais constantes desabafos e me ajudar com suas palavras, seu colo e suas orações.

Ao meu esposo Eder, por me apoiar, me aguentar (não deve ter sido fácil!), me ajudar a gerenciar tudo na vida pessoal e me incentivar.

Ao meu filho Erick, por me dar forças para continuar e por me fazer esquecer toda a dificuldade ao estar ao seu lado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS, FIGURAS E ANEXOS	
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 CÂNCER.....	01
1.2 TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH (TAE)	03
1.3 ANGIOGÊNESE.....	04
1.4 O CICLO CELULAR E AS PROTEÍNAS P53 E MDM2	06
1.5 APOPTOSE.....	11
1.6 TRATAMENTO DO CÂNCER	15
1.7 DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS ANTITUMORAIS.....	16
1.8 LQFM030	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 COMPOSTO LQFM030	25
3.1.1 Obtenção do composto	25
3.1.2 Preparo da emulsão.....	25
3.2 ANIMAIS	25
3.2.1 Descrição dos animais	25
3.2.2 Alojamento e manejo dos animais	26
3.3 TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH (TAE)	26
3.4 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	27
3.4.1 Avaliação da inibição tumoral e determinação da DE ₅₀	27
3.4.1.1 Volume tumoral	29
3.4.1.1.1 Peso corporal	29
3.4.1.1.2 Volume do líquido ascítico	30
3.4.1.2 Angiogênese peritoneal	30
3.4.1.3 Contagem de células viáveis pelo método da exclusão do azul de tripano.....	30
3.4.2 Avaliação dos parâmetros sanguíneos.....	31
3.4.2.1 Avaliação hematológica	31
3.4.2.2 Avaliação bioquímica do soro	31
3.4.3 Dosagem do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) ...	32
3.4.4 Avaliação da atividade antitumoral	34
3.4.4.1 Externalização da fosfatidilserina	36
3.4.4.2 Ciclo celular	37
3.4.4.3 Expressão das proteínas Bax, Bcl2, p53 e p21	37

3.4.4.4	Expressão das caspases 3, 8 e 9	38
3.5	EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	38
3.5.1	Avaliação da atividade antiproliferativa	38
3.5.1.1	Avaliação da citotoxicidade pelo método da exclusão do azul de tripano	39
3.5.1.2	Análise da morfologia celular	40
3.5.1.2.1	Morfologia celular por microscopia óptica	40
3.5.1.2.2	Morfologia celular por microscopia de fluorescência	41
3.5.1.2	Avaliação dos mecanismos de morte celular	41
3.5.1.2.1	Avaliação dos mecanismos de morte celular por citometria de fluxo	41
3.5.1.2.1.	Determinação da integridade da membrana celular	41
1		
3.5.1.2.1.	Determinação da fragmentação de DNA	42
2		
3.5.1.2.1.	Externalização da fosfatidilserina, ciclo celular, expressão das	
3	proteínas p53, p21, p27, e das caspases 3, 8 e 9	42
3.5.1.2.2	Avaliação dos mecanismos de morte celular por PCR em tempo real ..	42
3.5.1.2.2.	Expressão do gene p53	42
1		
3.5.1.2.3	Avaliação dos mecanismos de morte celular por <i>Western blotting</i>	44
3.5.1.2.3.	Expressão da proteína MDM2	44
1		
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
4	PUBLICAÇÕES	47
4.1	ARTIGO 1 – LQFM030 a small compound with a Nutlin-Like profile.....	47
4.2	ARTIGO 2 – Induction of apoptosis in Ehrlich ascites tumor cells via	
	p53 activation by a novel small compound MDM2 inhibitor –LQFM030	81
		
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
	REFERÊNCIAS	115

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Tabela 1	Parâmetros bioquímicos do soro dos camundongos analisados e respectivas metodologias de análise	32
Figura 1	Transformação de um tecido normal em um câncer invasivo	01
Figura 2	Vias extrínseca e intrínseca da apoptose de forma resumida	14
Figura 3	p53 ligada à MDM2 e Nutlin-2 ligado à MDM2	19
Figura 4	Simplificação molecular a partir do composto Nutlin-1 dando origem ao composto LQFM030	22
Figura 5	Fluxograma representando o tratamento e os experimentos realizados para avaliação da inibição tumoral e determinação da DE ₅₀ do composto LQFM030 <i>in vivo</i>	29
Figura 6	Fluxograma representando o tratamento e os experimentos realizados para avaliação da atividade antitumoral do composto LQFM030 <i>in vivo</i>	35
Anexo 1	Tampão de lise celular.....	123

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

$\Delta\Delta CT$	Delta-delta CT (Método de análise pela diferença de Ct)
ALT	Alanina aminotransferase
Apaf-1	Fator 1 de ativação de proteases de apoptose (<i>apoptotic protease-activating factor-1</i>)
Apo-1	Receptor membro da família de fator de necrose tumoral, também chamado de Fas ou CD95
APS	Persulfato de amônio (<i>ammonium persulfate</i>)
AST	Aspartato aminotransferase
Bad	Promotor de morte associado a Bcl-X _L /Bcl-2 (<i>Bcl-X_L/Bcl-2-associated death promoter</i>)
Bak	Membro pró-apoptótico da família Bcl-2
Bax	Proteína X associada a Bcl-2
Bcl-2	Linfoma 2 de célula B (<i>B-cell lymphoma 2</i>)
Bcl-w	Membro anti-apoptótico da família Bcl-2
Bcl-X _L	Variante longa de Bcl-X
Bcr/abl	Cromossomo Filadélfia (formado pela fusão dos cromossomos 9 e 22)
BH3	Domínio 3 homólogo a Bcl-2
Bid	Agonista de BH3 que interage com o domínio de morte
Bik	Membro pró-apoptótico da família Bcl-2
Bim	Mediador celular que interage com Bcl-2
Bok	Membro pró-apoptótico da família Bcl-2
BSA	Albumina sérica bovina
Caspases	Proteases baseadas em cisteína (<u>Cysteine-<u>aspartic-acid-proteases</u></u>)
cDNA	DNA complementar
CD 95	Receptor de morte celular (<i>cell death</i>) também chamado de Fas ou Apo-1
CDK	Quinases dependentes de ciclina (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CN	Controle negativo
CO ₂	Dióxido de carbono
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CPK	Creatinofosfoquinase
Ct	Limiar de ciclo (<i>threshold cycle</i>)
DE ₅₀	Dose efetiva para 50% dos animais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DR4	Receptor de morte celular, também chamado de TRAIL-R1
DR5	Receptor de morte celular, também chamado de TRAIL-R2
EDTA	Ácido tetracético etilenodiamina dissódico (<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
FADD	Domínio de morte associado a FAS (<i>FAS-associated death domain containing protein</i>)
Fas	Receptor de superfície envolvido na ativação da apoptose
Fase G ₀	Fase de lacuna (<i>gap</i>) 0 do ciclo celular
Fase G ₁	Fase lacuna (<i>gap</i>) 1 do ciclo celular
Fase G ₂	Fase lacuna (<i>gap</i>) 2 do ciclo celular
Fase M	Fase de mitose do ciclo celular
Fase S	Fase de síntese de DNA do ciclo celular
FasL	Ligante de Faz
FDA	Órgão norte-americano responsável pelo controle de medicamentos, alimentos e outros produtos (<i>Food and drug administration</i>)
FF	Faculdade de Farmácia
FITC	Isotiocinato de fluoresceína (<i>fluorescein isothiocyanate</i>)
FL-1	Filtro detector de fluorescência verde
FL-2	Filtro detector de fluorescência amarela
Flk-1	Receptor de VEGF tipo 2
FSC	Detector de fluorescência na linha do feixe de luz (<i>Foward scatter</i>)
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GSH	Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (<i>Global System Harmonized</i>)
HE	Hematoxilina-eosina
HER-2	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (<i>Human Epidermal</i>)

	<i>growth factor Receptor 2)</i>
IFCC	Federação Internacional de Química Clínica e Medicina Laboratorial (<i>International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i>)
IGF-BP3	Fator de crescimento tipo insulina ligado à proteína 3 (<i>insulin-like growth factor binding protein-3</i>)
IP	Intraperitoneal
IQUEGO	Indústria Química do Estado de Goiás
LDH	Lactato desidrogenase
LFTC	Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular
LQFM	Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal
Map4	Proteína 4 associada a microtubos (<i>microtubule-associated protein 4</i>)
Mcl-1	Proteína anti-apoptótica relacionada a Bcl-2 (<i>myeloid cell leukemia sequence 1-Bcl-2-related</i>)
MDM2	Antagonista de p53 (<i>murine double minute 2</i>)
MMR	Reparação de mal pareamento (<i>mismatch repair</i>)
NFκB	Fator nuclear do locus κ de imunoglobulina em células B (<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
Noxa	Membro pró-apoptótico da família Bcl-2
NP-40	Solução detergente de lise celular (<i>nonylphenoxypolyethoxylethanol</i>)
p21	Proteína reguladora da transição da fase G1 para S no ciclo celular ou inibidor 1 de CDK
p53	Proteína supressora tumoral envolvida em diversos fenômenos associados à apoptose e ao ciclo celular
PA	Padrão analítico
PBS	Tampão fosfato salina (<i>phosphate buffer saline</i>)
PBS-T20	PBS com 0,05% de Tween 20
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pgk1	Fosfoglicerato quinase
PRPPG	Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Puma	Modulador de apoptose regulado pela proteína p53
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
Rpm	Rotações por minuto

RPMI	Meio de cultura (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SSC	Detecores de fluorescência perpendiculares ao feixe de luz (<i>Side scatter</i>)
TAE	Tumor ascítico de Ehrlich
TBS	Tampão Tris salino
TBS-T	TBS com Tween 20
TEMED	Tetrametil-etilenediamina (<i>tetramethylethylenediamine</i>)
TGO	Transaminase glutâmica oxalacética
TGP	Transaminase glutâmica pirúvica
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>tumor necrosis factor</i>)
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>)
TRAIL-R1	Receptor 1 indutor de apoptose, membro da família TNF
TRAIL-R2	Receptor 2 indutor de apoptose, membro da família TNF
Tris	[2-amino - 2(hidroximetil)-1,3 propondiol]
Tris-HCl	Tris hidrocloreto
TRIZOL	Tiocianato de guanidina fenol-clorofórmio (<i>guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction</i>)
UFG	Universidade Federal de Goiás
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
XIAP	Inibidor de apoptose ligado ao cromossomo x
Waf-1	O mesmo que p21 ou inibidor 1 de CDK

RESUMO

A ativação da via p53 por inibição de MDM2 tem sido proposta como uma nova estratégia para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais. Análogos da cis-imidazolina chamados nutlins apresentaram habilidade em bloquear a ligação da proteína p53 à MDM2, de forma a prevenir a degradação da p53 e exibir atividade antitumoral *in vivo* e antiproliferativa *in vitro*. Tendo em vista o potencial antitumoral dos nutlins e sua complexa produção, foram planejados e sintetizados análogos como o LQFM030, empregando a estratégia da simplificação molecular. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antitumoral *in vivo* e antiproliferativa *in vitro* do composto LQFM030 utilizando o modelo experimental do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Para a avaliação da atividade antitumoral *in vivo* foram utilizados camundongos swiss albinos machos tratados por 10 dias com 50, 75 ou 150 mg/Kg do composto LQFM030. Após o tratamento, a atividade antitumoral do composto foi avaliada pela diferença de peso e do volume de líquido ascítico, pelo número de células tumorais utilizando o teste de exclusão do azul de tripano, pela angiogênese peritoneal e pela produção de VEGF. Os mecanismos antitumorais foram avaliados por citometria de fluxo e avaliou-se ainda os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais. A atividade antiproliferativa *in vitro* foi avaliada em células do TAE pelo método da exclusão do azul de tripano e os mecanismos envolvidos na morte das células do TAE foram investigados por microscopia óptica e de fluorescência, citometria de fluxo, PCR em tempo real e western blot. Os dados foram analisados por análise de variância (*one-way ANOVA*) e teste *a posteriori* de *Newman-Keuls* para comparação de médias ou por teste de *t* com o auxílio do programa Graph pad prism. As médias foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. O composto LQFM030 foi capaz de inibir o tumor dos animais portadores do TAE de maneira dose-dependente, com uma DE_{50} de 150 mg/kg. Houve redução ainda na angiogênese peritoneal, na produção de VEGF e o tratamento não alterou significativamente os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais. O tratamento *in vitro* 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 ainda foi observada pela morfologia das células, pela fragmentação de DNA, pela externalização da fosfatidilserina e pela ativação de caspases iniciadoras e efetoras. 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*, provavelmente por inibir a interação p53-MDM2 e reativar p53 com suas principais funções, a retenção no ciclo celular e a apoptose. Esses resultados sugerem que LQFM030 é um interessante candidato no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos antitumorais.

Palavras-chave: LQFM030; nutlin; apoptose; p53; MDM2; tumor ascítico de Ehrlich.

ABSTRACT

Activation of the p53 pathway by inhibition of MDM2 has been proposed as a new strategy for developing new anti-tumor agents. Analogs of cis-imidazoline called nutlins showed ability to block the binding of p53 to MDM2, preventing p53 degradation and thus exhibiting *in vivo* anti-tumor and *in vitro* antiproliferative activities. In view of the anti-tumor potential of the nutlins and their complex production, we designed and synthesized analogues as LQFM030 by employing the strategy of molecular simplification. The aim of this study was to evaluate the anti-tumor activity *in vivo* and the antiproliferative activity *in vitro* of the LQFM030 compound in the experimental model Ehrlich ascites tumor (EAT). For evaluation of anti-tumor activity *in vivo* we used male Swiss albino mice that were treated for 10 days with 50, 75 or 150 mg / kg of the compound LQFM030. After treatment, the anti-tumor activity of the compound was assessed by the difference of the weight and ascitic fluid volume, number of tumor cells by trypan blue exclusion test, peritoneal angiogenesis and the VEGF production. The anti-tumor mechanisms were assessed by flow cytometry and we also assessed hematological and biochemical parameters of the animals. The *in vitro* antiproliferative activity was evaluated in EAT cells by using the trypan blue exclusion method, and the mechanisms involved in the death of EAT cells were investigated by optical and fluorescence microscopy, flow cytometry, real-time PCR and western blot. Data were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) and subsequent Newman-Keuls test to compare means or by *t* test using the Graph pad prism program. Means were considered statistically significant when $p < 0.05$. The LQFM030 compound was able to inhibit the tumor of EAT bearing animals in a dose-dependent manner with an ED_{50} of 150 mg/kg. We also observed reduction in peritoneal angiogenesis and in VEGF production, and the treatment did not significantly change the hematological and biochemical parameters of the animals. The *in vitro* treatment also showed antiproliferative and cytotoxic concentration-dependent activities, increased the expression of p53 protein and activated the p53 pathway (through activation of proteins p21 and p27 and MDM2 reduction). Furthermore, the compound caused a retention of EAT cells in the G1 phase of the cell cycle and led the cells to apoptosis. We observed apoptosis by the morphology of the cells, DNA fragmentation, externalization of phosphatidylserine and by activation of initiator and effector caspases. The transcription of p53 was not affected by LQFM030, indicating that the regulation of p53 was post-transcriptional. Just as nutlins, LQFM030 showed antitumor activity *in vivo* and antiproliferative activity *in vitro*, probably by inhibiting the p53-MDM2 interaction and reactivating p53 and its main functions, the retention in the cell cycle and apoptosis. These results suggest that LQFM030 is an interesting candidate in the development of new anti-tumor therapeutic agents.

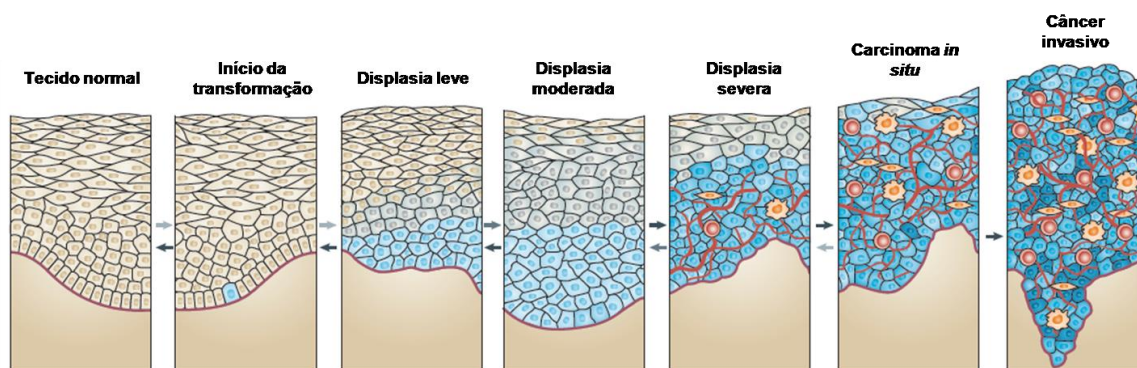
Keywords: LQFM030; nutlin; apoptosis; p53; MDM2; Ehrlich ascites tumor

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer (ou neoplasia maligna) é a desregulação da homeostase e dos mecanismos que regem o controle do crescimento e da replicação celular. Dentre os mecanismos que contribuem para o desenvolvimento do câncer estão a auto-suficiência em relação aos sinais de crescimento, a angiogênese, o potencial replicativo ilimitado, a invasão dos tecidos e metástase e a evasão da apoptose e insensibilidade aos sinais anti-crescimento (COSTA, 2005). A progressão de um tecido normal para um câncer invasivo é caracterizada por mudanças genéticas e epigenéticas (UMAR; DUNN; GREENWALD, 2012) (Figura 1).

Figura 1: Transformação de um tecido normal em um câncer invasivo. Uma célula é transformada por mudanças genéticas e/ou epigenéticas, passa a ter potencial replicativo ilimitado e insensibilidade aos sinais anti-crescimento, levando à displasia. Na fase severa da displasia, o tecido passa a ter células atípicas e angiogênese, culminando com a metástase.



Adaptado de: UMAR; DUNN; GREENWALD, 2012.

O câncer tem sido uma das doenças mais temidas desde o século 20. A incidência tem aumentado continuamente no mundo com o aumento da expectativa de vida da população, fazendo com que esta doença seja a causa mais comum de morte nos países desenvolvidos e a segunda nos países em desenvolvimento, onde esta doença está em ascensão (AGRAWAL *et al.*, 2011; CHOUDHURY; GUPTA; MAJUMDER, 2010; UMAR; DUNN; GREENWALD, 2012).

Em 2007, o câncer foi responsável por 7,9 milhões de mortes (cerca de 13% das mortes do mundo), sendo 38% nos países desenvolvidos e 62% nos países em desenvolvimento. Estima-se que em 2030, surjam 27 milhões de novos casos de câncer, com 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas com câncer, anualmente, no mundo (AGRAWAL *et al.*, 2011; BRASIL, 2011).

Atualmente, o câncer tem atingido principalmente os países em desenvolvimento, entre eles o Brasil. A estimativa de incidência de câncer para 2012 e 2013 no Brasil é de mais de 518 mil casos novos, sendo 18.400 novos casos para o Estado de Goiás e 4.980 para Goiânia (BRASIL, 2011).

Assim, o câncer é um sério problema de saúde pública mundial e, no Brasil, esse problema tem ganhado relevância e o tema tem conquistado espaço nas agendas políticas e técnicas de todas as esferas do governo, visando estabelecer prioridades e alocar recursos de forma direcionada para a modificação do atual cenário (BRASIL, 2011).

Outro problema relacionado ao câncer é que em pacientes com esta doença em estágio avançado, a formação de ascite é frequentemente observada. E uma vez que ocorra a acumulação ascítica, envolvendo

disseminação intraperitoneal, o prognóstico é ruim (BROMBERG *et al.*, 2010).

1.2 Tumor ascítico de Ehrlich

O tumor ascítico de Ehrlich (TAE), originalmente descrito por Ehrlich e Apollant em 1905 como um adenocarcinoma de mama, teve origem espontânea em camundongos. Este modelo experimental oferece oportunidades de estudos que auxiliam na compreensão da resposta imune do hospedeiro, bem como na avaliação da atividade e mecanismo de ação dos compostos, com perspectivas de desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos (MOTA, 2010).

A maior parte dos fármacos citotóxicos atualmente disponíveis foi descoberta utilizando-se tumores transplantáveis em camundongos (BROMBERG *et al.*, 2010). Esta é uma estratégia interessante visto que alguns carcinomas de camundongos possuem perfis citogenéticos típicos de carcinomas humanos e existem muitas semelhanças entre as características do câncer em humanos e em roedores (ANISIMOV; UKRAINTSEVA; YASHIN, 2005).

O uso de modelos animais é importante para obter uma visão dinâmica de um câncer desde sua origem até estágios mais tardios observados em pacientes e para testar compostos químicos como potenciais fármacos. Além disso, a expressão de genes em culturas primárias de células tumorais representa muito mais as características do tumor *in vivo* que linhagens de células tumorais (VAN STAVEREN *et al.*, 2009).

O TAE é amplamente utilizado porque se mostra bastante vantajoso frente a outros tumores; por apresentar inespecificidade; por não regredir de forma espontânea; por ser facilmente transplantável no tecido cutâneo ou no peritônio, desenvolvendo-se em tumor sólido ou ascítico, respectivamente, e por apresentar um comportamento agressivo, pois cresce rapidamente. Mesmo quando implantado com um número reduzido de células é capaz de crescer em todos os animais que são transplantados (BROMBERG *et al.*, 2010; MOTA, 2010).

Após aproximadamente 7 dias de inoculação das células tumorais na cavidade abdominal, nota-se a presença de grande quantidade de fluido viscoso e de aspecto leitoso, contendo células tumorais em sua grande maioria, além de macrófagos e algumas hemáceas e leucócitos. Estas células apresentam-se pleomórficas, com diâmetro de 3 a 4 vezes superior ao das hemáceas, além de núcleos de formas variáveis, com nucléolos únicos ou múltiplos, de diferentes tamanhos (MOTA, 2010).

1.3 Angiogênese

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir do endotélio preexistente. Este processo é complexo e depende da degradação da matriz extracelular e da proliferação, migração e diferenciação morfológica (para formar tubos) das células endoteliais (KUMAR *et al.*, 2009).

A angiogênese é fundamental para condições fisiológicas e patológicas como na cicatrização de lesões, no desenvolvimento

embrionário, na inflamação crônica, na progressão tumoral e na metástase (KUMAR *et al.*, 2009).

Um tumor requer suprimento adequado de sangue para crescimento, desenvolvimento e metástase (D'SOUZA *et al.*, 2010). Estudos experimentais *in vivo* têm demonstrado que o crescimento tumoral e a metástase são dependentes da angiogênese (KUMAR *et al.*, 2009).

A angiogênese tumoral envolve a interação entre as células tumorais, as células endoteliais, os fagócitos e os fatores secretados por eles, que podem atuar como promotores ou inibidores da angiogênese (EL-AZAB *et al.*, 2011). O processo angiogênico é controlado por uma variedade de reguladores, positivos e negativos, como fatores de crescimento, citocinas, metabólitos lipídicos e fragmentos crípticos de proteínas hemostáticas. Entre estas moléculas, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um fator angiogênico solúvel produzido tanto por células normais quanto por células tumorais, desempenha um papel fundamental na regulação da angiogênese normal e patogênica (KUMAR *et al.*, 2009).

Tanto a angiogênese normal quanto a tumoral dependem fortemente do VEGF, a citocina angiogênica mais importante no câncer, cujo efeito angiogênico é mediado pela ligação com seus receptores (tipo-1, tipo-2 ou Flk-1 e tipo-3), tirosina-quinases transmembrânicas encontradas predominantemente em células endoteliais, que, após a ligação com o VEGF, estimulam a cascata de transdução de sinal (SUDDEK, 2011).

O VEGF estimula as células endoteliais a secretar proteases e ativadores de plasminogênio, resultando na degradação da membrana basal dos vasos sanguíneos, o que permite que as células invadam a matriz

adjacente. Após a migração, as células proliferam e se diferenciam em novos vasos (KUMAR *et al.*, 2009; EL-AZAB *et al.*, 2011).

O TAE é um exemplo de tumor angiogênese-dependente, que cresce induzindo a angiogênese na parede peritonial. A grande maioria dos tumores humanos e animais possui superexpressão de VEGF (EL-AZAB *et al.*, 2011; SUDDEK, 2011), incluindo a ascite maligna (KUMAR *et al.*, 2009). No TAE, o VEGF desempenha um papel fundamental no aumento do líquido ascítico e das células tumorais (KUMAR *et al.*, 2009).

Assim, outra estratégia antitumoral interessante é o desenvolvimento de agentes que inibam a angiogênese e o crescimento tumoral. Estudos têm demonstrado que uma interferência no mecanismo do receptor VEGF leva à inibição do crescimento tumoral (D'SOUZA *et al.*, 2010).

1.4 O ciclo celular e as proteínas p53 e MDM2

A divisão celular consiste de dois estágios, a mitose, isto é, o processo de divisão nuclear, e a interfase, o intervalo entre duas mitoses. A interfase divide-se nas fases G1, S e G2. Na fase G1 (*gap 1* ou primeiro intervalo) a célula se prepara para a síntese de DNA. Na fase S ocorre a replicação do DNA e na fase G2 (*gap 2* ou segundo intervalo) a célula se prepara para a mitose. As células em G1 podem antes entrar em um estágio de repouso chamado G0 (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003; SINGHAL *et al.*, 2005).

A transição de uma fase para outra do ciclo celular é regulada por diferentes proteínas celulares. As proteínas reguladoras-chave são as quinases dependentes de ciclina (CDKs), uma família de proteínas quinases

que são ativadas em pontos específicos do ciclo celular. Quando ativadas, as CDKs fosforilam proteínas específicas. Os níveis de CDKs permanecem estáveis durante o ciclo celular, em contraste com suas proteínas de ativação, as ciclinas. Os níveis de ciclinas sobem e descem durante o ciclo celular e, desta forma, ativam periodicamente as CDKs (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Para garantir uma sequência ordenada de eventos no ciclo celular, existe o ponto de restrição (R) e os pontos de checagem (*checkpoints*). Em resposta a danos ao DNA, estes pontos de checagem retêm as células no ciclo celular para promover o reparo ao DNA (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

O principal ponto de checagem de resposta a danos ao DNA na fase G1 é o relacionado à proteína p53, que é capaz de induzir à retenção inclusive permanente das células em G1 (KASTAN; BARTEK, 2004). Geralmente o nível celular de p53 é baixo, porém danos ao DNA podem levar à rápida indução da atividade desta proteína. p53 estimula a transcrição de diferentes genes, entre eles p21, mdm2 e bax. A indução de p21 resulta na inibição de CDK e retenção do ciclo celular. No caso de células muito danificadas, p53 ativa genes que levam à morte celular, como Bax e Fas (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003). Porém, este mecanismo está geralmente desregulado no câncer (KASTAN; BARTEK, 2004).

No câncer ocorrem alterações fundamentais no controle genético da divisão celular, resultando em proliferação celular indiscriminada. O crescimento tumoral ocorre por mutação e/ou inativação em genes

supressores de tumor, como p53. O gene p53 é o mais comumente mutado no câncer e a regulação de p21 em resposta a danos ao DNA é perdida quando p53 é inativado (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

O gene supressor de tumor p53 é uma defesa importante contra o câncer por codificar uma proteína que suprime o crescimento do tumor através de dois mecanismos, retenção do ciclo celular (controlando a passagem das células da fase G₁ para a fase S, no ponto R) e indução de apoptose (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2002; DAS *et al.*, 2002; BHATTACHARYYA *et al.*, 2003).

O produto do p53 medeia a morte celular através de vários mecanismos, como regulação negativa dos genes anti-apoptóticos Bcl-2, Map4 e survivina e regulação positiva dos genes pró-apoptóticos Bax, IGF-BP3, DR5, Fas, Apaf1. Existe também evidência da translocação induzida por estresse de p53 para a mitocôndria para levar à apoptose via liberação de citocromo c (ZABKIEWICZ; CLARKE, 2004).

Uma função importante do p53 do tipo selvagem é atuar como um fator de transcrição, ligando-se a uma sequência consenso de DNA p53-específica em genes responsivos, para aumentar a síntese de p21/Waf-1. As alterações mais frequentes no gene p53 são as mutações por alteração na sequência das bases, resultando numa proteína defeituosa (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2002; DAS *et al.*, 2002; BHATTACHARYYA *et al.*, 2003). O gene p53 de camundongos é homólogo ao de humanos (ANISIMOV; UKRAINTSEVA; YASHIN, 2005).

A proteína supressora de tumor p53 é uma proteína de ligação a uma sequência específica de DNA que é capaz de induzir a retenção de células no ciclo celular ou apoptose nos pontos de checagem do ciclo celular (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003) e é a proteína mais frequentemente inativada no câncer (VASSILEV *et al.*, 2004).

Quando ativada, a proteína p53 regula a expressão de muitas classes de genes, através de sequências específicas de ligação com DNA ou através de interações proteína-proteína. Sua regulação resulta em efeitos antiproliferativos permitindo a preservação da integridade genômica (BAI; ZHU, 2006).

A proteína p53 normal necessita de mecanismos para sua ativação, como hipóxia e danos ao DNA (BAI; ZHU, 2006). Existem evidências de que quando ocorrem danos ao DNA, os produtos dos genes que compõem a maquinaria MMR (*mismatch repair*) ativam p53 (ZABKIEWICZ; CLARKE, 2004), levando à retenção do ciclo celular ou à apoptose (VASSILEV *et al.*, 2004).

Na ausência de condições de estresse, p53 é controlada pela proteína MDM2 (*murine double minute 2*) através de um ciclo de retroalimentação autorregulatória. p53 pode ativar a expressão de MDM2, que, por sua vez, leva à repressão de p53 por três mecanismos. No primeiro, MDM2 se liga à p53 no seu domínio de transativação e bloqueia sua capacidade de ativar a transcrição. O segundo está envolvido na exportação nuclear de p53 e no terceiro, MDM2 serve como uma ubiquitina ligase que promove a degradação de p53 (VASSILEV *et al.*, 2004; MIR *et al.*, 2013).

Assim, MDM2 é um regulador negativo de p53, que interage com esta proteína inibindo sua atividade e esta interação leva à proliferação celular do tumor, pois priva p53 de sua ação antineoplásica e elimina os pontos de checagem do ciclo celular dependentes de p53 (WANG *et al.*, 2011).

O gene *mdm2* tem sido encontrado amplificado ou superexpressado em tumores. Assim, a liberação da p53 através da inibição de MDM2 tem sido proposta como uma nova estratégia terapêutica (VASSILEV *et al.*, 2004).

Muitos estudos têm mostrado que o rompimento da interação p53-MDM2 por diferentes abordagens macromoleculares, pela supressão da expressão de MDM2, pode levar à ativação de p53 e assim, à inibição do crescimento tumoral (VASSILEV *et al.*, 2004).

A ativação farmacológica da p53 tem sido uma estratégia efetiva para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos direcionados aos diversos tipos de tumor. A modulação da atividade de p53 por inibidores de MDM2, como os nutlins, tem sido uma grande esperança para a inibição de tumores humanos e de camundongos (JANOUSKOVA *et al.*, 2013).

Estudos feitos com camundongos deficientes de p53 (*p53 null*) revelaram predisposição para o desenvolvimento de tumores espontâneos, já que as células com danos no DNA não sofrem apoptose e têm a taxa de mutação aumentada, aumentando também a predisposição tumoral (ZABKIEWICZ; CLARKE, 2004).

Além disso, células tumorais deficientes em p53 tendem a ser quimioresistentes. Isso demonstra a importância da p53 para mediar a apoptose após danos ao DNA. Assim, o aumento da atividade da p53 é

relevante para a eficácia da terapia anticâncer *in vivo* (ZABKIEWICZ; CLARKE, 2004).

O maior alvo de transcrição da p53 ativada é o p21 (VASSILEV *et al.*, 2004), um potente inibidor do ciclo celular regulado pelas quinases dependentes de ciclina. Seu aumento (regulação positiva) resulta em inibição celular pelo bloqueio da progressão do ciclo celular, permitindo assim a ocorrência do reparo do DNA. Caso o reparo não seja bem-sucedido, o gene p53 sinaliza para outros genes reguladores, desencadeando a apoptose (BHATTACHARYYA *et al.*, 2003).

1.5 Apoptose

A apoptose é um processo de morte celular programada conservado evolutivamente, caracterizada por uma série de alterações morfológicas, em um processo de autodestruição celular que resulta no empacotamento do conteúdo celular em vesículas (corpos apoptóticos), diminuição no tamanho celular, estrangulamento do citoplasma, formação de vesículas na membrana celular (*membrane blebbing*), fragmentação do DNA e mudanças na cromatina, que se torna altamente condensada e adjacente à membrana nuclear, alterações que *in vivo*, fazem com que a célula seja fagocitada por células especializadas. Como no cultivo *in vitro* não existem essas células fagocíticas especializadas, a célula apoptótica acaba extravasando seu conteúdo, tal como ocorre na necrose (CUMMINGS *et al.*, 2004; BOLETI *et al.*, 2008; PELLEGRINI; PINTO; CASTILHO, 2008).

Os estudos *ex vivo* e *in vivo* têm demonstrado a relevância da apoptose no controle do câncer (ZABKIEWICZ; CLARKE, 2004). Assim, a

falha na ativação da apoptose representa um dos maiores obstáculos para o sucesso da farmacoterapia do câncer (CUMMINGS *et al.*, 2004).

As células tumorais apresentam mutações genéticas e epigenéticas para evitar a morte por evasão e desregulação da apoptose e iniciar, promover e progredir o crescimento do tumor. Assim, agentes que levam células tumorais à apoptose são importantes para o desenvolvimento de fármacos antitumorais (KUMAR *et al.*, 2011). A apoptose tem sido relatada como sendo a principal causa de morte das células tumorais em pacientes tratados com quimio, radio e imunoterapia (DAS *et al.*, 2002).

Para que as células em apoptose possam ser fagocitadas, elas emitem sinais como a externalização da fosfatidilserina, uma proteína presente na parte interna da membrana de células saudáveis, que é rapidamente exposta à parte externa da membrana das células em apoptose, servindo como um sinal para que estas células sejam fagocitadas (SEGAWA; SUZUKI; NAGATA, 2011).

A apoptose ocorre principalmente por duas vias, intrínseca (mitocondrial) ou extrínseca (dos receptores de morte) (Figura 2). A via intrínseca é caracterizada pela saída do citocromo c da mitocôndria, levando à ativação da caspase 9. Esse processo é controlado pela família de proteínas Bcl-2 (HECTOR; PREHN, 2009).

A família de proteínas Bcl-2 possui tanto membros pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bok e a subfamília BH3 - Bik, Bad, Bim, Noxa e Puma) quanto anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1) e acredita-se que a razão entre esses membros da família seja fundamental para a decisão da célula de viver ou morrer (ZABKIEWICZ; CLARKE, 2004).

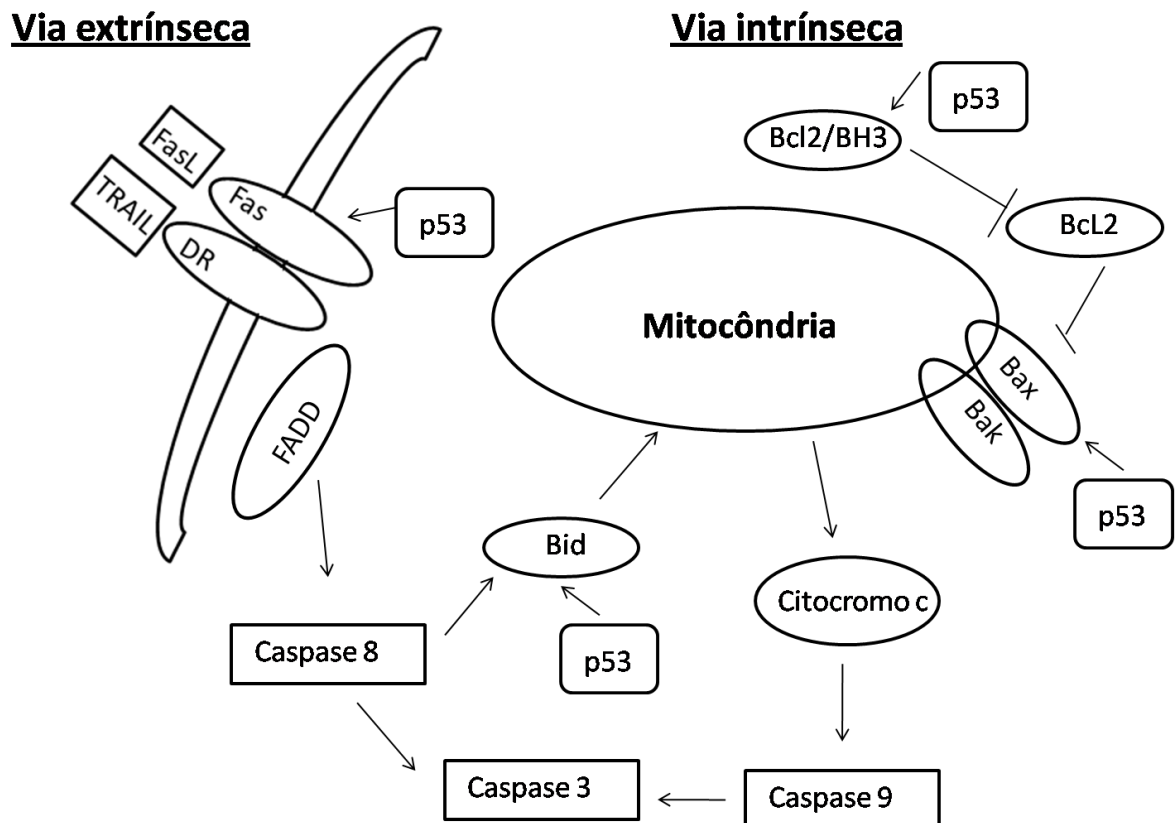
A associação entre os membros da família Bcl-2 e a morte celular se deve, pelo menos em parte, ao *status* da p53. Pelo menos as proteínas Bax, Noxa e Bid são reguladas pela p53. Nas neoplasias, ocorre uma desregulação da família Bcl-2, com superexpressão da proteína Bcl-2, levando ao crescimento desordenado das células (ZABKIEWICZ; CLARKE, 2004).

Havendo ativação da via intrínseca da apoptose, os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 (como Bax e Bak) sofrem mudanças conformacionais, que permitem que se liguem à membrana externa na mitocôndria, ocasionando a permeabilização da membrana mitocondrial e a saída de citocromo c e outras moléculas pró-apoptóticas. Além disso, as proteínas pró-apoptóticas que expressam apenas o domínio BH3 (subfamília BH3) se ligam às anti-apoptóticas, inibindo-as. Por fim, o citocromo c no citoplasma irá complexar com Apaf-1 (fator 1 de ativação de proteases de apoptose) e formar o apoptossomo, que irá ativar a pró-caspase 9, que por sua vez ativará a caspase efetora 3, levando a célula à apoptose (HECTOR; PREHN, 2009) (Figura 2).

Já a via extrínseca da apoptose é desencadeada pela ativação dos receptores de morte da membrana celular e pode desencadear a apoptose independente da mitocôndria. Nessa via, a ativação dos receptores de morte (como Fas - CD95 ou Apo-1 - e receptores de morte 4 e 5 - DR4/TRAIL-R1 e DR5/TRAIL-R2) por seus respectivos ligantes (FasL e TRAIL) levam ao recrutamento da molécula adaptadora FADD (domínio de morte associado a Fas), resultando na ativação da pró-caspase 8 e consequente ativação da caspase efetora 3. A proteína p53 também é capaz de ativar os receptores

de morte. Por outro lado, a ativação da caspase 8 também pode levar à clivagem e ativação da proteína pró-apoptótica Bid, que por sua vez irá ativar a via intrínseca da apoptose (HECTOR; PREHN, 2009) (Figura 2).

Figura 2: Vias extrínseca e intrínseca da apoptose de forma resumida.



Como se pode observar, as caspases (uma família de cisteíno proteases que clivam especificamente seus substratos após resíduos de ácido aspártico) são moléculas efetoras chave das duas vias da apoptose. Elas são divididas em dois grupos, as caspases iniciadoras e as efetoras. Dentre as iniciadoras estão as caspases 8 e 9 e dentre as efetoras, a 3 e a 7. As caspases iniciadoras, quando ativadas, ativam as caspases efetoras (HECTOR; PREHN, 2009).

A ativação das caspases é um evento importante durante a apoptose e representa a fase final deste processo. Como resultado desta ativação, serão inativadas proteínas do citoesqueleto, componentes das junções aderentes, proteínas nucleares, proteínas envolvidas no metabolismo e reparo do DNA e proteínas envolvidas em vias de sinalização, levando à condensação da cromatina, fragmentação do DNA (KANNAN; JAIN, 2000; DAS *et al.*, 2011) e às características morfológicas e bioquímicas típicas da apoptose.

Para detectar a morte celular por apoptose, alguns ensaios são indicados, como a análise morfológica, a aparência da superfície das células apoptóticas, que externalizam a fosfatidilserina, que pode ser detectada pelo ensaio da anexina-V, a fragmentação de DNA, ensaios de avaliação da ativação de caspases e a detecção de proteínas relacionadas às vias apoptóticas através da ligação antígeno-anticorpo (CUMMINGS *et al.*, 2004).

1.6 Tratamento do Câncer

Até o século 20 houve pouco progresso na compreensão dos mecanismos relacionados ao desenvolvimento do câncer (BODE; DONG, 2009). Desde então, a pesquisa de terapias melhores, mais potentes e mais seletivas/menos tóxicas para o tratamento do câncer é contínua (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2002).

A cisplatina, por exemplo, entrou nos ensaios clínicos em 1971 e em um período de tempo relativamente curto tornou-se o antitumoral mais amplamente usado. Porém, seu uso é limitado por sua grave toxicidade e por causar resistência. Alguns tumores apresentam resistência natural à

cisplatina e outros desenvolvem resistência após o início do tratamento (CHATTERJEE *et al.*, 2008).

Uma das limitações da terapia anticâncer atual ainda é a falta de seletividade dos fármacos para células tumorais *in vivo*, que ocasiona sérios efeitos colaterais para as células normais (KUMAR *et al.*, 2009; UPADHYAY *et al.*, 2012). Esta elevada toxicidade dos fármacos antitumorais existentes no mercado tem estimulado o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer (VIRAL; SHIVANAND; JIVANI, 2011).

Além disto, terapias como quimio, radio e imuno são mais eficazes se o número de células for baixo (AGRAWAL *et al.*, 2011). Torna-se importante, então, investir em compostos que apresentem maior seletividade e efetividade para as células tumorais.

Assim, sempre há necessidade de se identificar, caracterizar e desenvolver novos fármacos para o tratamento do câncer.

1.7 Descoberta de novos fármacos antitumorais

Inicialmente, os compostos ativos eram identificados por *screening* aleatório, através do estabelecimento da dose máxima tolerada. Os estudos dos mecanismos de ação e farmacologia pré-clínica e os efeitos do agente sobre o tumor (farmacodinâmica) recebiam menos destaque (CUMMINGS *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, novas terapias anticâncer têm acompanhado as abordagens clássicas de cirurgia, radio e quimioterapia (MALINOWSKY *et al.*, 2011). Com o advento da era das terapias para alvos moleculares, houve uma revolução no processo de desenvolvimento de fármacos antitumorais

(CUMMINGS *et al.*, 2004). Essas novas formas de tratamento objetivam inibir alvos moleculares específicos, como proteínas alteradas ou desreguladas, oferecendo a possibilidade de terapias individualizadas (MALINOWSKY *et al.*, 2011).

A transição da quimioterapia citotóxica para a descoberta de novos fármacos baseada em alvos moleculares tem resultado em um aumento no sucesso das terapias e na sobrevida dos pacientes com câncer (HOELDER; CLARKE; WORKMAN, 2012).

No desenvolvimento de fármacos antitumorais contemporâneos, o alvo molecular é primeiramente validado por uma bateria de técnicas de biologia molecular e o *screening* é aproveitado para identificar candidatos a protótipos de fármacos. A farmacologia e a farmacocinética são incorporadas ao início do ciclo de descoberta, em conjunto com a química medicinal, para produzir candidatos com propriedades mais “*drug-like*” (CUMMINGS *et al.*, 2004).

Nesse sentido, fármacos têm sido desenhados para atuar em alvos específicos, como o trastuzumabe, o lapatinibe e o pertuzumabe, desenhados para atuar no receptor HER 2 e tratar câncer de mama e gástrico, o cetuximabe, desenhado para atuar no receptor EGFR e tratar câncer colorretal metastático, o gefitinibe e o erlotinibe, desenhados para atuar no receptor EGFR mutado e tratar câncer de pulmão de células não-pequenas e o mesilato de imatinibe e o dasatinibe, desenhados para atuar no produto do gene Bcr/abl e tratar leucemia mielóide crônica, sarcomas e câncer de mama (MALINOWSKY *et al.*, 2011).

Fármacos quimioterápicos modernos têm sido desenhados para ser direcionados às vias da apoptose, com o objetivo de erradicar as células tumorais (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2002; CUMMINGS *et al.*, 2004; DAS *et al.*, 2011), pois a apoptose interfere em dois dos principais mecanismos que contribuem para a progressão do câncer, a proliferação celular desordenada e a supressão da morte celular (BROMBERG *et al.*, 2010).

Dentre as moléculas que fazem parte dos mecanismos de morte por apoptose, o principal interesse no desenvolvimento de novos fármacos têm sido as quinases, as moléculas receptoras e os reguladores das cascatas de sinalização (MALINOWSKY *et al.*, 2011). Existem mais de 100 ensaios clínicos sendo desenvolvidos com foco na inibição de tirosina-quinases (CUMMINGS *et al.*, 2004).

O oblimersen foi desenhado para atuar como antisense do gene que codifica a proteína antiapoptótica Bcl2, com bons resultados nos primeiros ensaios clínicos contra linfoma não-Hodgkin. Em ensaios de fase I-II com pacientes com melanoma em estágio avançado, em associação com outros fármacos citotóxicos, o oblimersen mostrou regulação negativa de Bcl2 em amostras de biópsias de pacientes (CUMMINGS *et al.*, 2004).

O bortezomibe foi desenhado para atuar inibindo o fator sinalizador de transcrição NF κ B e já foi aprovado pelo FDA para o tratamento de melanoma múltiplo em pacientes que já tenham recebido dois tipos de terapias e que a doença continue progredindo (CUMMINGS *et al.*, 2004).

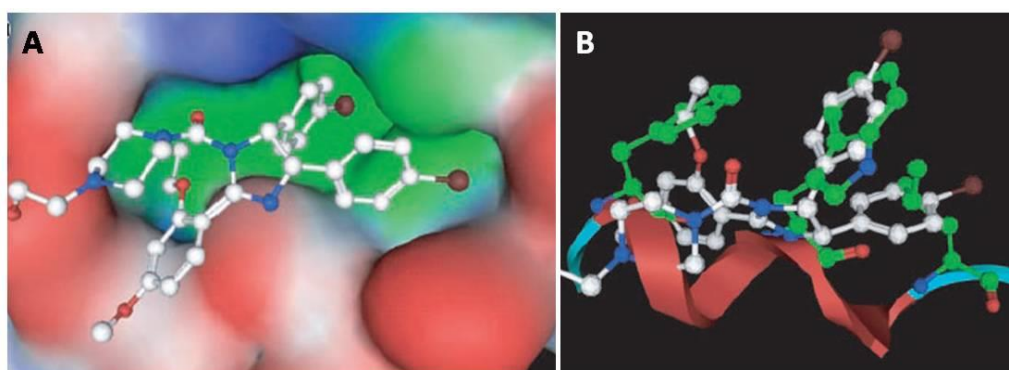
Pequenas moléculas baseadas na estrutura da polifenilureia foram desenhadas para inibir o XIAP (inibidor de apoptose – via inibição de caspases - ligado ao cromossomo x) da caspase 3 e demonstraram

atividade antitumoral *in vivo* contra modelos xenográficos de câncer de próstata e de câncer de cólon humanos (CUMMINGS *et al.*, 2004).

A proteína MDM2 é um regulador negativo de p53 e o maior supressor de sua função. Assim, ao bloquear a interação p53-MDM2, espera-se estabilizar p53 e ativar a via desta proteína, levando à retenção do ciclo celular e/ou apoptose. Essa noção levou ao desenvolvimento de uma série de pequenas moléculas inibidoras da interação p53-MDM2 (SHEN; MAKI, 2011).

Neste contexto estão os nutlins, pequenas moléculas análogas da cis-imidazolina que foram selecionadas a partir de uma triagem feita com diversos produtos sintéticos por atuar como inibidores seletivos da interação p53-MDM2. Estes compostos se ligam ao local de ligação de p53 em MDM2, mimetizando p53 (VASSILEV *et al.*, 2004) (Figura 3).

Figura 3: p53 ligada à MDM2 (A) e Nutlin-2 ligado à MDM2 (B).



Adaptado de: VASSILEV *et al.*, 2004.

A reativação da função da p53 através do rompimento da interação p53-MDM2 através de pequenas moléculas não-peptídicas é uma estratégia promissora para o desenho de novos fármacos anticâncer (GUO *et al.*,

2012). Estudos recentes têm demonstrado que restabelecer a atividade da p53 é suficiente para induzir a regressão do tumor em modelos xenográficos de camundongos (SHEN; MAKI, 2011).

Vassilev e colaboradores (2004) avaliaram a atividade dos nutlins 1, 2 e 3 em células tumorais humanas com p53 do tipo selvagem, que sabidamente tinham a capacidade de ativar p53 em resposta a estresse genotóxico, e também em células tumorais com mutações em p53, que serviram como controles negativos.

As células tumorais que continham p53 do tipo selvagem, tratadas com o nutlin 1, tiveram aumento na expressão de p53, MDM2 e p21. Houve também aumento da proporção de células nas fases G₁ e G₂ do ciclo celular e redução na fase S, confirmando que o composto ativou a principal função celular da p53. Além disso, o tratamento teve efeito antiproliferativo e citotóxico, de maneira dose-dependente, e levou as células à morte por apoptose, via ativação de caspases. O nutlin 3 também apresentou atividade antitumoral *in vivo* e foi comprovado que a ativação de p53 pelos nutlins é dependente do efeito desses compostos em MDM2 (VASSILEV *et al.*, 2004).

Atualmente, os nutlins são considerados entre os mais promissores agentes ativadores de p53, capazes de induzir apoptose dependente de p53 em células tumorais humanas como osteosarcoma, de câncer de colon, de leucemia mielóide aguda, de câncer de pulmão, de leucemia linfocítica crônica, de glioblastoma e de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (MIR *et al.*, 2013).

Recentemente, foi demonstrado que os nutlins são capazes de atuar ainda em células que contém p53 mutada, especialmente em combinação

com outro tipo de terapia, promovendo ou aumentando sinergicamente a indução de apoptose em vários tipos de leucemias, além de linfoma, câncer de colon, melanoma, câncer de mama e câncer de ovário e endométrio (SHEN; MAKI, 2011).

As associações de nutlins com outras terapias também foram capazes de aumentar a quimio ou radiosensibilidade em câncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de laringe, câncer de pulmão e neuroblastoma (SHEN; MAKI, 2011).

Além de atuar na interação p53-MDM2, tem sido demonstrado que os nutlins também são capazes de bloquear a produção de VEGF, apresentando propriedades antiangiogênicas (SHEN; MAKI, 2011). Além disso, os nutlins atingiram com sucesso as fases I e II de ensaios clínicos em pelo menos um tipo de câncer hematológico (SAHA; QIU; CHANG, 2013).

1.8 LQFM030

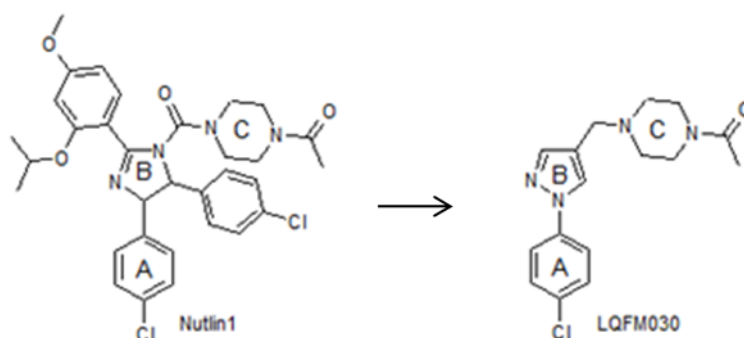
O desenvolvimento de novos fármacos é um processo lento, bastante dispendioso e apenas um pequeno percentual de produtos testados chegam à indústria farmacêutica (DIMASI; HANSEN; GRABOWSKI, 2003).

Tendo em vista o potencial antitumoral dos nutlins e sua complexa produção, foram criados análogos com o objetivo de otimizar a produção e manter a atividade antitumoral e indutora de apoptose, como o LQFM030.

O LQFM030 é um composto heterociclo originalmente planejado a partir do protótipo nutlin-1, através do emprego da estratégia de simplificação molecular, no Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal

(LQFM) da Faculdade de Farmácia da UFG, sob a coordenação do Prof. Dr. Ricardo Menegatti.

Figura 4: Simplificação molecular a partir do composto Nutlin-1 dando origem ao composto LQFM030.



Estudos recentes do nosso grupo demonstraram que o LQFM030 possui importante citotoxicidade e potencial indutor de apoptose frente a uma linhagem celular leucêmica humana, promovendo alterações na progressão do ciclo celular (através de diminuição da fase S e aumento das fases G₁ e G₂), modulação da expressão gênica, aumento na expressão da proteína Bax e do Citocromo-c, diminuição da expressão da proteína Bcl-2 e alterações no potencial de membrana mitocondrial. Esses dados indicam o composto LQFM030 como um possível candidato a protótipo de fármaco antitumoral (CARVALHO, 2011).

Foram realizados ainda estudos iniciais de avaliação de segurança *in vitro* e *in vivo*. Nos ensaios de segurança *in vitro*, concluiu-se que o composto LQFM030 apresentou um baixo efeito citotóxico para células basais (da linhagem 3T3) e não apresentou atividade hemolítica significativa (CARVALHO, 2011).

Na avaliação da sobrevida dos animais portadores do TAE, observou-se aumento significativo da sobrevida dos animais tratados com LQFM030. Já para a verificação da toxicidade oral aguda em dose única, o composto foi classificado na categoria 5 ou não-tóxico pela GSH (Global System Harmonized) (CARVALHO, 2011).

Diante disto, neste trabalho foi avaliada a atividade antitumoral *in vivo* e antiproliferativa *in vitro* do composto LQFM030, bem como as vias envolvidas nestas atividades.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* em animais portadores do TAE e antiproliferativa *in vitro* em células oriundas de animais portadores do TAE do composto LQFM030.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a atividade antitumoral do composto LQFM030 em animais portadores do TAE;
- Estudar os mecanismos envolvidos na atividade antitumoral do composto LQFM030 em animais portadores do TAE;
- Investigar a citotoxicidade do composto LQFM030 em células do TAE;
- Analisar a capacidade indutora de apoptose do composto LQFM030 em células do TAE;
- Estudar as alterações morfológicas e bioquímicas nas células do TAE promovidas pelo tratamento com o composto LQFM030;
- Avaliar os mecanismos e as vias envolvidas na atividade antitumoral do composto LQFM030 em células do TAE (via p53 e apoptose via caspases).

3 MÉTODO(S)

3.1 Composto LQFM030

3.1.1 Obtenção do composto

O composto LQFM030 foi cedido pelo Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG), coordenado pelo Prof. Dr. Ricardo Menegatti e mantido em freezer a - 20°C.

3.1.2 Preparo da emulsão

Para o preparo da emulsão, o composto LQFM030 foi pesado a concentrações finais de 50, 75 e 150 mg/mL para os experimentos *in vivo* e de 5 mg/mL para os experimentos *in vitro*. Em seguida era adicionado, para cada 1mL de emulsão, 100 µL de óleo comercial de girassol, agitado em vortex AP56 (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil), e acrescido de 100 mg de fosfatidilcolina de soja (Lipoid, Newark, NJ, USA) e 50 µL de etanol P.A. (Vetec, RJ, Brasil). A mistura era agitada novamente em vortex por 3 a 5 minutos e o volume completado com água ultrapura (Millipore corporation, MA, USA). Após o preparo, a emulsão foi deixada em banho ultra-som (Unique, SP, Brasil) por 30 minutos. A emulsão foi preparada diariamente.

3.2 Animais

3.2.1 Descrição dos animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) machos e saudáveis, com aproximadamente 30 g de peso corpóreo, doados pelo biotério de criação da Indústria Química de Goiás (IQUEGO) e pelo Biotério Central da UFG. A utilização dos animais foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - PRPPG/UFG), através do Parecer n. 018/12.

3.2.2 Alojamento e manejo dos animais

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, com ração balanceada para roedores e água fornecidos *ad libitum*. A iluminação da sala foi mantida em um ciclo claro/escuro de 12 h, sendo a fase clara iniciada às 7:00 h. Durante todo o experimento os animais permaneceram em sala com umidade e temperatura constantes (umidade relativa de 65 a 70% e temperatura de 23 ± 2 °C). Os camundongos foram mantidos nessas condições por um período de adaptação de no mínimo 7 dias antes do início de cada ensaio experimental (aclimação) e durante todo o período experimental. A maravalha utilizada foi autoclavada para um maior controle microbiológico e todo o material utilizado com os animais foi previamente sanitizado.

3.3 Tumor ascítico de Ehrlich (TAE)

As células do TAE foram mantidas nas dependências do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular da Faculdade de Farmácia/UFG através de sucessivas passagens entre animais, pela via intraperitoneal (IP).

Para o desenvolvimento do TAE, os camundongos foram inoculados, via IP, com 0,5 mL do líquido ascítico de animais portadores do tumor.

Após sete dias de evolução do tumor, os camundongos foram anestesiados subcutaneamente com 10 mg/Kg de xilazina (Syntec, Cotia, SP, Brasil) e 100 mg/Kg de cetamina (Agener, Embu-Guaçu, SP, Brasil). Após constatação de ausência de reflexo de pata, foram eutanasiados por deslocamento cervical e o líquido ascítico foi colhido com seringa estéril.

Para as análises posteriores, o líquido ascítico foi diluído em PBS e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em PBS, e a contagem das células viáveis foi feita em câmara de Neubauer (Boeco, Hamburg, Germany), por microscopia óptica, após diluição em solução de azul de Tripiano (Vetec, RJ, Brasil) a 0,2%.

3.4 Experimentos *in vivo*

Todos os ensaios *in vivo* foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.4.1 Avaliação da inibição tumoral e determinação da DE₅₀

Após a contagem das células viáveis, os animais receberam 200 µL de células do TAE na concentração de 1×10^7 por mL, diluídas em PBS estéril, via IP, no dia 0. No dia 1 (após 24h da inoculação do tumor), os animais foram randomizados em 5 grupos de 6 animais, conforme descrito abaixo:

Grupo controle negativo (CN) – Animais sem TAE e recebendo diariamente 100 µL de PBS.

Grupo controle (TAE controle) – Animais inoculados com o TAE e recebendo diariamente 100 µL do veículo utilizado para a preparação do composto (emulsão branca).

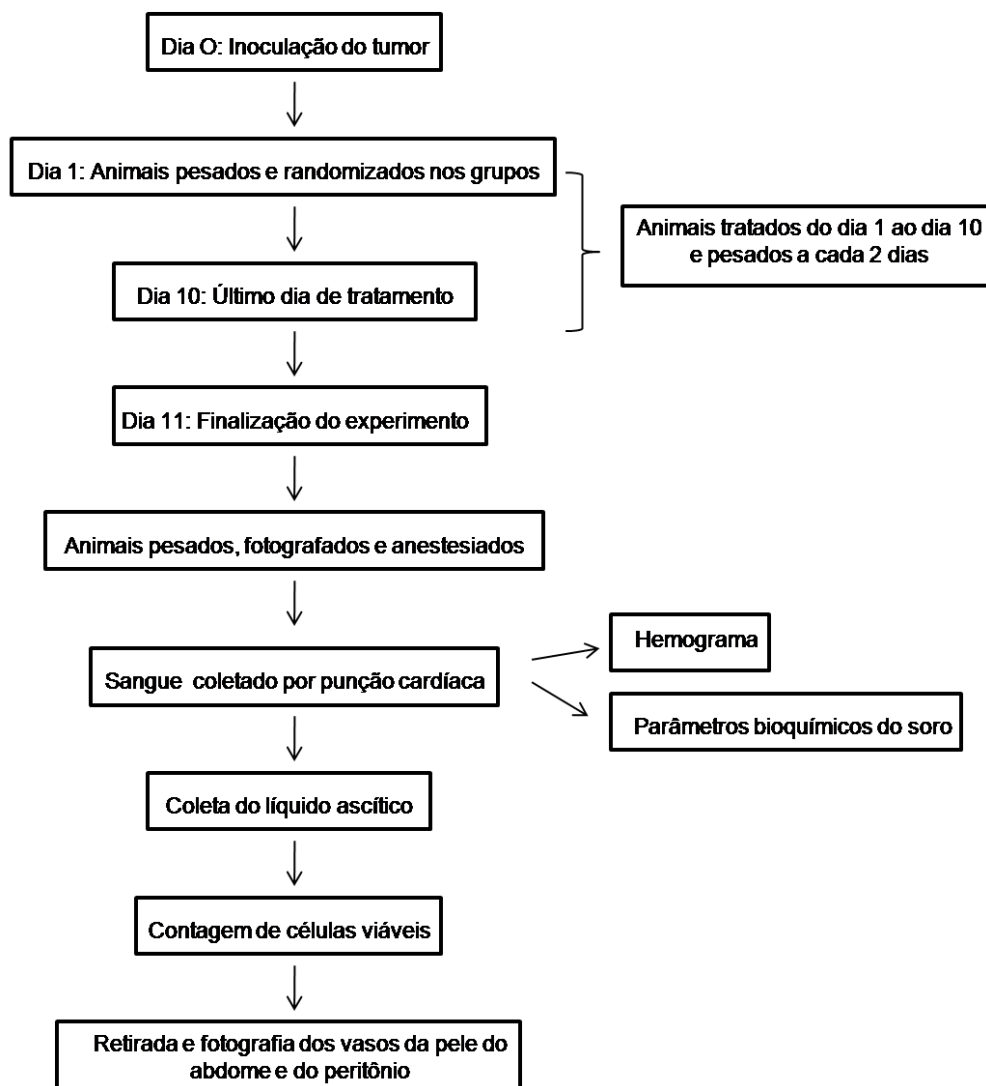
Grupo 50 mg/Kg – Animais inoculados com o TAE e tratados diariamente com 100 µL da emulsão do composto LQFM030 a 50 mg/Kg.

Grupo 75 mg/Kg – Animais inoculados com o TAE e tratados diariamente com 100 µL da emulsão do composto LQFM030 a 75 mg/Kg.

Grupo 150 mg/Kg – Animais inoculados com o TAE e tratados diariamente com 100 µL da emulsão do composto LQFM030 a 150 mg/Kg.

As doses foram determinadas a partir de estudos preliminares de sobrevida e segurança *in vivo* (CARVALHO, 2011). O tratamento foi administrado durante 10 dias (dia 1 ao dia 10) e os animais foram pesados a cada dois dias para recálculo das doses. O tratamento e os experimentos realizados para avaliação da inibição tumoral e determinação da DE₅₀ estão esquematizados na Figura 5.

Figura 5: Fluxograma representando o tratamento e os experimentos realizados para avaliação da inibição tumoral e determinação da DE₅₀ do composto LQFM030 *in vivo*.



3.4.1.1 Volume tumoral

No dia 11 os camundongos foram fotografados para avaliação morfológica macroscópica da evolução tumoral e o cálculo do volume tumoral foi feito por meio de dois diferentes ensaios:

3.4.1.1.1 Peso corporal

Para cálculo do peso corporal os animais foram pesados nos dias 1 e 11. Calculou-se a diferença entre o peso do dia 11 e o peso do dia 1. A redução no peso corporal foi comparada em relação ao TAE controle.

3.4.1.1.2 Volume do líquido ascítico

A medida do volume de líquido ascítico foi realizada após anestesia e eutanásia (conforme descrito anteriormente). O líquido ascítico foi retirado com seringa estéril e centrifugado a 1500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi congelado para análises posteriores. A redução no volume de líquido ascítico foi comparada em relação ao TAE controle.

3.4.1.2 Angiogênese peritoneal

Para avaliação da angiogênese peritoneal, a pele da região abdominal e o peritônio foram retirados e fotografados com câmera digital Cyber-shot 14.1 mp (Sony) e foi realizada uma análise morfológica macroscópica dos vasos.

3.4.1.3 Contagem de células viáveis pelo método da exclusão do azul de tripano

Após a coleta e centrifugação do líquido ascítico, o botão celular foi ressuspenso em meio RPMI e colocado em placas de petri em estufa de CO₂ (Thermo Fischer, Redwood, CA, USA) por 1h, a 37°C em atmosfera

úmida contendo 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico no ar, para adesão dos macrófagos.

Após 1h na estufa, o conteúdo das placas de petri foi homogeneizado, centrifugado a 1500 rpm por 10 min, ressuspenso em PBS e a contagem das células viáveis foi feita em câmara de Neubauer, por microscopia óptica, após diluição em solução de azul de Tripiano a 0,2%.

Após estes ensaios, foi determinada a DE₅₀ do composto LQFM030, que foi utilizada para testes subsequentes.

3.4.2 Avaliação dos parâmetros sanguíneos

Para avaliação dos parâmetros sanguíneos dos camundongos o sangue foi coletado por punção cardíaca (após anestesia) sem anticoagulante.

3.4.2.1 Avaliação hematológica

Para a avaliação hematológica, 150 µL de sangue foram, imediatamente após a punção cardíaca, dispensados em microtubo contendo 140 µL de PBS e 10 µL de EDTA a 10% (Dole Reagentes, Goiânia, GO, Brasil). O hemograma foi realizado em hemocítômetro ABX Micros 60 (Horiba ABX, Montpellier, França).

3.4.2.2 Avaliação bioquímica do soro

Para avaliação bioquímica do soro, o sangue foi coagulado em banho-maria a 37°C. Após a coagulação, os microtubos foram centrifugados a 3000

rpm por 10 min e o sobrenadante (soro) guardado em geladeira até o momento das análises.

As análises foram feitas utilizando kits Labtest diagnóstica SA (Lagoa Santa, MG, Brasil) no aparelho Labmax 240 (Labtest diagnóstica SA). Os parâmetros bioquímicos analisados e as metodologias utilizadas estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos do soro dos camundongos analisados e respectivas metodologias de análise.

Parâmetro bioquímico	Metodologia de análise
ALT/TGP	Cinética UV-IFCC
AST/TGO	Cinética UV-IFCC
LDH	UV- piruvato-lactato
CPK	UV- imunoinibição IFCC
Creatinina	Colorimétrico- pinato alcalino- Jaffé
Ureia	Enzimático UV
Glicose	GOD-Trinder
Proteínas totais	Colorimétrico- biureto
Albumina	Colorimétrico- verde de bromocresol
Bilirrubina direta	Colorimétrico- Labtest DCA
Bilirrubina total	Colorimétrico- Sims-Horn
Colesterol total	Colorimétrico- enzimático de Trinder

3.4.3 Dosagem do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

A dosagem do VEGF foi feita utilizando-se o kit *quantikine ELISA mouse VEGF* (R&D systems, Minneapolis, MN, USA), seguindo as orientações do fabricante.

A curva padrão foi feita em duplicata, utilizando o padrão provido no kit, iniciando com uma concentração de 500 pg/mL, com diluição de 2x, até

7,8 pg/mL. O diluente provido no kit foi utilizado como padrão branco (0 pg/mL). As amostras utilizadas (líquido ascítico dos animais, coletado conforme item 3.4.1.1.2), foram diluídas 10x.

Para o ensaio, foram adicionados 50 µL do diluente a cada poço. Em seguida, adicionou-se 50 µL de padrão, controle (provido no kit) ou amostra em seu respectivo poço, em duplicata. Homogeneizou-se a placa por 1 min, cobriu-se com uma tira adesiva e incubou-se por 2h à temperatura ambiente. Após a incubação, cada poço foi lavado com 400 µL de tampão de lavagem por 5 vezes, retirando-se o excesso de tampão na última lavagem vertendo-se a placa em papel toalha limpo.

Após as lavagens, adicionou-se 100 µL de conjugado VEGF *mouse* em cada poço, cobriu-se a placa com uma nova tira adesiva e incubou-se por 2h à temperatura ambiente. Após a incubação, repetiu-se a lavagem já descrita e adicionou-se 100 µL de solução de substrato em cada poço, incubando por 30 min à temperatura ambiente, protegido da luz.

Após a incubação, adicionou-se 100 µL de solução de parada em cada poço, homogeneizando a placa. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas Stat Fax 2100 (Awareness Technology, Dusseldorf, Germany) a 450 nm, com correção de comprimento de onda a 540 nm.

Os resultados foram obtidos por subtração da média de cada duplicata de padrão, controle ou amostra da densidade ótica do padrão branco. A curva padrão foi feita por redução dos dados utilizando o programa Graph pad prism (versão 5.00 para Windows XP, Graph Pad Software, San Diego, Califórnia, USA). A média da absorvância (DO) obtida

para cada dose do composto LQFM030 foi comparada com a curva padrão e multiplicada pela diluição, obtendo-se a concentração de VEGF para cada dose.

3.4.4 Avaliação da atividade antitumoral

A avaliação da atividade antitumoral do composto LQFM030 foi feita por citometria de fluxo após a determinação da DE₅₀.

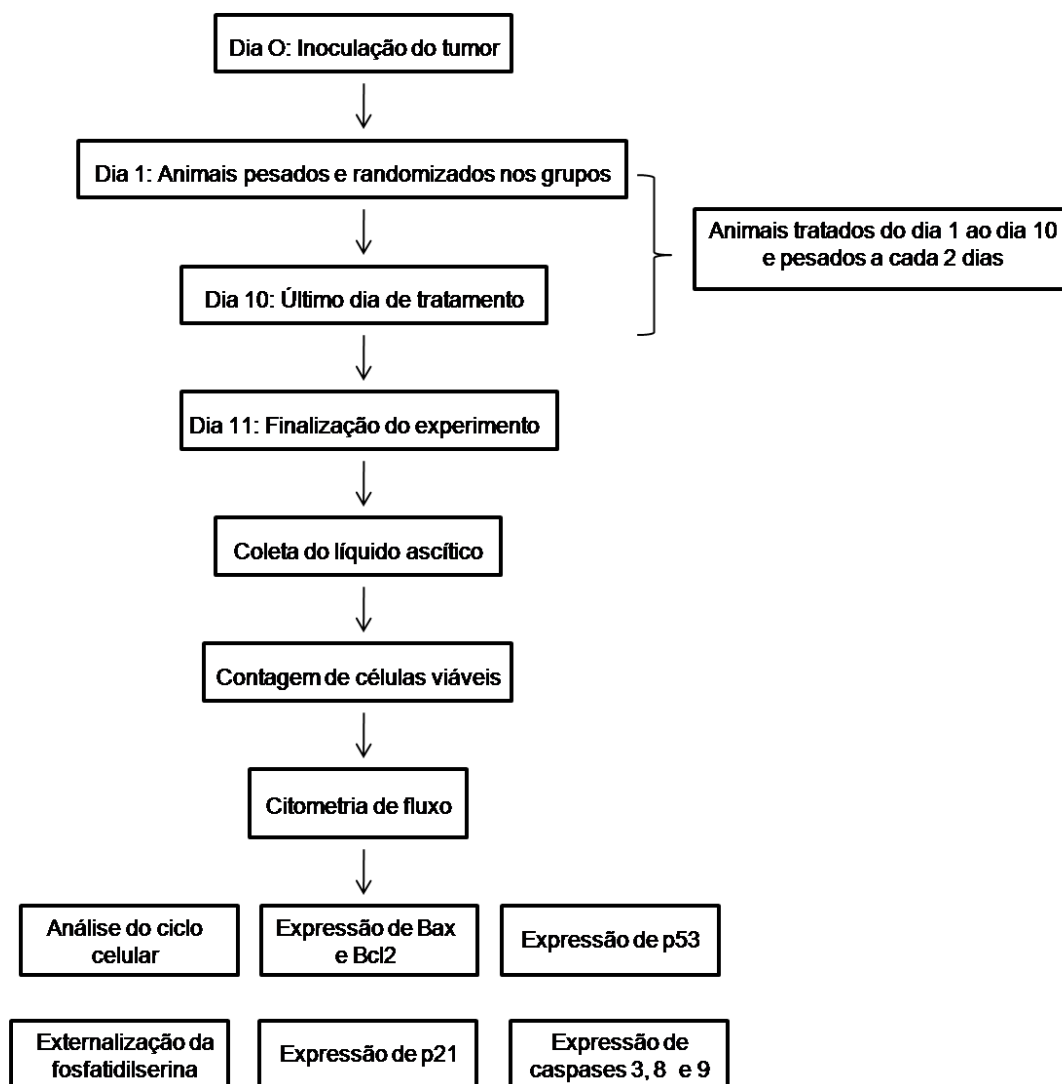
Os animais receberam 200 µL de células do TAE na concentração de 1×10^7 por mL, diluídas em PBS estéril, via IP, no dia 0. No dia 1, os animais foram randomizados em 2 grupos de 6 animais, conforme descrito abaixo:

Grupo controle (TAE controle) – Animais inoculados com o TAE e recebendo diariamente 100 µL do veículo utilizado para a preparação do composto (emulsão branca).

Grupo 150 mg/Kg – Animais inoculados com o TAE e tratados diariamente com 100 µL da emulsão do composto LQFM030 a 150 mg/Kg.

O tratamento foi administrado durante 10 dias (dia 1 ao dia 10) e os animais foram pesados a cada dois dias para recálculo das doses. O tratamento e os experimentos realizados para avaliação da atividade antitumoral estão esquematizados na Figura 6.

Figura 6: Fluxograma representando o tratamento e os experimentos realizados para avaliação da atividade antitumoral do composto LQFM030 *in vivo*.



No dia 11, os camundongos foram anestesiados e eutanaziados (conforme descrito anteriormente), o líquido ascítico foi retirado com seringa estéril e centrifugado a 1500 rpm por 10 min e o botão celular ressuspenso em meio RPMI e colocado em placas de petri em estufa de CO₂ por 1h, a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico no ar, para adesão dos macrófagos.

Após 1h na estufa, o conteúdo das placas de petri foi homogeneizado, centrifugado a 1500 rpm por 10 min, ressuspensão em PBS e a contagem das células viáveis foi feita em câmara de Neubauer, por microscopia óptica, após diluição em solução de azul de Tripiano a 0,2%.

Para a avaliação da atividade antitumoral por citometria de fluxo foi utilizado o equipamento FACSCanto II (BD Biosciences, NJ, USA) e a análise dos dados feita pelo software FACSDiva. Em todos os experimentos, foram adquiridos 10.000 eventos de cada amostra, e as subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades FSC (*Foward scatter*) e SSC (*Side scatter*), que avaliam, respectivamente, o tamanho e a complexidade interna das células. Assim, em cada experimento, a população de interesse (células do TAE) foi selecionada por meio de *gates*, excluindo-se outros tipos celulares das análises. Para todos os experimentos, as células foram ressuspensas a 1×10^6 células/mL.

3.4.4.1 Externalização da fosfatidilserina

A externalização da fosfatidilserina foi mensurada pelo kit *annexin V apoptosis detection FITC* (eBioscience, San Diego, CA, USA). Para este ensaio as células foram lavadas a 1500 rpm por 10 minutos, ressuspensas em PBS e em seguida lavadas com tampão *binding buffer* 1x concentrado. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em *binding buffer* 1x concentrado a 1×10^6 células/mL. Foi adicionado 5 μ L de anexina V para cada 100 μ L de suspensão celular e incubado 15 min à temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram novamente lavadas com *binding buffer* 1x concentrado a 1500 rpm por 10 min e ressuspensas

novamente no tampão. A cada tubo marcado foi adicionado 5 µL de iodeto de propídio (PI) e fez-se a leitura em citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis (células não marcadas), células em apoptose recente (marcadas apenas com anexina-V/FITC), células em apoptose tardias (marcadas com anexina-V/FITC e com PI) e células em necrose (marcadas apenas com PI).

3.4.4.2 Ciclo Celular

Para análise do ciclo celular as células foram lavadas a 1500 rpm por 10 minutos, ressuspensas em PBS, e cada tubo para citometria de fluxo, previamente identificado, recebeu 200 µL da suspensão de células e 1 mL de álcool 70% gelado. Os tubos foram então incubados por 24 horas a 4°C. Após a incubação, centrifugou-se os tubos a 1500 rpm por 10 minutos por duas vezes com PBS. Os tubos marcados receberam 500 µL de solução de RNAase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 0,2 mg/mL e iodeto de propídio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 0,05 mg/mL, solubilizados em PBS, e os tubos não-marcados receberam 500 µL de PBS. Incubou-se por 1h a 4°C e fez-se a leitura em citômetro de fluxo. Os dados foram expressos em porcentagem de células nas fases G0/G1, S e G2/M.

3.4.4.3 Expressão das proteínas Bax, Bcl2, p53 e p21

Para análise da expressão das proteínas Bax, Bcl2, p53 e p21 as células foram lavadas a 1500 rpm por 10 minutos com PBS. Em seguida foram adicionados 250 µL de solução de fixação e permeabilização *cytofix/cytoperm* (BD Biosciences, NJ, USA) a cada tubo de citometria de

fluxo contendo 200 µL da suspensão de células a 1×10^6 células/mL e incubou-se por 20 min a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas por duas vezes e ressuspensas com PBS-T20 e adicionou-se 5 µL do anticorpo específico para cada proteína a ser investigada, incubando por 15 min a temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS-T20, ressuspensas em PBS e fez-se a leitura em citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos em porcentagem de células expressando as proteínas analisadas em relação ao controle.

3.4.4.4 Expressão das caspases 3, 8 e 9

O estudo da expressão das caspases 3, 8 e 9 foi realizado utilizando-se o kit *CaspaTag Caspase in situ assay kit, Fluorescein* (Millipore corporation, MA, USA). Para este ensaio, 1×10^6 células/mL foram lavadas com PBS a 1500 rpm por 10 min, ressuspensas em PBS e incubadas por 1h em estufa com 5% de CO₂ a 37°C com 10 µL da caspase investigada. Após a incubação, as células foram lavadas por duas vezes e ressuspensas com o tampão provido no kit. Em seguida, procedeu-se a leitura em citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos em porcentagem de células expressando cada caspase em relação ao controle.

3.5 Experimentos *in vitro*

3.5.1. Avaliação da atividade antiproliferativa

Para a avaliação da atividade antiproliferativa do composto LQFM030 *in vitro* foram utilizadas células do TAE. As células foram obtidas conforme descrito no item 3.3.

Para a realização dos experimentos *in vitro*, uma suspensão celular de TAE (5×10^5 células/mL) foi distribuída em garrafas de cultura celular (TPP, Trasadingen, Suíça) com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e mantida em estufa de CO₂ por 24 horas a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico no ar, para separação de macrófagos e outros tipos celulares.

3.5.1.1 Avaliação da citotoxicidade pelo método da exclusão do azul de tripano

A avaliação da citotoxicidade do composto LQFM030 em células do TAE foi realizada pelo método de exclusão do azul de tripano, que avalia a integridade da membrana plasmática.

Para este ensaio, 50 µL de uma suspensão celular a 5×10^5 células/mL em meio RPMI e 10% soro fetal bovino foram distribuídos em placas de 96 poços e incubados a 37° C em estufa de CO₂ a 5%, por 24 e por 48 horas, com 50 µL da emulsão do LQFM030 nas concentrações de 0,033; 0,067; 0,135; 0,270; 0,540; 1,080; 2,160 e 4,320 mM, em sextuplicata.

Após cada período de incubação, uma alíquota de 20 µL da suspensão de células de cada poço foi retirada e diluída em 180 µL de azul de Tripano a 0,2%. As células foram observadas conforme as suas alterações morfológicas e contadas em câmara de Neubauer. As células viáveis, que excluíram o corante, possuíam um aspecto translúcido e as células mortas apresentavam coloração azulada.

O percentual de inibição celular, na presença do composto em estudo, foi calculado da seguinte forma:

$$\frac{\text{Média do número de células viáveis dos poços tratados de cada concentração} \times 100}{\text{Média do número de células viáveis do controle}}$$

Este ensaio foi realizado por três vezes, e cada concentração do composto LQFM030 foi realizada em sextuplicata. Os resultados obtidos foram analisados, submetidos à análise estatística e apresentados em gráficos.

A partir do ensaio de citotoxicidade, foi determinada a IC₅₀ do composto LQFM030 para as células do TAE (concentração inibitória para 50% das células) em 24h (0,81 mM).

3.5.1.2 Análise da morfologia celular

A análise da morfologia celular foi realizada por microscopia óptica e de fluorescência. Para o preparo das lâminas, as células foram incubadas (1×10^5 células/mL) com 0,81 mM do composto LQFM030 por 24 horas, em estufa úmida, com 5% de CO₂. Após a incubação, 250 µL da suspensão celular foram centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm para cada lâmina (*cytospin*).

3.5.1.2.1 Morfologia celular por microscopia óptica

Para a análise morfológica por microscopia óptica, as células do TAE foram coradas pelo método HE (hematoxilina-eosina) e fotografadas em microscópio óptico (Axio Scope.A1 Carl Zeiss®, Jena, Turíngia, Alemanha), com objetiva de 100 x, utilizando o programa AxioVs40, versão 4.7.2.0.

3.5.1.2.2 Morfologia celular por microscopia de fluorescência

A análise morfológica por microscopia de fluorescência foi realizada utilizando-se o corante Hoechst 33342 (Invitrogen, Eugene, OR, USA). O corante foi solubilizado em PBS na concentração final de 10 µg/mL e estocado a – 20°C até o momento da coloração. Após o *cytospin*, as lâminas foram fixadas em metanol por 5 minutos, lavadas com PBS-T20 por duas vezes e incubadas com 100 µL da solução de Hoechst 33342 a 10 µg/mL, por 20 minutos, no escuro. Após a incubação, as lâminas foram lavadas com PBS. O excesso de PBS foi retirado com papel absorvente, adicionou-se lamínula e as lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio de fluorescência (DMI 4000 B, Leica microsystems, Bannockburn, USA), utilizando-se o programa LAS-AF, filtro A4, cor azul, com objetiva de 20 x.

3.5.1.2 Avaliação dos mecanismos de morte celular

A avaliação dos mecanismos de morte das células do TAE pelo composto LQFM030 foi realizada por três métodos distintos: citometria de fluxo, PCR em tempo real e *Western blotting*. Em todos os ensaios, 1×10^6 células/mL foram incubadas com 0,81 mM do composto LQFM030 (ensaios de citometria e western blotting) ou com 0,405 mM do composto LQFM030 (PCR em tempo real).

3.5.1.2.1 Avaliação dos mecanismos de morte celular por citometria de fluxo

3.5.1.2.1.1 Determinação da integridade da membrana celular

Para a determinação da integridade da membrana celular, as células foram lavadas a 1500 rpm por 10 minutos, ressuspensas em PBS, e cada tubo para citometria de fluxo, previamente identificado, recebeu 500 µL de suspensão de células em PBS. Os tubos marcados receberam 50 µL de solução de iodeto de propídio a 2 µg/mL em PBS e, após 5 min de incubação, fez-se a leitura em citômetro de fluxo.

3.5.1.2.1.2 Determinação da fragmentação de DNA

Para a determinação da fragmentação de DNA, as células foram lavadas a 1500 rpm por 10 minutos, e cada tubo para citometria de fluxo, previamente identificado, recebeu 200 µL de tampão de lise (anexo 2), com iodeto de propídio apenas nos tubos marcados. Os tubos foram incubados por 15 min à 4°C e fez-se a leitura em citômetro de fluxo.

3.5.1.2.1.3 Externalização da fosfatidilserina, ciclo celular, expressão das proteínas p53, p21, p27, e das caspases 3, 8 e 9.

Estes ensaios foram realizados conforme descrito nos itens 3.4.4.1 a 3.4.4.4.

A análise dos dados do ciclo celular *in vitro* foi realizada pelo programa *ModFit LT* (BD Biosciences).

3.5.1.2.2 Avaliação dos mecanismos de morte celular por PCR em tempo real

3.5.1.2.2.1 Expressão do gene p53

Para este ensaio, o RNA total das células foi extraído pelo método do Trizol (ambion/RNA, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e/ou pelo sistema *RNAeasy minikit* (Qiagen, Valencia, CA, USA), seguindo as instruções dos fabricantes. Todos os procedimentos foram realizados com materiais e reagentes próprios para uso exclusivo de RNA. Após a extração, o RNA foi quantificado no espectrofotômetro nanodrop 8000 (Thermo Scientific) com comprimento de onda de 260 e de 280 nm. 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. A integridade do RNA foi observada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio, em voltagem de 80 V. O gel foi fotografado em fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). O RNA foi considerado de qualidade quando apresentou uma razão de absorbância 260/280 nm com valores próximos a 2 e foi possível a observação das bandas referentes às frações 18S e 28S. Em seguida, procedeu-se à síntese do cDNA, pelo método da transcriptase reversa, com 1µg de RNA de cada amostra, utilizando-se o kit *QuantiTect Reverse Transcription* (Qiagen), contendo DNase para evitar a contaminação com DNA genômico, seguindo as orientações do fabricante. Para a reação de PCR, foi utilizado o kit *Rotor-Gene SYBR Green PCR* (Qiagen), com 12,5 µL de *master mix*, 200 nM de *primer forward* (5'- TGA AAC GCC GAC CTA TCC TTA -3'), 200 nM de *primer reverse* (5'- GGC ACA AAC ACG AAC CTC AAA -3') (Hu *et al.*, 2010) e volume completado para 25 µL com água ultrapura por amostra, em duplicata. A PCR foi realizada no equipamento Rotor-Gene (Qiagen), com 45 ciclos de amplificação, consistindo de um passo inicial de ativação da

HotStar Taq Plus DNA polimerase a 95°C por 5 min, seguido de desnaturação por 5 s a 95°C e anelamento/extensão por 10 s a 60 °C. Para avaliar a expressão diferencial do gene p53 nas células tratadas e não tratadas com o composto LQFM030 foi utilizado o método de quantificação relativa, utilizando o Pgk1 (fosfoglicerato quinase) como gene normalizador. O cálculo da expressão relativa foi realizado pelo método do $\Delta\Delta CT$. Os valores de Ct (*threshold cycle*) de cada amostra foram normalizados através do método da curva padrão utilizando os resultados da expressão do gene Pgk1 (*primer forward*: 5'- AAA GTC AGC CAT GTC AGC ACT -3' ; *primer reverse*: 5'- ACT TAG GAG CAC AGG AAC CAA A -3'). A curva padrão foi construída utilizando-se um mix de cDNA de células do TAE com e sem tratamento com o composto LQFM030, nas concentrações de 1x; 1:20; 1:40; 1:80; 1:160 e 1:320. Os dados apresentados são representativos de dois experimentos independentes.

3.5.1.2.3 Avaliação dos mecanismos de morte celular por *Western blotting*

3.5.1.2.3.1 Expressão da proteína MDM2

Para este ensaio, as proteínas foram extraídas utilizando tampão de lise NP-40 e coquetel de inibidores de proteases amresco (Solon, OH, USA). As células foram retiradas das garrafas de cultura no gelo, lavadas por duas vezes com PBS gelado e centrifugadas a 2.000 rpm por 5 min. Após a segunda lavagem com PBS, adicionou-se 1mL de tampão de lise e 10 µL de coquetel de inibidores de proteases em gelo. As células foram então incubadas em gelo por 30 min, sendo submetidas a vortex a cada 10 min.

Após a incubação, centrifugou-se a 13.000 rpm por 10 min a 4 °C, recuperou-se o sobrenadante e descartou-se o sedimento. Alicotou-se e armazenou-se a - 80°C até o momento do uso. Os extratos de proteínas foram quantificados a 598 nm, pelo método de Bradford, 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 poliacrilamida 10% (30% 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 *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific) como padrão de peso molecular. Em seguida as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Millipore), 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 s, 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 (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil). A membrana foi incubada *overnight* a 4 °C, em agitador horizontal, com o anticorpo monoclonal anti-MDM2 (Santa Cruz *Biothechnologies*, Santa Cruz, CA, USA) ou com o controle endógeno anti-GAPDH, diluídos em BSA (MDM2 – 1:250; GAPDH – 1:1000). Após esta incubação, a membrana foi mergulhada em TBS-T (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 o kit BCIP/NBT *substrate* (Invitrogen/ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 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 ImageJ pela comparação entre a área das bandas formadas com o controle endógeno.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o programa Graph pad prism (versão 5.00 para Windows XP, Graph Pad Software, San Diego, Califórnia, USA). A avaliação da citotoxicidade foi realizada em três experimentos independentes e em sextuplicata. Os resultados foram transformados em porcentagem em relação ao controle e o IC₅₀ foi obtido por análise de regressão não-linear. Os dados da avaliação da atividade antitumoral *in vivo* foram analisados por análise de variância (*one-way* ANOVA) e teste *a posteriori* de *Newman-Keuls* para comparação de médias. Todos os outros ensaios foram analisados por teste de *t*. As médias foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$. Os dados foram apresentados graficamente em médias $\pm$ desvio-padrão.

4 PUBLICAÇÕES

Artigo 1

LQFM030 a small compound with a Nutlin-Like profile

Ricardo Menegatti^{a*}, Luciano Morais Lião^b, Flávio Silva de Carvalho^{a,b,f},
José Ricardo Sabino^c, Luiz Antônio Romeiro^{d,e}, Thais Rosa Marques dos Santos,
Mariana Flavia da Mota^f, Alane Pereira Cortez^f, Paulo Henrique Marcelino de Ávila^f,
Renato Ivan de Ávila^f, Sandro Antônio Gomes^g and Marize Campos Valadares^{f*}

^a*Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, CP 131, 74001-970 Goiânia/GO, Brazil*

^b*Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, CP 131, 74001-970 Goiânia/GO, Brazil*

^c*Laboratório de Cristalografia, Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, CP 131, 74001-970, Goiânia/GO, Brazil*

^d*LADETER, Universidade Católica de Brasília, QS 07 Lote 01 EPCT, zip code 71966-700, DF, Brazil.*

^e*Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Zip code 70910-900, Brasília, Brazil.*

^f*Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, CP 131, 74001-970 Goiânia/GO, Brazil*

^g*NEPET - Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, CP 131, 74001-970 Goiânia/GO, Brazil*

* Corresponding authors

Abstract

The present study report the design, synthesis, pharmacological/toxicological investigation of LQFM030 (**2**), a molecular simplification of the compound nutlin 1 (**1**). This work was carried out to evaluate the *in vivo* antitumor activity and apoptotic effects of LQFM030 (**2**) in Ehrlich ascites tumor (EAT)-bearing mice. Toxicity studies were also performed in mice exposed to LQFM030 (**2**). Treatment of EAT-bearing mice with LQFM030 (**2**) (at 50, 75 or 150mg/kg) resulted in a marked decline in cell proliferation and VEGF levels along with enhanced survival of the mice. The treatment also increased p53 and p21 along with increases in caspase-3, caspase-8 and caspase-9 activities, indicating the presence of apoptotic cell death. Because LQFM030 (**2**) abrogates EAT progression *in vivo*, we evaluated the acute oral toxicity of this compound. In this assay, LQFM030 (**2**) showed an acute lethal toxicity greater than 2000 mg/kg. Considering the low acute oral toxicity presented by LQFM030(**2**), this compound could be administered in combination with typical cytotoxic agents, reducing the toxicity burden while allowing the same or superior antitumor action. Moreover, these data might open a new route for a broader application of LQFM030(**2**) for antiangiogenic treatment of diseases involving overexpression of VEGF, such as macular degeneration.

Introduction

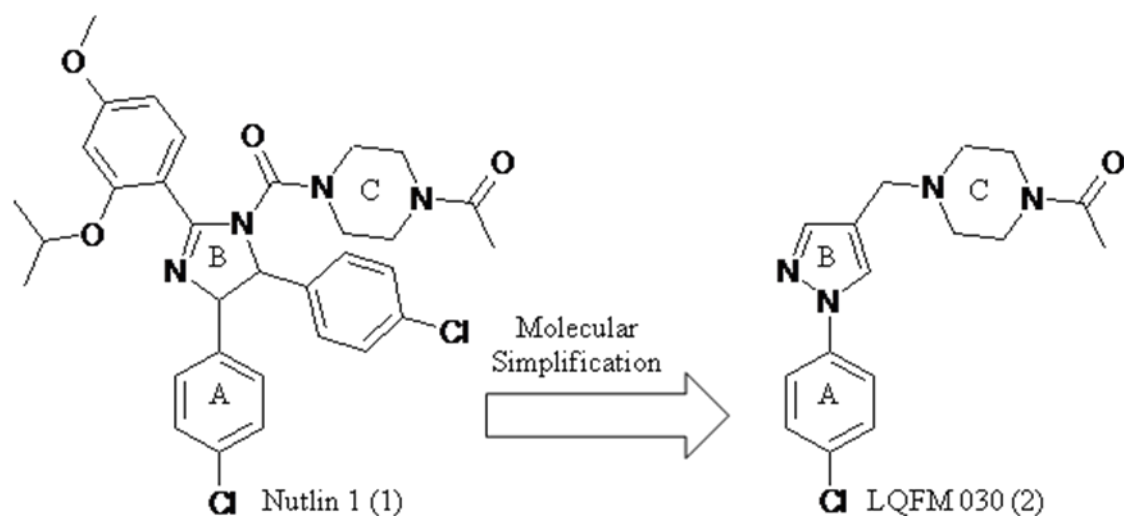
The tumor suppressor p53 coordinates a signal transduction network designed to combat oncogenic stress (Harris; Levine, 2005; Oren, 2003; Pei *et al.*, 2012). p53 modulates its transcriptional target p21, which triggers cell cycle arrest and cell death by apoptosis and is crucial for the prevention of tumor development as well as for the response to anticancer therapy (Vogelstein *et al.*, 2000). Therapeutic induction and/or stabilization of p53 are targets for development of new antitumor agents. Some of the antitumor activity of current chemotherapeutics is derived from interaction with p53. Recent work has shown that several new anticancer agents in development, such as nutlins, RITA (reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis) and PRIMA-1 (p53 Reactivation and Induction of Massive Apoptosis), induce apoptosis by multiple mechanisms that are, in general, dependent upon p53 activation (Manujendra *et al.*, 2013). These new compounds have been classified into two categories: those that aim at modulating the activity of wild-type p53 and those that aim at restoring wild-type functions in cell expressing mutant p53 (Shangary; Wang, 2009; Selivanova, 2010; Lane *et al.*, 2011; Wang; El-Deiry, 2008).

Nutlins, which are cis-imidazoline analogues, are non-genotoxic MDM2 antagonists that bind MDM2 in the p53-binding pocket, thus preventing p53 degradation (Vassilev *et al.*, 2004). In preclinical studies, nutlins elicited cytotoxic and apoptotic responses in tumor cells (including cell lines and patient samples) with little effect on normal CD34+ hematopoietic progenitor cells (Kojima *et al.*, 2005). More recently, it was demonstrated that nutlins induce cell cycle arrest and/or apoptosis independent of the p53 status of the cancer cells (wild type or mutant) (Wiman, 2010).

Treatment of hematological malignancies with nutlin increased the levels of p53 and of its transcriptional targets, MDM2 and p21, effectively triggering cell cycle arrest and/or apoptosis (Stuhmer *et al.*, 2005; Saha *et al.*, 2009; Kojima *et al.*, 2005; Kojima *et al.*, 2006; Kojima *et al.*, 2007; Secchiero *et al.*, 2006). In addition, nutlins can overcome drug resistance in chronic leukemia (Kojima *et al.*, 2006), synergize with genotoxic drugs (Coll-Mulet *et al.*, 2006, Mir *et al.*, 2013) and show anti-angiogenic activity (Secchiero *et al.*, 2007). In this regard, Patterson *et al.* (2011) demonstrated that nutlin-3a cooperatively inhibits tumor growth and angiogenesis in neuroblastomas *in vivo* by concomitantly targeting the VEGF and p53 pathways. Janouskova *et al.* (2013) demonstrated that nutlin-3a activates p53 and consequently inhibits the expression of $\alpha 5$ integrin in colon cancer cells. Moreover, Xiong *et al.* (2013) demonstrated that an MDM2 inhibitor suppresses VEGF expression *in vitro* and VEGF-mediated tumor angiogenesis in various human breast cancer models with different p53 statuses.

In the present study, we report the design, synthesis, and pharmacological and toxicological investigation of LQFM030 (**2**), a molecular simplification of the lead compound nutlin 1 (**1**) (Figure 1). Preliminary results from our group with LQFM030 (**2**) showed that it has antiproliferative effects against leukemic and carcinoma cells *in vitro*. The present work was carried out to evaluate the possible *in vivo* antitumor activity and apoptotic effects of LQFM030 (**2**) in Ehrlich ascites tumor-bearing mice. Furthermore, toxicity studies were also performed in mice exposed to LQFM030 (**2**).

Figure 1. Design of LQFM030 (2) from Nutlin (1)



Materials and Methods

A colorless needle-shaped single crystal of LQFM030 (2) with dimensions 0.075 x 0.16 x 0.47 mm was mounted on a Bruker Apex II Duo diffractometer, operating with Mo-K α radiation and room temperature. Data collection was performed using ϕ/ω scans of 0.5° steps and exposure times of 20 s. Data reduction was carried out using SAINT (Bruker, 2010) and SADABS (Bruker, 2010), employing the multi-scan absorption correction method. The structure solution was accomplished with the Direct Methods followed by refinement of structural parameters using F^2 with the full matrix least-squares method; both methods are implemented in the Shelx software package (Sheldrick, 2008). Non hydrogen atoms were refined with anisotropic atomic displacement parameters, and the hydrogen atoms were treated as isotropic and were allowed to ride on their parent atoms with $U_{eq} = 1.2 U_{eq}(C_{aromatic}, CH_2)$ and $1.5 U_{eq}(C_{methyl}, O_{water})$. Hydrogen atoms were located in calculated positions, and the hydrogen atoms of the structural water molecule were located in the Fourier difference map and restrained with O—H distance of 0.92 Å. Infrared (IR) spectra were obtained with a Nicolet-55a Magna spectrophotometer using potassium bromide plates. The assays were carried out using LC-ESI-MS/MS mass spectrometer equipped with electrospray ionization source in the positive mode, ESI (Agilent Technologies 1200 Series / Applied Biosystems MDS Sciex API 3200 Triple Quadrupole, MS/MS). The progress of all the reactions was monitored by thin-layer chromatography (TLC), which was performed on 2.0-6.0 cm aluminum sheets precoated with silica gel 7 60 (Merck) to a thickness of 0.25 mm. The developed chromatograms were viewed under ultraviolet light (254–265 nm) and treated with iodine vapor. For column chromatography, we used Merck

silica gel (70–230 mesh). Reagents and solvents were purchased from commercial suppliers.

CCDC number 963584 contains the supplementary crystallographic data for compound (2). These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html> or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ, UK; fax: (+44) 1223-336-033; or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.

1. Synthesis of 1-(4-((1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)ethanone (2)

To a 500 mL round-bottomed flask, 9.67 mmol of 1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazole-4-carbaldehyde (6), 10.64mmol of acethylpiperazine (7), 100 mg of Pd/C 10%, 70 mL of methanol and 60 psi of H₂ were added. The reaction was carried out with stirring for 2 h. At the end of the reaction, the resulting solution was filtered off under vacuum. Compound (2) was obtained as a beige solid; the quantitative yield wasmp92°C, Rf=0.56 (CH₂Cl₂:MeOH - 95:5). IR cm⁻¹:3010, 2947, 1639 and 830¹HNMR: (500 MHz, CDCl₃)δ 7.83 (d, *J* = 0.6 Hz, H-5), 7.64 (d, *J* = 0.6 Hz, H-3), 7.62 (dd, *J*=9.8, 2.2 Hz, H-2'), 7.62 (dd, *J* = 9.0, 2.2 Hz, H-6'), 7.41 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, H-3'), 7.41 (dd, *J* = 9.0, 2.9 Hz, H-5'), 3.63 (dd, *J*=6.0, 4.0 Hz, H-11), 3.50 (s, H-6), 3.47 (dd, *J* = 6.0, 4.0 Hz, H-9), 2.47 (dd, *J* = 6.0, 4.0 Hz, H-12) and 2.45 (dd, *J* = 6.0, 4.0 Hz, H-8) ppm. ¹³CNMR (125 MHz, CDCl₃) δ 168.8 (C-13), 141.9 (C-3), 138.6 (C-1'), 131.9 (C-4'), 129.6 (C-3'/C-5'), 126.4 (C-5), 119.9 (C-2'/C-6'), 119.6 (C-4), 52.7 (C-12), 52.3 (C-8), 52.2 (C-6), 46.2 (C-9), 41.5 (C-11) and 21.3 (C-14) ppm.LC-MS with electrospray ionization: *m/z* 319.16 [M+H]⁺.

2. Animals

Male Swiss albino mice (25 - 30 g) were obtained from Indústria Química do Estado de Goiás (IQUEGO). All the animals were kept under constant ambient conditions with a 12 h/12 h light-dark cycle and temperature of 23 ± 2 °C, fed with standard granulated chow, and given drinking water *ad libitum*. The animal experiments were carried out in accordance with the Institutional Protocols of Animal Care. The experimental protocol (CEUA - PRPPG/UFG n. 018/12) was approved by the Institutional Ethic Committee of our university.

3. LQFM030 (2) treatment

Erhlich ascites tumors (EAT) were maintained in the peritoneum of the mice in the ascites form by serial weekly passage. Exponentially growing EAT cells were harvested, washed, and resuspended in PBS, and 1×10^7 cells/mL were injected intraperitoneally into each mice. The emulsion was prepared as follows: to 5 mg/mL of LQFM030 (2) was added 100 μ L of sunflower oil, 100 μ g of soy phosphatidylcholine and 50 μ L of ethanol. The mixture was vortexed for 3 min, and the final volume was completed with ultrapure water. For the control group, the emulsion was prepared without LQFM030 (2).

The animals were randomly divided into five groups containing six animals per group. All animals were weighted and received, after 24 h, 0.1 mL of the vehicle (EAT control group) or LQFM030 at 50, 75 or 150 mg/kg; one group was not inoculated with EAT and received 0.1 mL of PBS (normal mice). Animals were treated for 10 days and weighed every two days to ensure tumor growth and permit recalculation of doses.

4. *In vivo* antitumor activity of LQFM030(2)

The antitumor activity of LQFM030 (2) was determined by changes in ascites tumor volume, body weight, viable tumor cell count, and angiogenesis. To determine whether the compound inhibited tumor growth and angiogenesis, animals were euthanized by cervical dislocation 24 h after the last day of treatment, and the body weights of the animals before tumor implantation and before euthanasia were recorded. Tumor volume was determined by the difference in body weight between tumor implantation and the last day of treatment. Tumors (ascites fluid) were removed with a sterile syringe, and the volume of ascites obtained from control and treated animals was noted. The harvested cells were resuspended in PBS, collected in sterile Petri dishes, and incubated at 37 °C for 2h. The cells of macrophage lineage adhered to the bottom of the Petri dishes to form a confluent monolayer. The non-adherent population was gently aspirated out, washed with PBS, and counted using a hemocytometer and the trypan blue dye exclusion method. The euthanized animals were dissected to observe the effect of the treatment on peritoneal angiogenesis and photographed.

5. VEGF-ELISA

The level of VEGF secreted by EAT cells into the peritoneal ascites was measured by ELISA (R&D systems, USA), following the manufacturer's instructions. In brief, to a 96-well microplate pre-coated with a polyclonal antibody specific for mouse VEGF, 50 µL assay diluent and 50 µL ascites from control or treated mice were added. Recombinant mouse VEGF was used to set up the standard curve. After incubation for 2 h at room temperature, the wells were washed and polyclonal anti-mouse VEGF antibodies conjugated to horseradish peroxidase were

added. Incubation was continued for 2 h and plates were washed; substrate solution was added to each well and incubated for 30 min. The enzyme reaction yielded a blue product that turns yellow when the stop solution is added. The O.D. at 450 nm (correction wavelength set at 540 nm) was measured using a microplate reader (Awareness Technology, Germany).

6. Hematological and biochemical analysis of mice blood

Before euthanasia, the animals were anesthetized by subcutaneous administration of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Blood samples (1 mL) were collected by cardiac puncture using an insulin syringe without EDTA and were separated into two vials, one containing EDTA to perform a complete blood count and another to separate the serum for *post hoc* biochemical analysis. The hematological test was performed in a hemocytometer (Horiba ABX, France) calibrated for mice. Serum was separated by incubation at 37 °C and centrifugation at 3000 rpm for 10 min and placed at – 20 °C until analysis. Biochemical analyses were performed using Labtestdiagnóstica kits (Lagoa Santa, Brazil) in Labmax 240 equipment (Labtestdiagnóstica, Brazil).

7. Flow cytometric analysis of p53 and p21 proteins

For this test, we used cells collected from EAT animals treated with control and 150 mg/kg LQFM030 (2) immediately after collection. EAT cells (1×10^6) were washed with PBS, suspended in 0.25 mL of a fixation and permeabilization solution (cytofix/cytoperm) and incubated for 20 min at 4 °C. After incubation, cells were washed twice in PBS-T20 and incubated with a specific antibody (anti-p53 or anti-p21) for 15 min at room temperature. After that, cells were washed in PBS-T20. A

total of 10,000 events were acquired for analysis using FacsDiva software, and histograms of FITC or PE-fluorescence (x-axis) versus counts (y-axis) were plotted according to the logarithm of the fluorescence intensity.

8. Flow cytometric analysis of the activities of caspases 3, 8, and 9

The activities of caspases 3, 8, and 9 were measured using the CaspaTagCaspasein situ assay Fluorescein kit, following the manufacturer's instructions. Cells were washed with PBS at 1500 rpm for 10 min and incubated with antibodies against caspase 3, 8 or 9 for 1 h at 37°C. After incubation, cells were washed twice in PBS and resuspended in the buffer provided in the kit. A total of 10,000 events were acquired for analysis using FacsDiva software, and a histogram of FITC-fluorescence (x-axis) versus counts (y-axis) was plotted according to the logarithm of the fluorescence intensity

9. Acute oral toxicity of LQFM030 (2)

The evaluation of acute oral toxicity was performed as recommended in OECD 423 "Acute Oral Toxicity Class", 2001. The initial dose selected for LQFM030 (2) (300 mg/kg) was chosen based on data obtained from an *in vitro* test of the incorporation of neutral red into 3T3 basal cells (data not shown). A dose of 2000 mg/kg was also investigated. As recommended by the guidelines, the compound was prepared in an edible vegetable oil (sunflower oil) and the volume of 0.2 mL administered orally (by gavage) to female Swiss mice. This dose was tested twice, and we used the results to estimate the toxicology of the extract according to the specifications of the guide. The animals were restricted to the feed for 2 hours before

dosing. During the experimental period the animals were observed continuously for 12 hours and then observed daily for any change in general behavior or physiological activities. The animals were weighed and evaluated by the Hippocratic screening method, which assesses the effects of the compound on the consciousness, disposal, activity and coordination of the motor system and muscle tone, and activity of the autonomic and central nervous system of the animal (Its parameters include irritability, touch response, response to the tightening of tail, twisting, hindquarters position, righting reflex, power grab, headset reflex, corneal reflex, tremors, straub, anesthesia, lacrimation, ptosis eyelid, piloerection, cyanosis and death).For histological evaluation, routine processes were employed for paraffin inclusion, sectioning and hematoxylin–eosin staining of liver and kidney from mice treated with LQFM030 (2) or vehicle. A histopathologist performed a complete examination of the tissues.

10. Statistical analysis

All data expressed as the means $\pm$ SD are representative of at least two different experiments. For comparisons between multiple groups, we used one-way ANOVA and a posteriori Newman-Keuls Multiple Comparison Test, and for comparisons between two groups, we used a t-test with the GraphPad Prism program (version 5.00 for Windows 98, Graph Pad Software, San Diego, California), where $p < 0.05$ was considered significant.

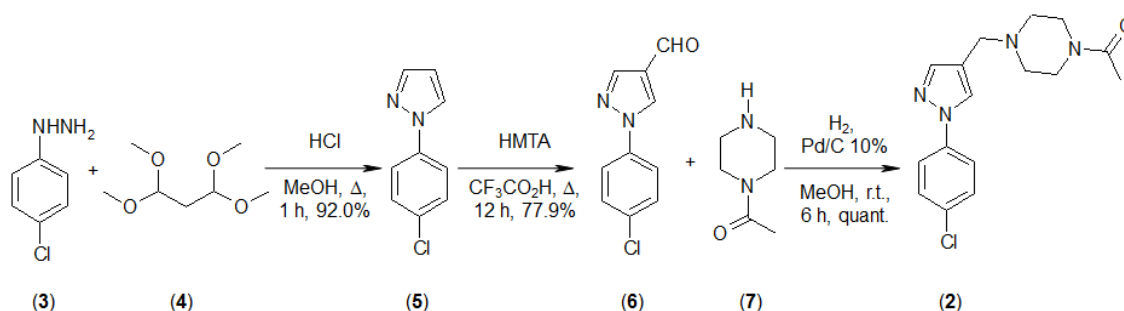
RESULTS

1. LQFM030 synthesis

LQFM030 (**2**) was produced via the synthetic route shown in Figure 2, beginning with synthesis of the 1-(4-chlorophenyl)-1*H*-pyrazole (**5**) compound using the classical method described by Finar and Godfrey (Finar and Godfrey, 1954), with a yield of 92.0%. On the other hand, the 1-(4-chlorophenyl)-1*H*-pyrazole-4-carbaldehyde (**6**) compound was produced (with a yield of 77.9%) via chemospecific and regiospecific formylation of 1-(4-chlorophenyl)-1*H*-pyrazole (**5**), which was performed under Duff's conditions (de Oliveira *et al.*, 2013). In the last step, LQFM030 (**2**) was obtained under catalytic hydrogenation conditions with a quantitative yield. After three steps, LQFM030 (**2**) was produced with a global yield of 71.6%, which was higher than that of the compound nutlin 1 (**1**), which was produced with a global yield of 6.4% in eight synthetic steps (Fry *et al.*, 2004).

The structure of the compounds were investigated and confirmed by infrared and NMR spectroscopy, combining the ¹H, HSQC and HMBC correlation spectra, as well as mass spectrometry. The structure of LQFM030 (**2**) was also determined using X-ray diffraction as illustrated in Figure 3.

Figure 2. Synthetic route of LQFM030 (**2**)



2. X-ray Analysis

An Ortep representation of LQFM030 (**2**) is given in Figure 3 and shows a staggered conformation in which the chlorophenyl ring is at a dihedral angle of $10.5(1)^\circ$ to the pyrazol ring. The C4 atom is located $0.133(3)$ Å from the best plane of the pyrazol. The piperazine presents a chair conformation with the best plane (of r.m.s. of 0.004 Å) of the carbon atoms C5/C6/C7/C8 rotated $70.14(7)^\circ$ from the pyrazol plane. The N4 atom has sp^3 hybridization, while the N3atom is sp^2 , with a N3—C9 bond distance of $1.345(3)$ Å, while the other N—C bond lengths vary from $1.459(2)$ Å to $1.473(2)$ Å. As a consequence of the N3 sp^3 hybridization, the formyl group C9/C10/O1 is in a plane (r.m.s. 0.005 Å) with the atoms C6/N3/C8.

Notably, LQFM030 (**2**) was obtained as a monohydrate chiral crystalline solid, indicating that the present conformation is stable under normal conditions and showing the strong affinity of the piperazine N atom for a proton donor. The water molecule participates in two strong hydrogen bonds with (I). As suggested by the short donor acceptor (DA) distance of $2.917(2)$ Å and the linearity of the O2—H...N4 H-bond with an angle of $169(3)^\circ$, this water molecule connects neighbor molecules (symmetry operation i: $x-1/2, -y+1/2, -z+1$) with a H-bond of type O2—H...O1ⁱ, a DA distance of $2.816(2)$ Å, and a OHO angle of $171(2)^\circ$ (Table 1).

Figure 3. Ortep representation of (2) with atomic displacement parameters drawn at 30% of probability level. Hydrogen are represented by spheres of arbitrary radii.

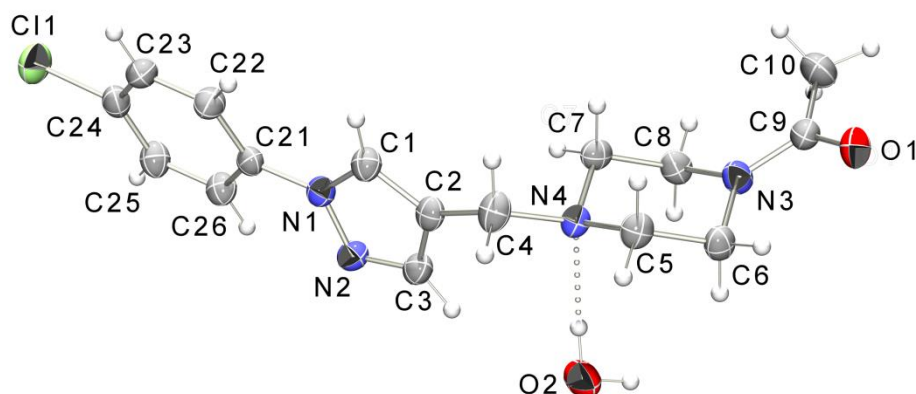


Table 1. Data collection and refinement statistics.

LQFM-030 (2)	
Data collection	
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions a, b, c (Å)	6.0320(8), 8.9792(13), 31.306(5)
Resolution (Å) / θ interval (°)	0.8 / 1.30 to 26.28
$R_{\text{sym}} / R_{\text{int}}$	0.022 / 0.017
$I / \sigma I$	1.86
Completeness (%)	99.7
Redundancy	4.36
Refinement	
Resolution (Å)	0.8
No. reflections Total / I $> 2\sigma I$	12724 / 3406
$R1 / wR2$ (all data)	0.044 / 0.087
No. parameters/restraints	217 / 3
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.003
Bond angles (°)	0.20

3. Effects of LQFM030 (2) treatment in Ehrlich ascites tumor -bearing mice

When injected intraperitoneally into mice, Ehrlich ascites tumors grow as ascitic tumors with accumulations of large volumes of ascitic fluid in the peritoneal cavity. The effects of LQFM030 (2) on the proliferation and viability of tumor cells from EAT-bearing mice were evaluated after 10 days of treatment using the trypan blue exclusion method. Treatment of EAT-bearing mice with 50, 75 or 150mg/kg of LQFM030 (2) resulted in a marked, dose-dependent decline in EAT cell proliferation in the peritoneum (Figure 4B). The 50, 75 and 150 mg/kg doses decreased cell viability by 39.4, 42.1 and 55.4%, respectively. Moreover, as shown in Figures 4 A, C, and D, the administration of LQFM030 (2) resulted in dose-dependent inhibition of tumor growth, represented by reductions in the body weights and volumes of ascites, when compared to the untreated group. Treatment with the 150 mg/kg/day dose produced a 54.67% reduction in intraperitoneal tumor cell burden (Figure 4D). In addition, hematological alterations induced by the tumors in these animals were partially reversed by the treatment. Similar results were observed for the serum biochemical parameters in EAT-bearing mice treated with LQFM030 (2) (Tables 2 and 3).

With respect to the antiangiogenic activity of LQFM030 (2), the treatment with 150mg/kg resulted in a biological tendency towards a reduction in VEGF levels in the peritoneal washing supernatant; however, no statistical significance was detected. On the other hand, in the analysis of the vascular pattern of the peritoneal wall, morphological changes were observed (Figure 5). Untreated mice showed tortuous dilated and congested vessels compared to normal mice (Figure 5A). After treatment with 150/mg/kg/day of LQFM030 (2), the capillaries were markedly reduced in diameter and appeared similar to those in the normal group.

In this study, the effect of LQFM030 (**2**) on the survival time of EAT-bearing mice was evaluated. Untreated tumor-bearing mice died within 20 days. On the other hand, treatment with LQFM030 (**2**) significantly enhanced the survival rate to 25 days ($P<0.05$) (Figure 6).

Figure 4. Effects of LQFM030 in tumorgrowth, tumor cell viability, and in ascitic fluid of mice. A: Characteristics of mice body weight on the day of sacrifice. B: Number of viable cells, counted by the trypan blue exclusion method, on the day of sacrifice. C: Difference between body weight of the mice on the day of tumor injection and the day of sacrifice. D: Difference between ascites volume of the mice on the day of tumor injection and the day of sacrifice. (* $p<0.05$ compared to control).

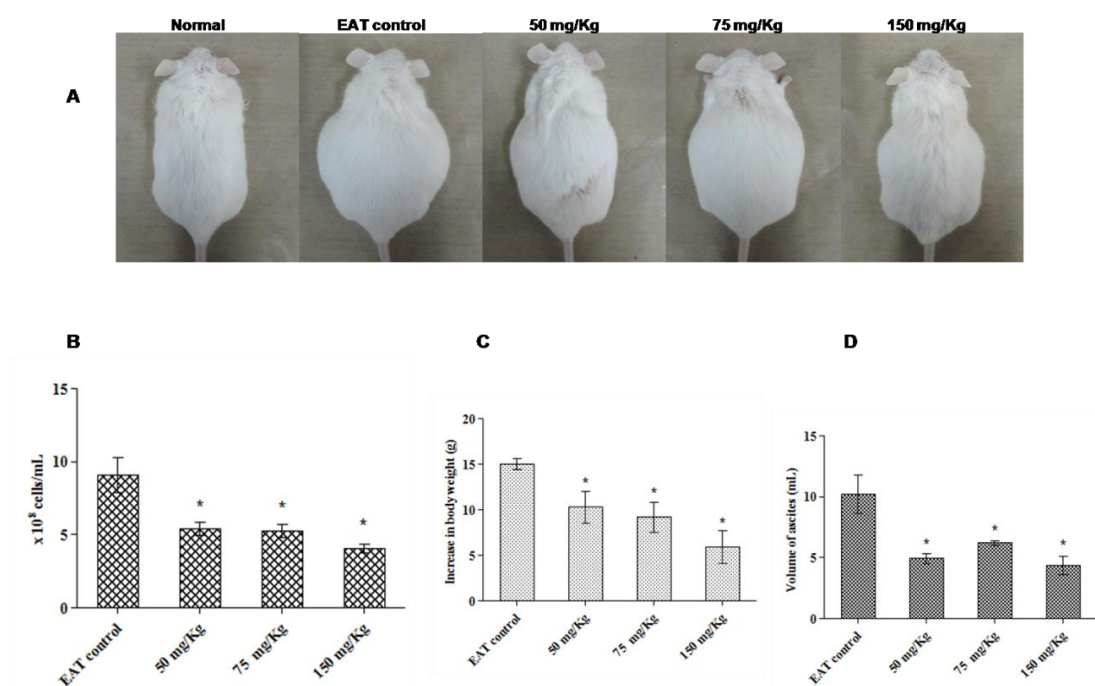


Table 2. Hematological parameters of Ehrlich ascites tumor-bearing mice before and after LQFM030 treatment.

Group of animals	Normal Mice	EAT Control	50 mg/Kg	75 mg/Kg	150 mg/Kg
Leukocytes ($10^3/\text{mm}^3$)	4.8±0.6	13.8±2.6 [*]	10.6±3.2 [*]	11.7±4.0 [*]	11.1±4.4 [*]
Erythrocytes ($10^6/\text{mm}^3$)	8.2±0.08	7.4±0.7	7.1±1.2	6.4±1.6	5.0±2.5 ^{ab}
Hemoglobin (g/dL)	11.2±0.6	9.6±1.2	9.4±1.8	9.4±1.6	8.2±3.1
Hematocrit (%)	20.1±1.4	17.6±1.8	18.2±3.2	17.5±2.7	19.0±2.6
Platelets ($10^3/\text{mm}^3$)	714.2±3.4	1140.0±84.5 [*]	816.6±23.4 [#]	748.5±68.5 [#]	739.1±83.5 [#]
Packed cell volume (μm^3)	98.6±2.4	96.5±3.9	99.1±5.5	97.7±5.0	98.0±7.2
Lymphocyte (%)	68.7±6.9	44.6±8.0 [*]	37.6±8.5 [*]	45.1±11.4 [*]	47.2±12.0 [*]
Monocyte (%)	14.0±1.8	32.7±6.4 [*]	29.4±3.0 [*]	29.5±7.1 [*]	33.0±5.7 [*]
Granulocyte (%)	16.6±1.5	28.2±2.7 [*]	33.6±1.5 ^{ab}	26.5±2.0 ^{ab}	23.5±3.6 ^{ab}
Lymphocyte ($10^3/\text{mm}^3$)	3.1±0.1	5.5±1.0 [*]	4.3±0.3	3.5±0.6 [#]	6.4±1.7 ^{ab}
Monocyte ($10^3/\text{mm}^3$)	0.6±0.1	2.5±0.3 [*]	4.3±0.4 [*]	1.6±0.3 ^{ab}	4.0±1.3 ^{ab}
Granulocyte ($10^3/\text{mm}^3$)	0.5±0.2	3.3±0.4 [*]	2.6±0.5 [*]	2.3±0.5 [*]	2.5±0.1 [*]

p values were generated by ANOVA and Newman-Keuls Multiple Comparison Test *a posteriori*. ^{*}*p* < 0.05 vs normal mice; [#]*p* < 0.05 vs EAT control; ^a*p* < 0.05 vs 50 mg/Kg; ^b*p* < 0.05 vs 75 mg/Kg.

Table 3. Effect of LQFM030 on serum biochemical parameters of mice.

Group of animals	Normal Mice	EAT Control	50 mg/Kg	75 mg/Kg	150 mg/Kg
ALT/TGP (U/L)	35.4±8.1	33.5±8.4	32.1±8.9	24.1±2.3	31.0±3.6
AST/TGO (U/L)	136.7±5.8	506.0±2	446.3±25.	233.6±25.	302.3±76.0
		5.6*	8*	5* ^a	* [#] ab
LDH (U/L)	1515.0±1	1628.0±	4505.0±4	2010.0±5	4478.0±62.
	63.3	334.5	83.5* [#]	55.7* ^a	2* [#] b
CPK (U/L)	172.0±21.	342.3±3	283.0±21.	175.3±10.	351.5±12.0
	9	6.7*	2* [#]	6* ^a	* ^{ab}
Creatinine (mg/dL)	0.37±0.05	0.39±0.0	0.38±0.06	0.38±0.0	0.34±0.05
		3			
Urea (mg/dL)	48.6±5.0	49.0±5.7	46.2±7.9	40.7±4.0	41.2±5.8
Glucose (mg/dL)	192.0±11.	179.3±3	139.0±14.	153.5±20.	183.7±29.1
	8	8.5	8*	5	
Total protein (g/dL)	5.4±0.3	4.7±0.1*	4.4±0.2*	4.4±0.1*	4.3±0.2*
Albumin (g/dL)	2.1±0.3	1.7±0.1*	1.6±0.1*	1.6±0.1*	1.7±0.2*
Direct bilirubin (mg/dL)	0.06±0.02	0.06±0.0	0.05±0.01	0.04±0.0	0.06±0.01
		2			
Total bilirubin (mg/dL)	0.12±0.01	0.17±0.0	0.15±0.05	0.09±0.0	0.2±0.02* ^{ab}
		6			
Total cholesterol (mg/dL)	111.3±3.8	158.3±1	132.5±11	146.0±4.2	122.5±17.6
		3.7*	3.0 [#]	*	#

p values were generated by ANOVA and Newman-Keuls Multiple Comparison Test *a posteriori*. **p* < 0.05 vs normal mice; [#] *p* < 0.05 vs EAT control; ^a *p* < 0.05 vs 50 mg/Kg; ^b *p* < 0.05 vs 75 mg/Kg.

Figure 5. LQFM030 inhibits tumor angiogenesis. A: Effects of LQFM030 in peritoneal angiogenesis. B: Effects of LQFM030 in VEGF production. VEGF was quantified by ELISA.

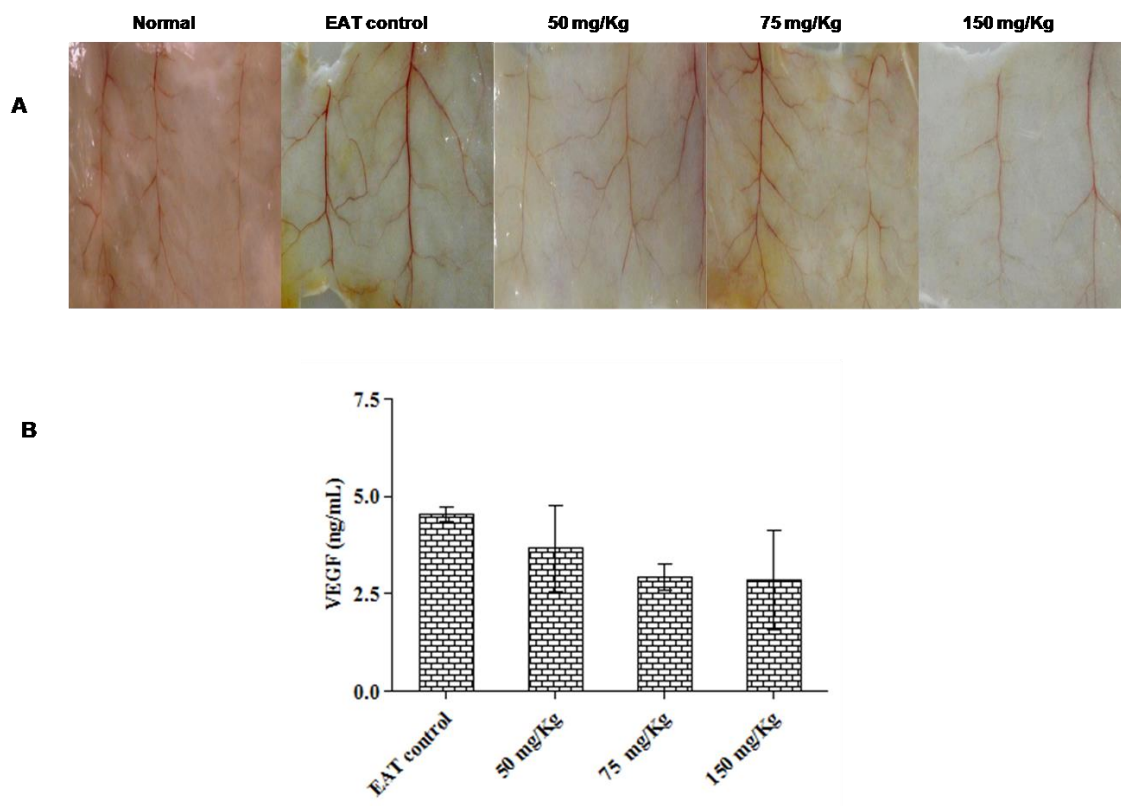
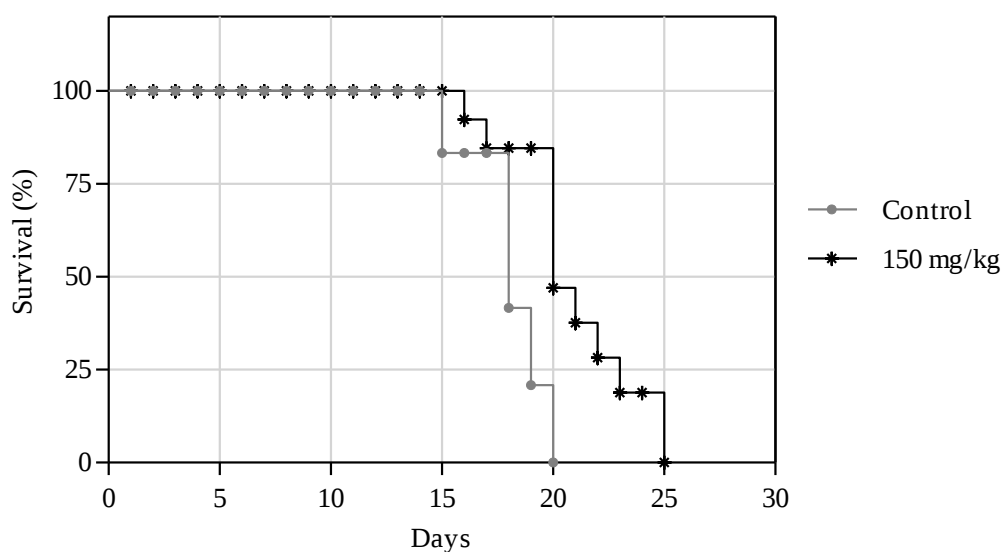


Figure 6. Effect of compound LQFM030 in the survival of animals bearing Ehrlich ascites tumor (EAT) after 10 days of treatment at a dose of 150mg/kg compared to the control group. $P < 0.05$ compared to group control.



4. Apoptosis induction in LQFM030 (2)-treated mice

The effects of LQFM030 (2) on the expression levels of p53 and p21 were investigated in EAT cells from mice treated with 150 mg/kg of the compound. The treatment resulted in a 3.5-fold increase in p53 protein levels and an increase of 2.0-fold in p21 protein levels (Figures 7 and 8). Because caspases are important in the apoptotic process modulated by p53, the roles of caspase-3, caspase-8 and caspase-9 in LQFM030 (2)-induced EAT cell death were evaluated. EAT cells from mice treated with 150 mg/kg increased the activities of all caspases examined compared to the control cells ($P < 0.01$) (Figures 9-11). Treatment of EAT-bearing mice resulted in 1.8, 1.3 and 1.7-fold increases in caspase-3, caspase-8 and caspase-9 activities, respectively ($P < 0.01$).

Figure 7. Effect of LQFM030 on p53 expression. The activity of p53 was determined by flow cytometry. (A) cells from EAT control (B) cells from animals treated with 150 mg/kg LQFM030 for 10 days. (C) Comparison of fluorescence intensity of PE between cells from untreated and LQFM030-treated animals(* $p < 0.05$ compared to control).

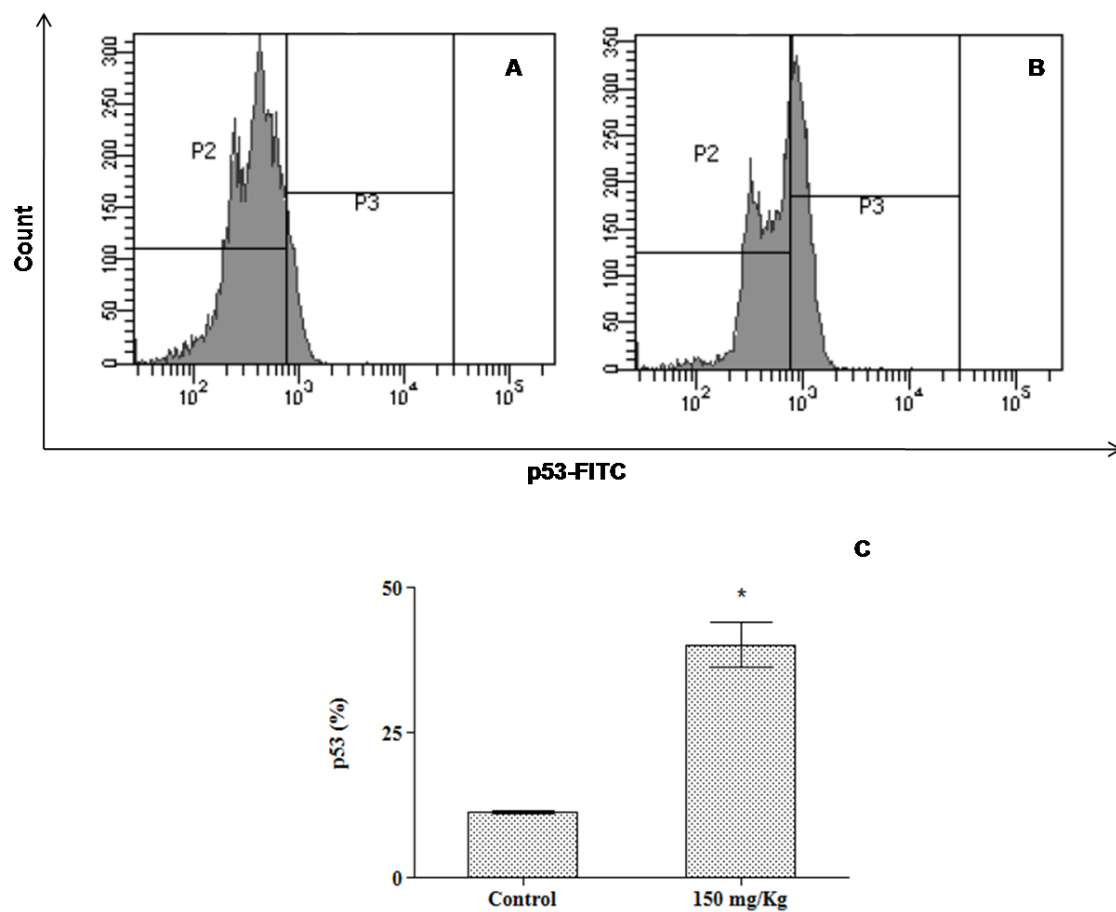


Figure 8. Effect of LQFM030 on p21 expression. The expression of p21 was determined by flow cytometry.(A) cells from EAT control (B) cells from animals treated with 150 mg/kg LQFM030 for 10 days. (C) Comparison of fluorescence intensity of PE between cells from untreated and LQFM030-treated animals(* $p < 0.05$ compared to control).

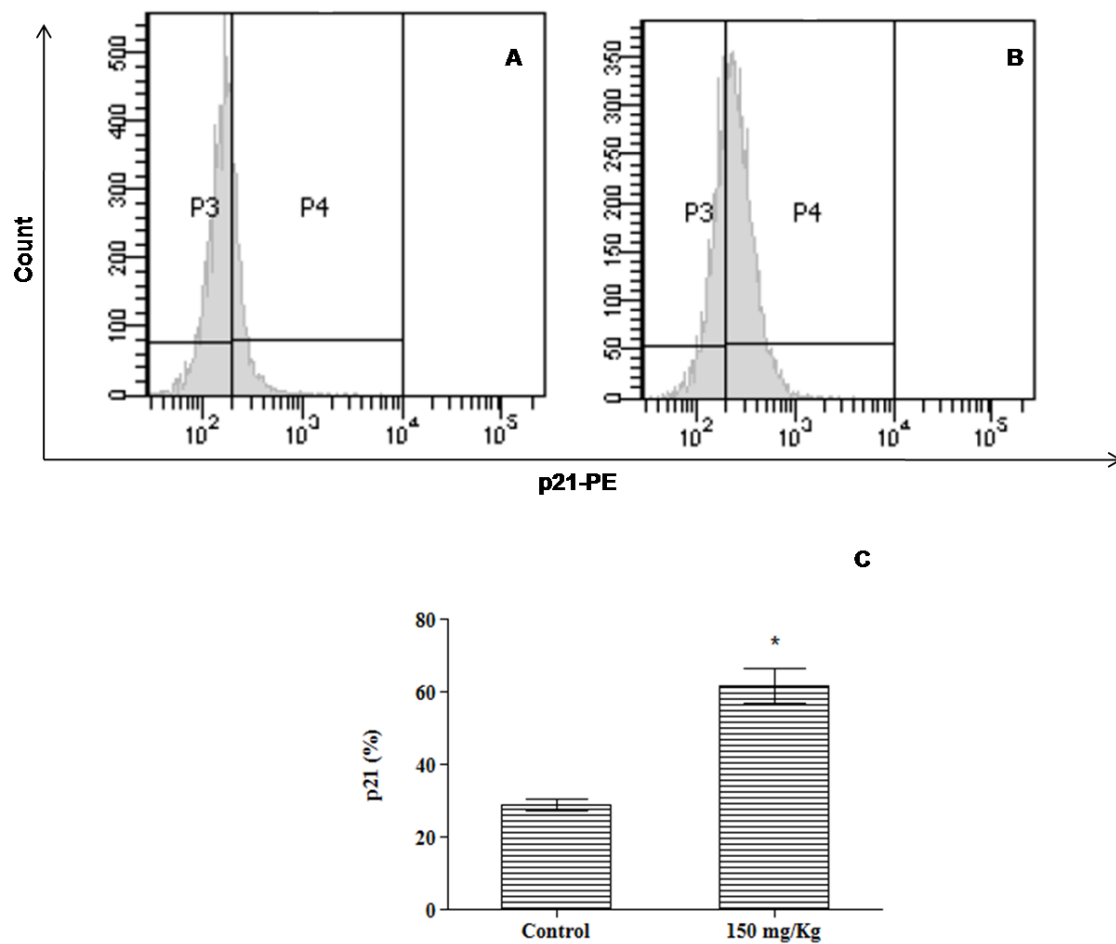


Figure 9. LQFM030 induced activation of caspase 3. The activity of caspase 3 was determined by flow cytometry.(A) cells from EAT control (B) cells from animals treated with 150 mg/kg LQFM030 for 10 days. (C) Comparison of fluorescence intensity of FITC between cells from untreated and LQFM030-treated animals(* $p < 0.05$ compared to control).

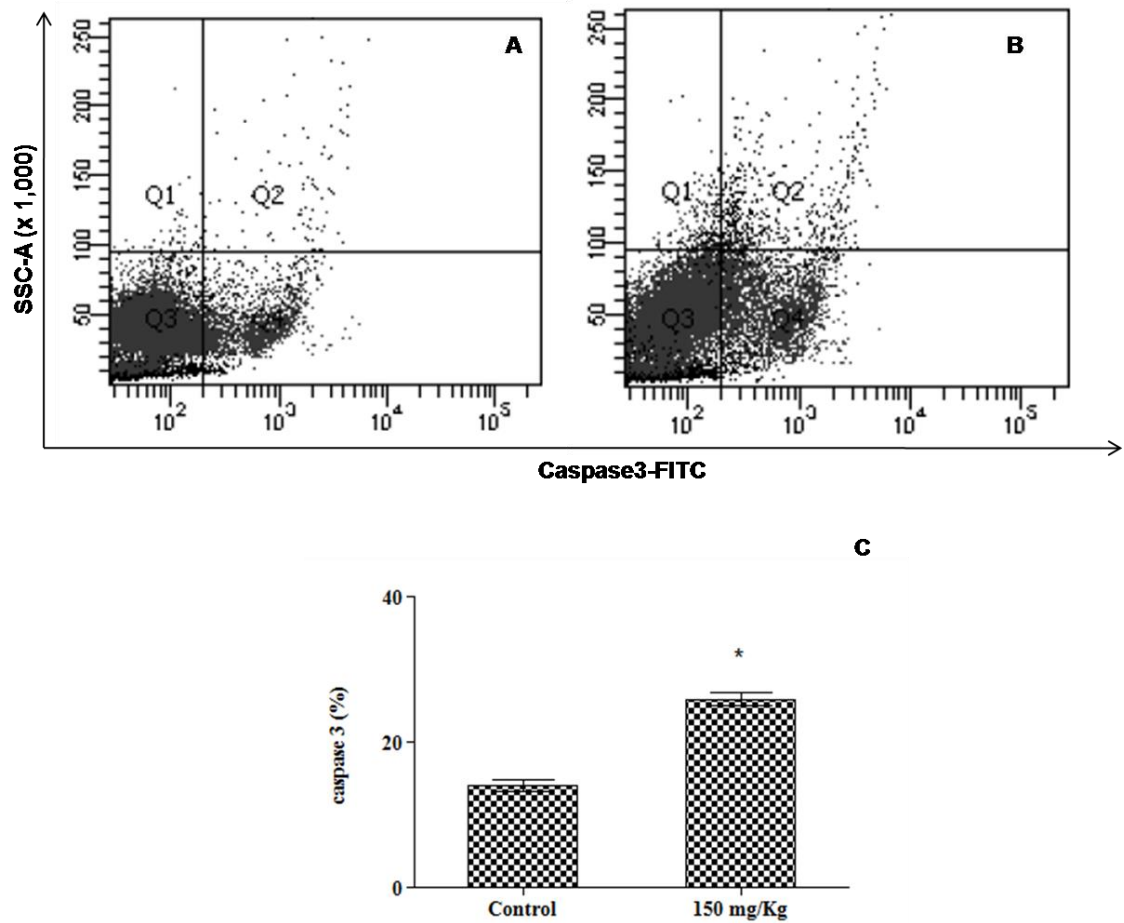


Figure 10. LQFM030 induced activation of caspase 8. The activity of caspase 8 was determined by flow cytometry.(A) cells from EAT control (B) cells from animals treated with 150 mg/kg LQFM030 for 10 days. (C) Comparison of fluorescence intensity of FITC between cells from untreated and LQFM030-treated animals(* $p < 0.05$ compared to control).

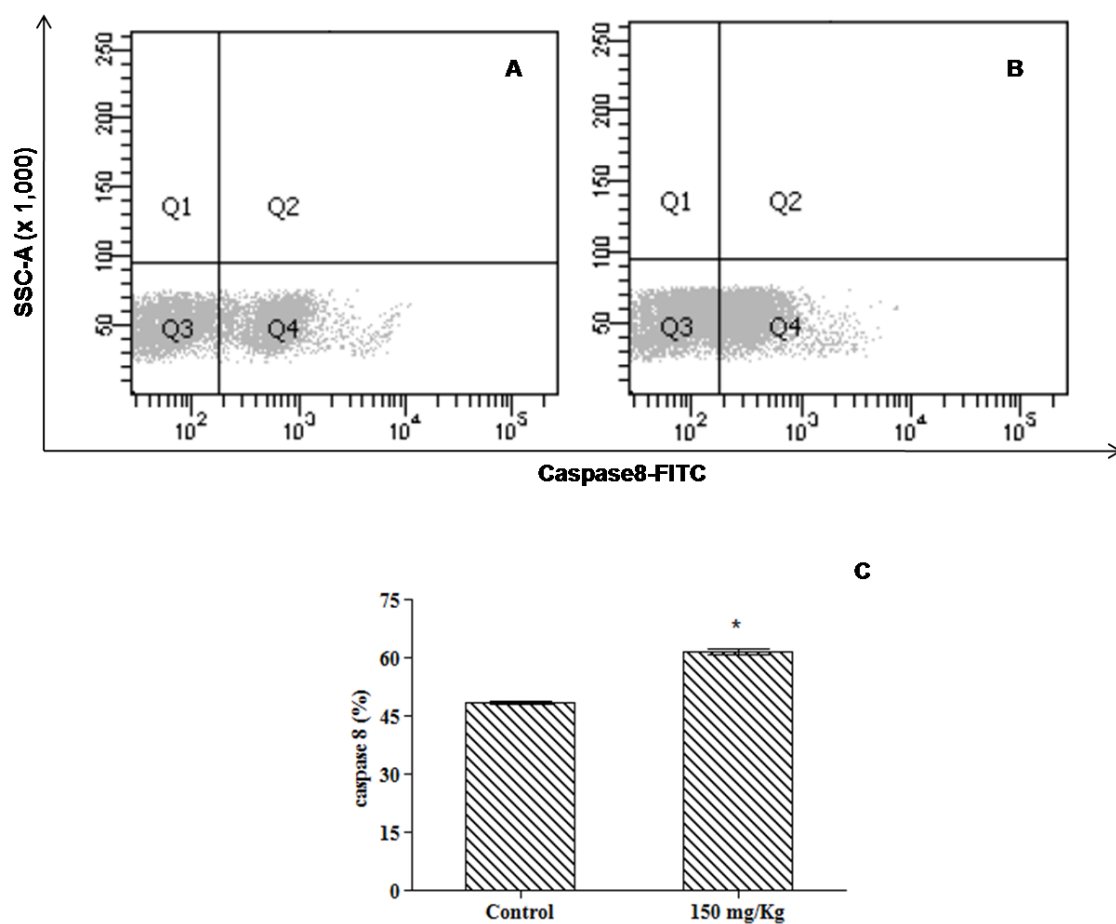
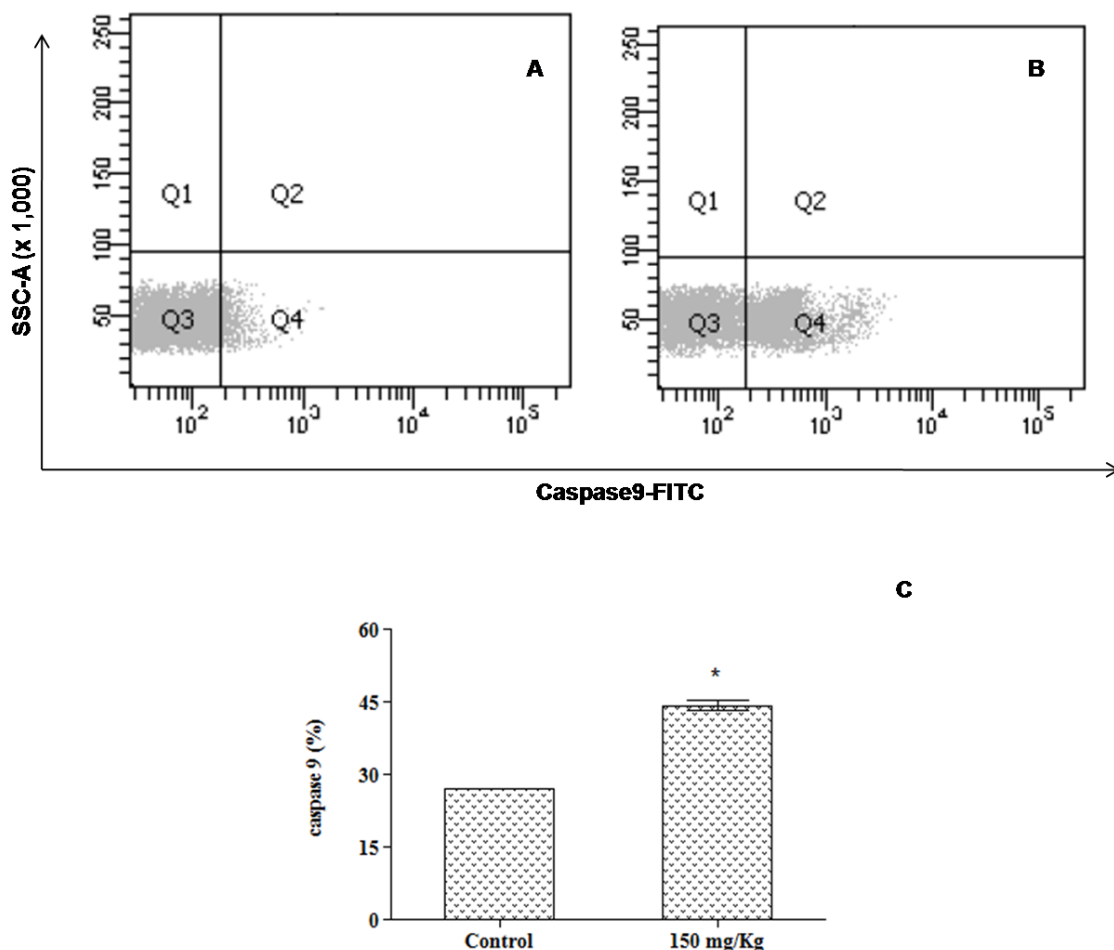


Figure 11. LQFM030 induced activation of caspase 9. The activity of caspase 9 was determined by flow cytometry.(A) cells from EAT control (B) cells from animals treated with 150 mg/kg LQFM030 for 10 days. (C) Comparison of fluorescence intensity of FITC between cells from untreated and LQFM030-treated animals(* $p < 0.05$ compared to control).

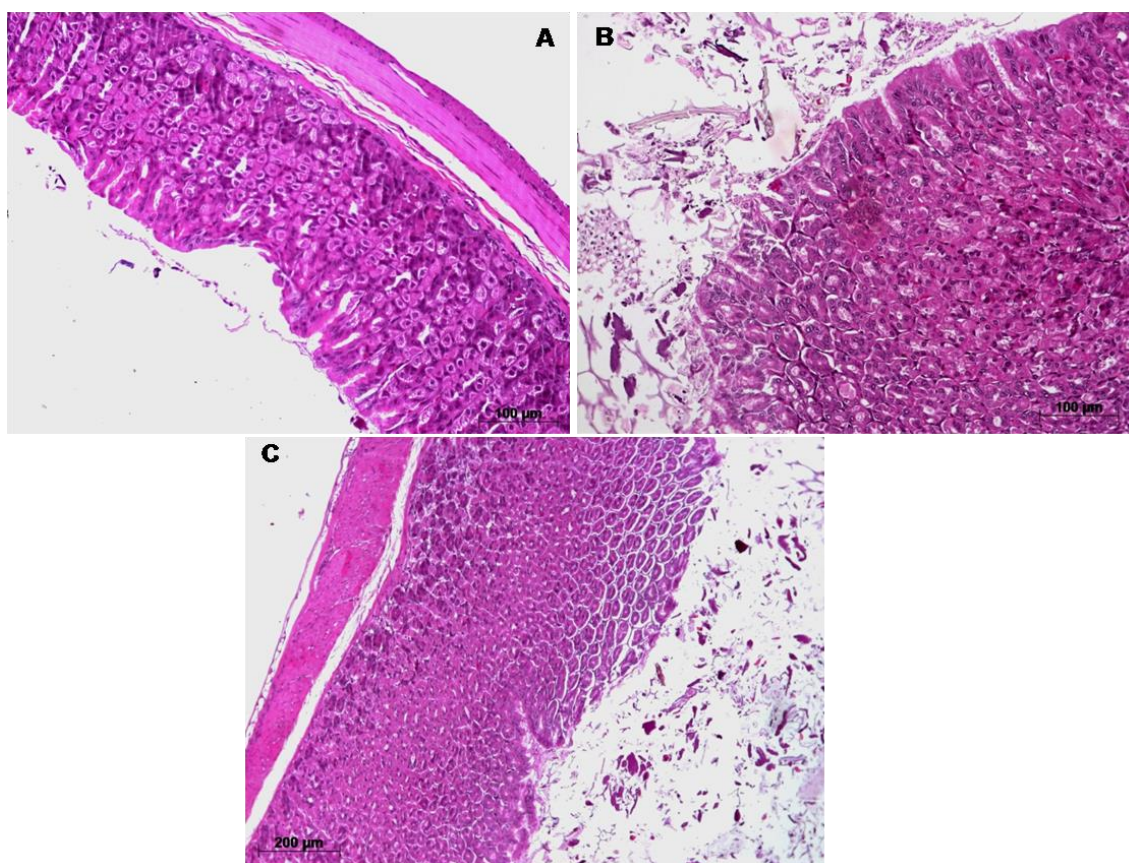


5. *In vivo* toxicity studies

In view of the positive effect of LQFM030 (**2**) in preventing cancer progression *in vivo*, we evaluated the acute oral toxicity of this compound using the OECD 423 protocol. The initial doses selected for LQFM030 (**2**) were 300 mg/kg followed by 2000 mg/kg and were based on data obtained in *in vitro* tests of the incorporation of neutral red into 3T3 basal cells (data not shown). Exposure of the animals to 2000mg/kg for two hours elicited piloerection; however, in the next 14 days, no other signs of abnormality were observed until euthanasia of

animals. LQFM030 (2) was categorized as “Class 5” in the Global Harmonized System (GHS), i.e., acute lethal toxicity greater than 2000 mg/kg. There were no significant differences in body weight and organs, such as liver and spleen, after LQFM030 (2) treatment (data not shown). At necropsy, no visible pathological changes were noted in the livers and kidneys of mice given LQFM030 (2) at 300mg/kg or 2000mg/kg. Histological analysis of formaldehyde-fixed, paraffin-embedded liver, kidney, spleen, heart and lung sections stained with hematoxylin and eosin showed normal architecture in all experimental groups. However, the stomachs of animals given various doses of LQFM030 (2) showed atypical architectures, with signs of hyperplasia (Figure 12).

Figure 12. Histopathology of the stomach in the control group and groups treated with doses of 300 and 2000 mg/kg. A: Control (20 x) B: 300 mg / kg (20x) C: 2000 mg / kg (10x). In B and C it can be seen breakdown of the gastric pits and signs of hyperplasia. Histological sections stained with HE.



DISCUSSION

In the present work, the synthesis, characterization, pharmacological and toxicological evaluations of LQFM030 (2) compound were performed. This compound resulted from molecular simplification of the lead compound Nutlin 1 (1), where the subunits A, B and C of the Nutlin 1 (1) were preserved in LQFM030 (2) and, additionally, the chiral centers were removed, becoming the synthesis easier and cheaper.

Ehrlich ascites tumor is a spontaneous mammary carcinoma tumor, with a very aggressive behavior, which has been successfully transplanted in nearly all known mouse strains for the screening of potential anticancer drugs. After intraperitoneal (i.p.) inoculation, EAT readily grows in ascitic form and the survival time of mice is associated with the number of tumor cells in the peritoneum. In this context, treatment of EAT – bearing mice with (50, 75 or 150 mg/kg) resulted in a marked decline in the cell proliferation in the peritoneum, in special, the treatment with the 150 mg/kg/day dose inducing a 54.6% of reduction in intraperitoneal tumor cell burden. In parallel to reduction of EAT proliferation, treatment with 150 mg/kg of LQFM030 (2) resulted in a reduction of angiogenesis along with enhanced survival rate of the mice.

It has been known that antiangiogenic agents reduce tumor/progression by decreasing tumor supply with the advantage of not inducing tumor resistance. It has been demonstrated that in situations of overexpression of MDM2 the expression of VEGF mRNA and protein production is enhanced suggesting that MDM2 has an important role in the regulation of tumor growth and metastasis (Zhou *et al.*, 2011). In this issue Secchiero *et al.* (2007) report the antiproliferative and antiangiogenic

effect of nutlin-3 suggesting 3 different mechanisms: inhibiting endothelial cell migration; inducing cell cycle arrest; and increasing apoptotic tendency in endothelial cells. Peterson *et al.* (2011) investigated if concurrent inhibition of both MDM2 and VEGF signaling would have cooperative anti-tumor effects, potentiating antiangiogenic strategies for tumors treatments, showing that Bevacizumab plus Nutlin-3a cooperatively inhibits tumor growth and angiogenesis *in vivo* with dramatic effects on tumor vascularity with concomitantly targeting VEGF and p53 pathways potently suppresses tumor growth. Chavala *et al.* (2013) showed that nutlin inhibited angiogenesis in several model systems with conceivable advantages over existing cytokine-targeted antiangiogenesis therapies. Xiong *et al.* (2013) investigated the function of MDM2 in VEGF-mediated tumor angiogenesis of breast cancer and the potential value of MDM2 as an anti-angiogenic therapy target for cancer therapy by inhibiting MDM2 with antisense oligonucleotides (ASO) or other antagonist nutlin-3. The author concluded that ASO construct targeting MDM2 specifically suppresses VEGF expression *in vitro* and VEGF-mediated tumor angiogenesis *in vivo* in breast cancer. Furthermore, the suppression of VEGF expression subsequent to inhibition of MDM2 in p53 mutant cells suggests that MDM2 has a regulatory role on VEGF expression through a p53-independent mechanism.

p53 is considered an important tumor suppressor since its reactivation in tumors is associated with reduction of malignant growth by triggering apoptosis, growth arrest or/and senescence. Several therapeutic strategies in development increase and/or restore/reactive p53 function. Under stress p53 up modulate p21 inducing cell cycle arrest with consequence repair or apoptosis of the cell. p53-mediated apoptosis results in the activation of proteases, in special the initiator

caspase 9 and the executioner caspase 3, in this respect, treatment of EAT-bearing mice with LQFM30 (2) resulted in increases of p53 and p21 along with increase in caspase-3, caspase-8 and caspase-9 activities, indicating EAT cell death by apoptosis, probably by mitochondrial pathway. Recently, it was proved that Nutlin in nanoparticles using a JVM-2-derived xenograft mouse model reduced the subcutaneous tumor volume and promoted induction of apoptosis in the tumor mass (Voltan, 2013). Although the exact mechanism by LQFM30 (2) inhibit tumor progression is not totally clear, we can suggest that this compound increased p53 modulating MDM2 resulting in p21 increase, cell cycle arrest, apoptosis and regulatory effect on the VEGF expression with antiangiogenic effect.

Considering the positive effect of LQFM030 (2) in abrogates EAT progression *in vivo*, we evaluated the acute oral toxicity of this compound. In this assays LQFM030 (2) was categorized as “Class 5” in Global Harmonized System (GHS), i.e., acute lethal toxicity superior than 2000 mg/kg. Histological analysis of formaldehyde-fixed, paraffin embedded liver, kidney, spleen, heart or lungs sections stained with hematoxylin and eosin showed normal architecture in all experimental groups, however, as it's possible to expect for cytotoxic compounds, the stomach of animals orally exposed to different doses of LQFM030 (2) showed atypical architecture with sign of hyperplasia.

Taken together the results demonstrated that LQFM30 (2), a molecular simplification of Nutlin 1 (1), inhibit EAT progression by increasing p53 and p21 resulting in apoptosis and antiangiogenic effect. Considering the low acute oral toxicity presented by the LQFM30 (2) this compound could be also administrated in combination with usual cytotoxic agents reducing the toxicity burden with the same or superior antitumor action. On the other hand, these data might open a new route

for a broader application of LQFM030 (2) not only for antitumor therapies but also for application in antiangiogenic treatments in diseases with overexpression of VEGF such as macular degeneration.

References

- Chavala, S.H. *et al.* Retinal angiogenesis suppression through small molecule activation of p53. *J Clin Invest.* pii: 67315 (2013).
- Coll-Mulet, L. *et al.* MDM2 antagonists activate p53 and synergize with genotoxic drugs in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* **107**, 4109-4114 (2006).
- David, C. *et al.* Structure of a complex between MDM2 and a small molecule Inhibitor. *Journal of Biomolecular* **30**, 163–173 (2004).
- de Oliveira, C.H.A. *et al.* Chemoselective and Regiospecific Formylation of 1-Phenyl-1*H*-pyrazoles Through the Duff Reaction, *Synthetic Communications* **43**, 1633-1639 (2013).
- Finar, I.L. & Godfrey, K.E. *J. Chem. Soc.* (1954).
- Harris, S.L. & Levine, A.J. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* **24**, 2899–2908 (2005).
- Janouskova, H. *et al.* Activation of p53 pathway by Nutlin-3a inhibits the expression of the therapeutic target $\alpha 5$ integrin in colon cancer cells. *Cancer Lett* **336**, 307-318 (2013).
- Kojima, K. *et al.* Concomitant inhibition of MDM2 and Bcl-2 protein function synergistically induce mitochondrial apoptosis in AML. *Cell Cycle* **5**, 2778-2786 (2006).
- Kojima, K. *et al.* MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy. *Blood*, **106**, 3150-3159 (2005).
- Kojima, K. *et al.* Mdm2 inhibitor nutlin-3A induces p53-mediated apoptosis by transcription-dependent and transcription-independent mechanisms and may overcome Atm-mediated resistance to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **108**, 993-1000 (2006).
- Kojima, K. *et al.* Mitogen-activated protein kinase inhibition enhances nuclear proapoptotic function of p53 in acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res* **67**, 3210-3219 (2007).
- Lane, D.P., Brown, C.J., Verma, C. & Cheok, C.F. New insights into p53 based therapy. *Discov Med.* **6**, 107–117 (2011).
- Manujendra, N., Saha, L.Q., & Hong, C. Targeting p53 by small molecules in hematological malignancies. *J. Hematol. Oncol.* **6** (2013).

- Mir, R. *et al.* Mdm2 antagonists induce apoptosis and synergize with cisplatin overcoming chemoresistance in TP53 wild-type ovarian cancer cells. *Int J Cancer* **132**, 1525-1536 (2013).
- Oren, M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ.* **10**, 431–442 (2003).
- Patterson, D.M. *et al.* Effect of MDM2 and vascular endothelial growth factor inhibition on tumor angiogenesis and metastasis in neuroblastoma. *Angiogenesis* **14**, 255-266 (2011).
- Pei, D., Zhang, Y. & Zheng, J. Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and MdmX. *Oncotarget*. **3**, 228–235 (2012).
- Saha, M.N. *et al.* Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of an MDM2 antagonist nutlin. *Blood*, **114**, 3841 (2009).
- Secchiero, P. *et al.* Anti-angiogenic activity of the MDM2 antagonist nutlin-3. *Circ Res* **100**, 61-69 (2007).
- Secchiero, P. *et al.* Functional integrity of the p53-mediated apoptotic pathway induced by the nongenotoxic agent nutlin-3a in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* **107**, 4122-4129 (2006).
- Selivanova, G. Therapeutic targeting of p53 by small molecules. *Semin Cancer Biol.* **6**, 46–56 (2010).
- Shangary, S. & Wang, S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **6**, 223–241 (2009).
- Stuhmer, T. *et al.* Nongenotoxic activation of the p53 pathway as a therapeutic strategy for multiple myeloma. *Blood*, **106**, 3609-3617 (2005).
- Vassilev, L.T. *et al.* In vivo activation of the p53 pathway by small molecule antagonists of MDM2. *Science* **303**, 844-848 (2004).
- Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A.J. Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310 (2000).
- Voltan, R. *et al.* Nanoparticles loaded with Nutlin-3 display cytotoxicity towards p53(wild-type) JVM-2 but not towards p53(mutated) BJAB leukemic cells. *Curr Med Chem.* **20**, 2712-22 (2013).
- Wang, W. & El-Deiry W.S. Restoration of p53 to limit tumor growth. *Curr Opin Oncol.* **6**, 90–96 (2008).

Wiman, K.G. Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to cancer patient. *Oncogene* **6**, 4245–4252 (2010).

Xiong, J., Yang, Q., Li, J. & Zhou, S. Effects of MDM2 inhibitors on vascular endothelial growth factor-mediated tumor angiogenesis in human breast cancer. *Angiogenesis* (2013).

Zhou, S., Gu, L. He, J. Zhang, H. & Zhou, M. MDM2 regulates vascular endothelial growth factor mRNA stabilization in hypoxia. *Mol. Cell. Biol.*, **31**, 4928–4937 (2011).

Artigo 2

Induction of apoptosis in Erhlich ascites tumor cells via p53 activation by a novel small compound MDM2 inhibitor - LQFM030

Mariana Flavia da Mota^a, Polyana Lopes Benfica^a, Bruna dos Santos Rodrigues^a, Thalyta Freitas Castro^a, Alane Pereira Cortez^a, Larissa Matuda Macedo^b, Carlos Henrique Castro^b, Luciano Moraes Lião^d, Flávio Silva de Carvalho^d, Luiz Antônio Romeiro^{e,f}, Ricardo Meneghati^{c*}, and Marize Campos Valadares^{a*}

^aLaboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, GO, Brazil

^bLaboratório de Fisiologia de Órgãos Isolados e de Fisiologia Autonômica e Cardíaca, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, GO, Brazil

^cLaboratório de Química Farmacêutica Medicinal, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, GO, Brazil

^dLaboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia/GO, Brazil

^eLADETER, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

^fCiências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, *Campus Universitário Darcy Ribeiro*, Brasília, DF, Brazil.

*Corresponding author: Prof. Dr. Marize Campos Valadares

E-mail: marizecv@farmacia.ufg.br

Faculdade de Farmácia – UFG

Praça Universitária esquina com a primeira avenida s/n, setor Universitário,

Goiânia, GO CEP: 74605. 220 Phone / fax: +55 62 3209-6044 ext. 227.

Glossary

BSA – bovine serum albumin

cDNA – complementary DNA

CT – threshold cycle

EAT – Ehrlich ascites tumor

FBS – fetal bovine serum

FITC – fluorescein isothiocyanate

GAPDH – glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

HE – hematoxylin-eosin

MDM2 – murine double minute 2

mRNA – messenger RNA

NP-40 – nonylphenoxypolyethoxylethanol

PBS – phosphate-buffered saline

PCR – polymerase chain reaction

Pgk1 – phosphoglycerate kinase

PI – propidium iodide

PS – phosphatidylserine

RPMI – Rosewell Park Memorial Institute

RT-PCR – real-time PCR

SDS – sodium dodecyl sulfate

T20 – tween 20

TBS – Tris-buffered saline

TBST – Tris-buffered saline with T20

Abstract

The activation of the p53 pathway through the inhibition of MDM2 has been proposed as a novel therapeutic strategy against tumors. A series of cis-imidazoline analogs, termed nutlins, were reported to displace recombinant p53 protein from its complex with MDM2 by binding to MDM2 in the p53 pocket, thus preventing p53 degradation and exhibiting antitumor activity both *in vitro* and *in vivo*. In view of the potential antitumor property of nutlins and its complex, such analogs as LQFM030 were created by employing the strategy of molecular simplification. The aim of the current study was to examine the proapoptotic mechanisms of the novel synthetic MDM2 inhibitor LQFM030 on Ehrlich ascites tumor (EAT) cells by disrupting the p53-MDM2 complex. LQFM030 cytotoxicity was evaluated in EAT cells by the trypan blue exclusion test, and the mechanisms involved in EAT cell death were investigated by light and fluorescence microscopy, flow cytometry, real-time PCR, and western blotting. Our results demonstrate that LQFM030 has dose-dependent antiproliferative and cytotoxic activities on EAT cells, induces the accumulation of p53 protein, and activates the p53 pathway (via activation of the p21 and p27 proteins and a reduction of MDM2). The compound caused cell cycle arrest in G1 phase and led to apoptosis, as revealed by the apoptotic morphology of the cells, DNA fragmentation, PS externalization, and activation of initiators and effector caspases. In contrast, p53 gene transcription was unaffected by LQFM030, indicating that p53 was up-regulated by a posttranslational mechanism. Similar to nutlins, LQFM030 inhibited the p53-MDM2 interaction, reactivating p53 and its main functions of cell cycle arrest and apoptosis. These results suggest that the small molecule p53 activator LQFM030 has the potential for further development as a novel cancer therapeutic agent.

Keywords: LQFM030; nutlin; apoptosis; p53; MDM2; Ehrlich ascites tumor.

1. Introduction

The activation of the p53 pathway via the inhibition of MDM2 has been proposed as a novel therapeutic strategy. In fact, studies have shown that disruption of the p53-MDM2 interaction by different macromolecular approaches or by the suppression of MDM2 expression can lead to the activation of p53 and tumor growth inhibition^{1,2,3,4,5,6}.

p53 is an important defense against cancer because it controls the transition of cells from the G1 to S phase and also induces cell cycle arrest and, consequently apoptosis^{7,8}. Due to its potent tumor suppressor role, the function of p53 is almost always blocked in tumor cells. Indeed, inactivating mutations in p53 are found in approximately 50% of all human cancers; in the remaining cancers in which the p53 gene is not mutated, the function of the p53 pathway is often inhibited via other mechanisms, including the increased expression of MDM2 (a negative regulator of p53). The fact that the p53 signaling pathway is inactivated in virtually all cancers has drawn great attention from the world-wide cancer research community for targeting the p53 pathway for the development of improved cancer therapies³. Thus, the pharmacological reactivation of p53 through the disruption of the p53-MDM2 interaction using non-peptide small molecule inhibitors has recently appeared as an effective therapeutic strategy for different tumors^{4,9}. Nutlins (a series of cis-imidazoline analogs that displace recombinant p53 protein from its complex with MDM2 by binding to MDM2 in the p53 pocket, thus preventing p53 degradation) are currently considered among the most promising activators of p53 to induce p53-dependent apoptosis in several tumor cells⁵.

In view of the potential antitumor property of nutlins and its complex, analogs of this compound have been designed to optimize complex production and maintain

the antitumor and apoptosis-inducing activities. One such analog is LQFM030, a heterocyclic compound originally based on the prototype nutlin-1 using molecular simplification (Figure 1a). This compound was selected because recent studies from our group have demonstrated that LQFM030 has significant cytotoxicity and apoptosis-inducing potential against a human leukemic cell line, promoting changes in cell cycle progression (declining through S-phase and increasing the G1 and G2 phases), modulating gene expression, increasing Bax protein and cytochrome-c expression, decreasing Bcl-2 expression, and altering the mitochondrial membrane potential (unpublished data). Furthermore, the compound shows antitumor activity *in vivo* and low toxicity.

The aim of the current study was to examine the proapoptotic mechanisms of the novel synthetic MDM2 inhibitor LQFM030 on Ehrlich ascites tumor (EAT) cells through the disruption of the p53-MDM2 complex.

2. Material and Methods

2.1 Chemicals and antibodies

RPMI-1640 medium, fetal bovine serum, streptomycin, penicillin G, propidium iodide, and RNase were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ethanol, trypan blue, and Tween 20 were obtained from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Hoechst 33342 and the BCIP/NBT substrate kit were acquired from Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Cytofix/Cytoperm was obtained from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). The Annexin V apoptosis detection FITC kit was obtained from eBioscience (San Diego, CA, USA). The CaspaTag Caspase In Situ Assay Fluorescein kit was purchased from Millipore Corporation (Billerica, MA, USA). TRIzol was obtained from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). The RNAeasy minikit, QuantiTect Reverse Transcription kit, and Qiagen Rotor-Gene SYBR Green PCR kit were acquired from Qiagen (Valencia, CA, USA). NP-40 lysis buffer and protease inhibitor cocktail were from Amresco (Solon, OH, USA). All antibodies used were purchased from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA).

2.2 LQFM030

The compound LQFM030 was provided by Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM), Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás (UFG), coordinated by Prof. Dr. Ricardo Menegatti; the compound was stored in a freezer at -20°C and prepared in the form of an o/w emulsion at the time of testing, due to its hydrophobicity. The emulsion was prepared as follows. A sample of 5 mg/mL of LQFM030 was added to 100 µL sunflower oil, 100 µg soy phosphatidylcholine, and 50 µL ethanol. The mixture was vortexed for 3 min, and the final volume was

completed with ultrapure water. For the control group, the emulsion was prepared without LQFM030.

2.3 Mice

Male Swiss albino mice (25 – 30 g) were obtained from Indústria Química do Estado de Goiás (IQUEGO). All of the animals were kept under constant environmental conditions, with a 12/12 light-dark cycle and temperature of $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fed standard granulated chow, and given drinking water *ad libitum*. The animal experiments were performed in accordance with the Institutional Protocols of Animal Care. The experimental protocol (CEUA - PRPPG/UFG n. 018/12) was approved by Institutional Ethic Committee of this University.

2.4 Cell culture, growth conditions, and treatment

An EAT was maintained by serial intraperitoneal transplantation. EAT cells were cultured in RPMI-1640 medium containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin, and 100 U/mL penicillin G in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air at 37°C . The cells were treated with an o/w emulsion of LQFM030; the untreated cultures received only vehicle.

2.5 Assessment of cell viability by the trypan blue exclusion method

EAT cells (5×10^5 cells/mL) were seeded into 96-well flat-bottomed microtiter plates (TPP, Trasadingen, Switzerland) in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS and incubated with or without eight concentrations (0.033 – 4.320 mM) of LQFM030 in sextuplicate for 24 or 48 h. The cell suspension and a trypan blue solution (0.2% in phosphate-buffered saline-PBS) were mixed 1:10, and the viability

of the cells was estimated using a hemocytometer (Boeco, Germany); stained cells were scored as dead. For all subsequent time-course studies, the IC₅₀ value (the concentration that inhibited cell growth in 50% of the cells compared to the untreated controls) of 0.81 mM was used.

2.6 Morphological analysis by light and fluorescence microscopy

The morphological alterations between LQFM030-treated and untreated EAT cells were assessed using light microscopy. The untreated cells and cells treated with 0.81 mM LQFM030 were incubated for 24 h, cytopinned onto glass slides, and stained with HE. After staining, the slides were examined using light microscopy (Axio Scope.A1 Carl Zeiss®, Germany), and images were captured using a 100x objective with the AxioVs40 software, 4.7.2.0. The nuclear alterations were assessed using the DNA binding dye Hoechst 33342, as described (ref. 10), using a 20x objective.

2.7 DNA cell cycle analysis

For the determination of the cell cycle phase distribution and cell proliferation, 5×10^5 EAT cells/mL were incubated with or without 0.81 mM LQFM030 for 24 h. The cells were washed twice with PBS at 1500 rpm for 10 min, and the cell pellets were resuspended in ice-cold 70% ethanol overnight at 4°C. The suspension was centrifuged, and the cell pellet was resuspended in 500 µL PBS solution containing 0.2 mg/mL RNase and 0.05 mg/mL PI and incubated at 4°C for 2 h. Fluorescence was measured with the FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) using PE x FL2 channels. The assay was performed in triplicate, and 10,000 events were acquired. The analysis of the data was performed using ModFit

software. A histogram of the DNA content (x-axis, PI fluorescence) versus counts (y-axis) is shown.

2.8 Detection of apoptosis by an annexin V binding assay

PS externalization was analyzed by flow cytometry using the annexin V apoptosis detection FITC kit. Cells (5×10^5) untreated and treated with 0.81 mM LQFM030 for 24 h were washed with PBS and suspended in 0.1 mL of the binding buffer provided with the kit. The cells were stained with an anti-annexin V-FITC antibody and propidium iodide (PI), as per the manufacturer's instructions, and scanned in the FL-1 (FITC) vs. FL-2 (PI) channels. Annexin V is a phospholipid-binding protein that has a high affinity for PS, and PI is used to distinguish viable from non-viable cells.

2.9 Flow cytometric determination of cell membrane integrity

For the determination of cell membrane integrity, EAT cells (1×10^6) untreated and treated with 0.81 mM LQFM030 for 24 h were washed with PBS and incubated for 5 min in a solution of PI (2 $\mu\text{g/mL}$) in PBS. A total of 10,000 events were acquired for the analysis using the FACS Diva software, and a histogram plot of the PE fluorescence (x-axis) versus counts (y-axis) is shown as the logarithmic fluorescence intensity.

2.10 Flow cytometric analysis of DNA fragmentation

The amount of fragmented DNA was measured by flow cytometry. EAT cells (1×10^6) untreated and treated with 0.81 mM LQFM030 for 24 h were washed with PBS and incubated with 0.2 mL lysis buffer (0.1% sodium citrate, 0.1% triton X-100,

and 2 µg/mL PI) for 15 min at 4°C. A total of 10,000 events were acquired for the analysis using the FacsDiva software, and a histogram plot of the PE fluorescence (*x*-axis) versus counts (*y*-axis) is shown as the logarithmic fluorescence intensity.

2.11 Flow cytometric analysis of the protein expression of p53, p21, and p27

For the determination of the expression of the pro-apoptotic proteins p53, p21, and p27, EAT cells (1×10^6) untreated and treated with 0.81 mM LQFM030 for 24 h were washed with PBS, suspended in 0.25 mL of a fixation and permeabilization solution (Cytotfix/Cytoperm), and incubated for 20 min at 4°C. The cells were then washed twice in PBS-T20 and incubated with specific antibodies (anti-p53, anti-p21, or anti-p27) for 15 min at room temperature. The cells were washed in PBS-T20. A total of 10,000 events were acquired for the analysis using the FacsDiva software, and a histogram plot of the FITC or PE fluorescence (*x*-axis) versus counts (*y*-axis) is shown as the logarithmic fluorescence intensity.

2.12 p53 RT-PCR analysis

The analysis of p53 mRNA expression in EAT cells was performed using the RT-PCR technique. Total RNA from EAT cells treated or not with 0.405 mM LQFM030 was prepared using the TRIzol reagent and/or the RNeasy minikit, following the manufacturers' instructions. The concentration and purity of the isolated RNA were determined by measuring the optical density at 260 and 280 nm. The RNA integrity was verified by electrophoresis through 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide. cDNA synthesis was performed using reverse transcriptase with 1 µg of RNA from each sample and the QuantiTect Reverse Transcription Kit

containing DNase following the manufacturer's instructions. The cDNA was amplified using the Rotor-Gene SYBR Green PCR kit and the p53 primer set: forward, 5'- TGA AAC GCC GAC CTA TCC TTA C -3', and reverse, 5'- GGC ACA AAC ACG AAC CTC AAA -3' (ref. 11). The program consisted of an initial activation step of HotStar Taq Plus DNA polymerase at 95°C for 5 min, followed by denaturation at 95°C for 5 s and annealing / extension at 60°C for 10 s using Rotor-Gene (Qiagen, USA) equipment. The gene used for normalization was Pgk1. The relative levels of mRNA p53 gene expression were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method.

2.13 Western blot analysis of MDM2

For the western blot analysis of the MDM2 protein, EAT cells (5×10^5 cells/mL) were treated or not with 0.81 mM LQFM030, and cell lysates were prepared with NP-40 lysis buffer (containing a protease inhibitor cocktail) for 30 min on ice. The cell debris was pelleted by centrifugation at 13,000 rpm and 4°C for 10 min, and the supernatant was recovered. Approximately 40 μ g of protein, as estimated by the Bradford method, was separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel and electrotransferred to nitrocellulose membranes (Millipore). After blocking with 5% non-fat skim milk powder in BSA, the membranes were incubated with an antibody against MDM2 (1:250). The blots were washed three times with TBST on a shaker and incubated with the secondary antibody tagged with alkaline phosphatase (1:1000) for 1.5 h. After washing with TBST for 30 min, the MDM2 protein was detected using the chromogenic substrate BCIP/NBT. Equal protein loading in each lane was confirmed by probing with an anti-GAPDH antibody (1:1000). Quantification of the band density was performed using ImageJ software and calculated as the ratio of GAPDH expressed in the same sample.

2.14 Flow cytometric analysis of caspase 3, 8, and 9 expression

The activities of caspases 3, 8, and 9 were measured using the CaspaTag Caspase In Situ Assay Fluorescein kit following the manufacturer's instructions. After 24 h of incubation with or without 0.81 mM LQFM030, the cells (1×10^6) were washed for 10 min with PBS at 1500 rpm and incubated with antibodies against caspases 3, 8, or 9 for 1 h at 37°C. After incubation, the cells were washed twice in PBS and resuspended in the buffer provided in the kit. A total of 10,000 events were acquired for the analysis using the FACS Diva software, and a histogram plot of the FITC fluorescence (x-axis) versus counts (y-axis) is shown as the logarithmic fluorescence intensity.

2.15 Statistical analysis

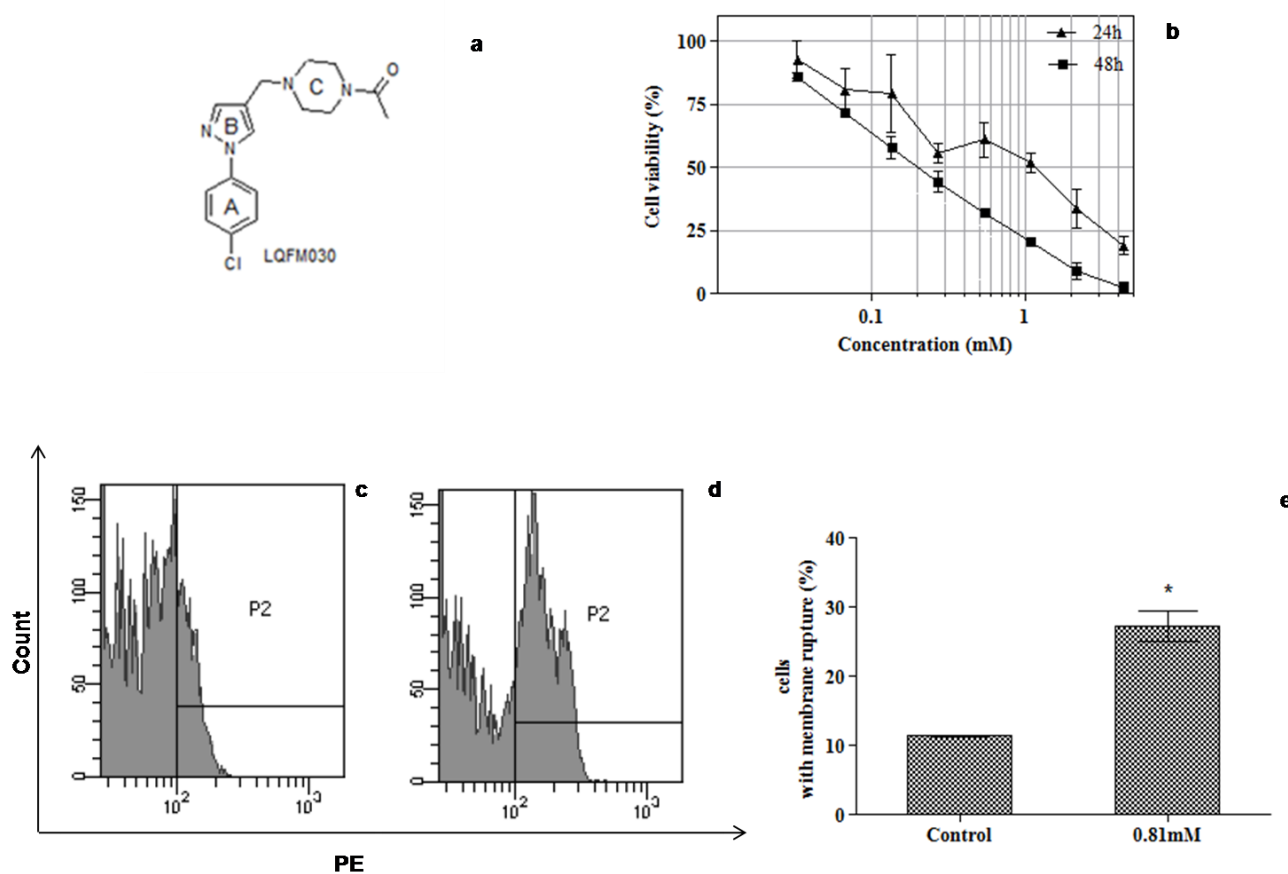
The data are represented as the mean $\pm$ SD, and the values were obtained in at least two independent experiments (n). The statistical analyses were performed using Student's *t*-test with the GraphPad Prism program (version 5.00 for Windows 98, Graph Pad Software, San Diego, California); $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1 LQFM030 induced cytotoxicity in EAT cells

We examined the effect of LQFM030 on the viability of EAT cells using the trypan blue exclusion test. EAT cells were treated with LQFM030 at increasing concentrations (0.033 – 4.32 mM). A significant concentration-dependent growth inhibition was observed when the cells were treated with LQFM030 for 24 and 48 h. LQFM030 showed 50% growth inhibition after 24 h of treatment at 0.81 mM; the IC_{50} value was 0.10 mM after 48 h of treatment (Figure 1b). Using the IC_{50} value for 24 h (0.81 mM), we detected a loss of plasma membrane integrity in $27.25 \pm 2.1\%$ of the EAT cells by flow cytometry after incubation with PI (Figure 1 c-e).

Figure. 1. (a) Structure of the compound LQFM030. (b) Cytotoxic effects of LQFM030 on EAT cells after 24 and 48 h of treatment (0.033 – 4.32 mM). Cell viability was examined with trypan blue exclusion method and expressed as a percentage of the control. Experiments were performed in sextuplicate. Each bar presents means $\pm$ SD of three independent experiments. The IC_{50} values were 0.81 and 0.10 mM, respectively. (c-e) Effects of LQFM030 in plasma membrane integrity. EAT cells were treated for 24 h with 0.81 mM LQFM030 and analyzed on a flowcytometer. Histograms displaying PE-fluorescence (x -axis) versus counts (y -axis) has been shown in logarithmic fluorescence intensity. The bar presents mean $\pm$ SD of two independent experiments (* $p < 0.05$ compared to control).

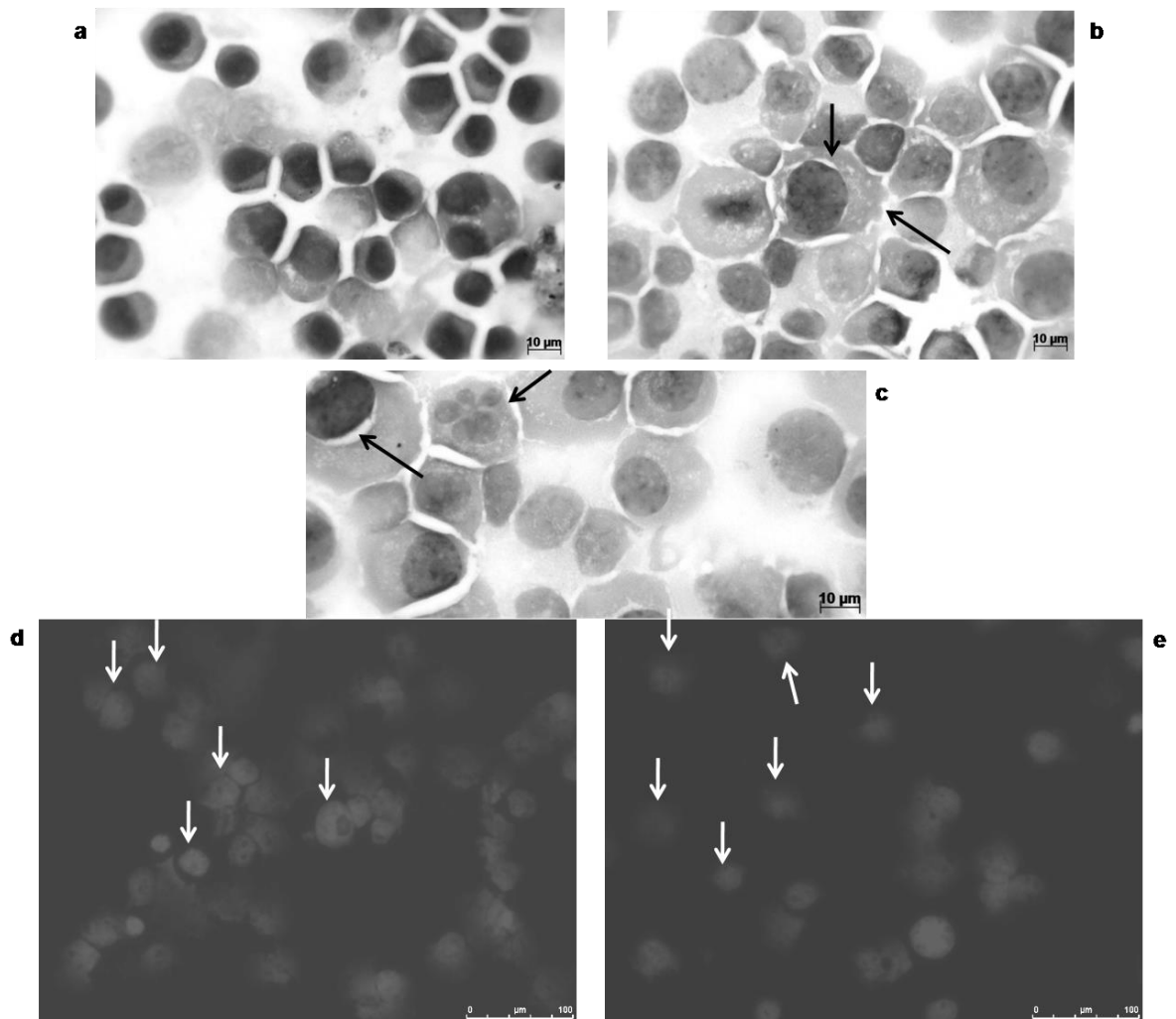


3.2 LQFM030 promoted morphological and nuclear changes in EAT cells

The morphological analysis of EAT cells stained with HE clearly revealed the presence of apoptotic cells after treatment with LQFM030. As can be observed in Figure 2a, the control cells exhibited nuclei with dispersed chromatin and an

organized plasma membrane. In contrast, the cells treated with LQFM030 for 24 h presented membrane blebbing, vacuolization (Figure 2b), and nuclear fragmentation (Figure 2c). After nuclear staining with Hoechst 33342, the nuclei in the viable cells displayed a regular, oval shape, with homogeneous chromatin (Figure 2d), whereas shrinking and fragmentation of the nuclei, chromatin condensation, and low fluorescence was observed in the apoptotic cells (Figure 2e).

Figure 2. Apoptotic morphology of EAT cells upon LQFM030 treatment. The cells were treated with 0.81 mM LQFM030 for 24 h and stained with HE. Images were taken using a 100 x objective with the AxioVs40 software. (a) Control cells showing nuclei with dispersed chromatin and organized plasma membrane. (b) LQFM030-treated cells presenting membrane blebbing and vacuolization (arrows) (c) Treated cells presenting and nuclear fragmentation and vacuolization (arrows). Changes in the nuclear morphology of EAT cells. Nuclear staining was performed with Hoechst 33342. Images were taken using a 20 x objective with LAS-AF software. (d) Control cells. (e) LQFM030-treated cells presenting chromatin condensation, low fluorescence and shrinking nuclei.

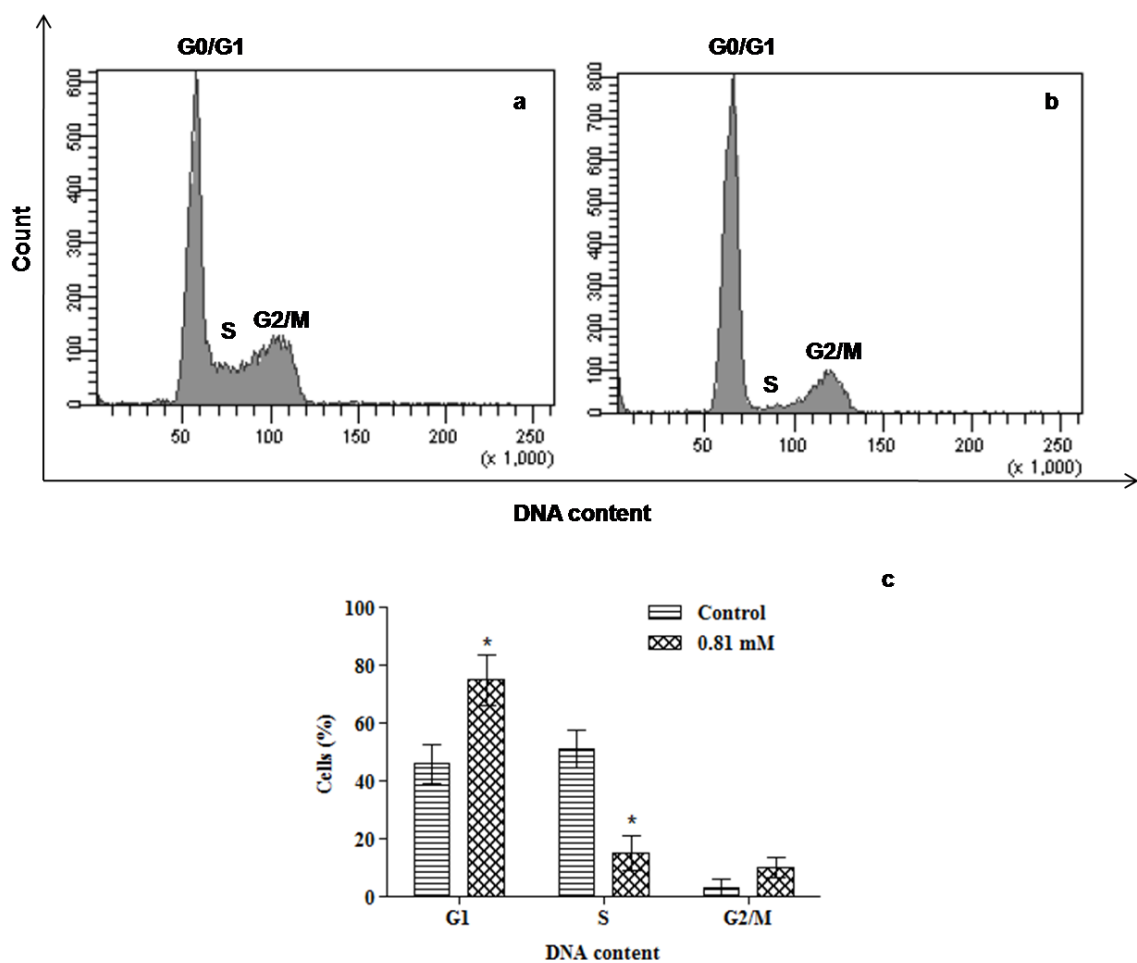


3.3 LQFM030 promoted cell cycle arrest in EAT cells

The analysis of the cell cycle profile by FACS revealed that LQFM030 treatment at 0.81 mM for 24 h significantly arrested the EAT cells at the G1 phase, as evidenced by an increased percentage of the cells in G1 phase ($74.79 \pm 8.9\%$)

compared to the untreated cells ($45.80 \pm 6.6\%$; $p < 0.05$) and a corresponding decrease in the percentage of the cells in S phase ($15.15 \pm 5.9\%$) compared to the untreated cells ($51.05 \pm 6.6\%$; $p < 0.05$). The percentage of cells in the G2/M phase was not statistically altered after LQFM030 treatment (Figure 3). These data show that LQFM030 could arrest the cell cycle at G1 and prevent EAT cell proliferation.

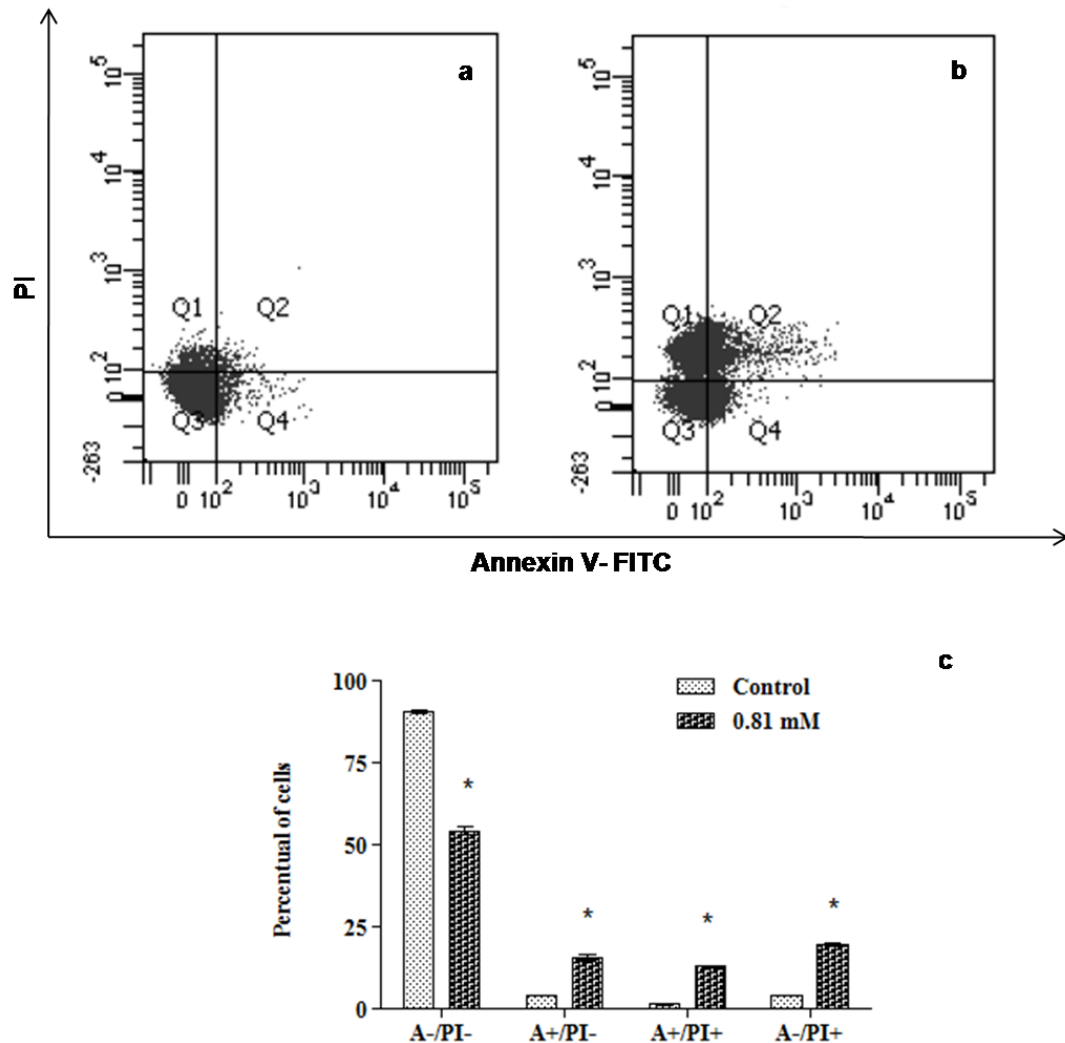
Figure 3. Analysis of the effects of LQFM030 on EAT cell cycle. For the determination of cell cycle-phase distribution, EAT cells were permeabilized and nuclear DNA was labeled with propidium iodide (PI). The analysis was carried out by flow cytometry. The histograms show (a) Untreated cells (b) Cells treated with 0.81 mM LQFM030 for 24h (c) Percentual of EAT cells in G₁, S and G₂ phases before and after LQFM030 treatment. Each bar presents mean $\pm$ SD of three independent experiments (* $p < 0.05$ compared to control).



3.4 LQFM030 induced phosphatidylserine externalization on EAT cells

Annexin-V binding of phosphatidylserine exposed on cells is an early indicator of apoptosis. The treatment of LQFM030 resulted in a significant proportion of EAT cells undergoing apoptosis because it promoted phosphatidylserine externalization, as determined by a flow cytometric analysis. As shown in Figure 4, $90.45 \pm 0.6\%$ of the untreated cells were alive (annexin-V -/PI -). In contrast, after 24 h of treatment with 0.81 mM LQFM030, the number of live cells was $54.20 \pm 1.1\%$ ($p < 0.05$), whereas the number of early apoptotic cells (annexin-V +/PI -) was $15.35 \pm 0.9\%$ ($p < 0.05$), and the number of late apoptotic cells (annexin-V +/PI +) was $12.80 \pm 0.28\%$ ($p < 0.05$). Furthermore, the number of necrotic or secondary necrotic cells (annexin-V -/PI +) was $19.65 \pm 0.49\%$ ($p < 0.05$).

Figure 4. Flow cytometry analysis of phosphatidylserine externalization in LQFM030-treated EAT cells. Cells were stained with annexin V-FITC and PI. (a) Untreated cells and (b) Cells treated with 0.81 mM LQFM030 for 24h. Left inferior squares (AnnexinV - / PI -) = % viable cells. Right inferior squares (Annexin V + / PI -) = % early apoptotic cells. Left superior squares (Annexin V + / PI +) = % late apoptotic cells. Right superior squares (Annexin V - / PI +) = % necrotic cells. (c) Comparison of fluorescence intensity of annexin V-FITC and PI between untreated and LQFM030-treated cells. The bar presents mean $\pm$ SD of two independent experiments (* $p < 0.05$ compared to control).

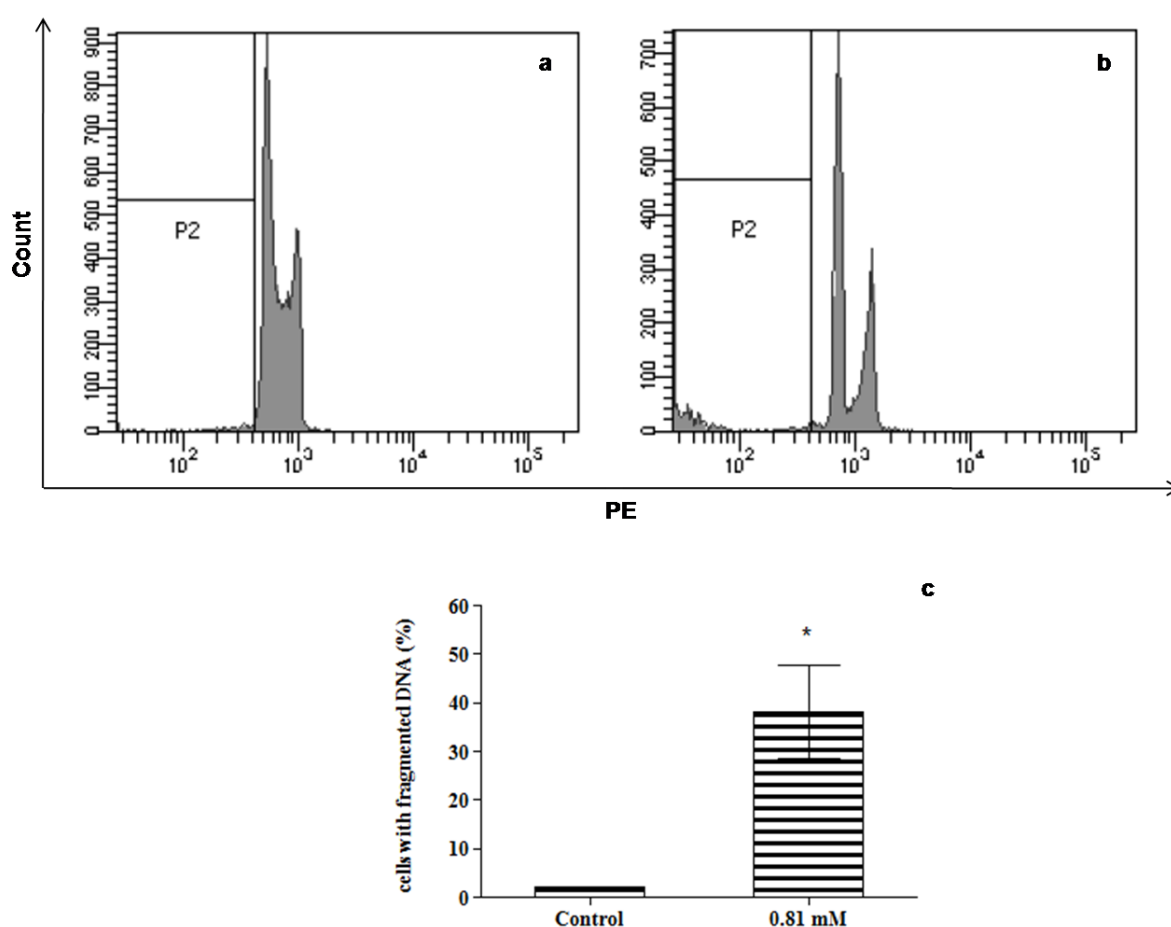


3.5 LQFM030 promoted DNA fragmentation in EAT cells

Biochemically, apoptosis is characterized by the fragmentation of chromosomal DNA; thus, DNA fragmentation is a classic hallmark of apoptotic cells. The treatment of EAT cells with LQFM030 promoted DNA damage. As

observed in Figure 5, treatment with 0.81 mM LQFM030 for 24 h increased DNA fragmentation by $38.1 \pm 9.6\%$ compared to the control cells ($2.1 \pm 0.07\%$, $p < 0.05$).

Figure 5. Percentage of DNA fragmentation in LQFM030-treated EAT cells. EAT cells were treated for 24 h with 0.81 mM LQFM030 and analyzed on a flowcytometer. Histograms displaying PE-fluorescence (x-axis) versus counts (y-axis) has been shown in logarithmic fluorescence intensity. (a) Untreated cells (b) Cells treated with 0.81 mM LQFM030 for 24h. (c) Comparison of fluorescence intensity of PI between untreated and LQFM030-treated cells. The bar presents mean $\pm$ SD of two independent experiments (* $p < 0.05$ compared to control).

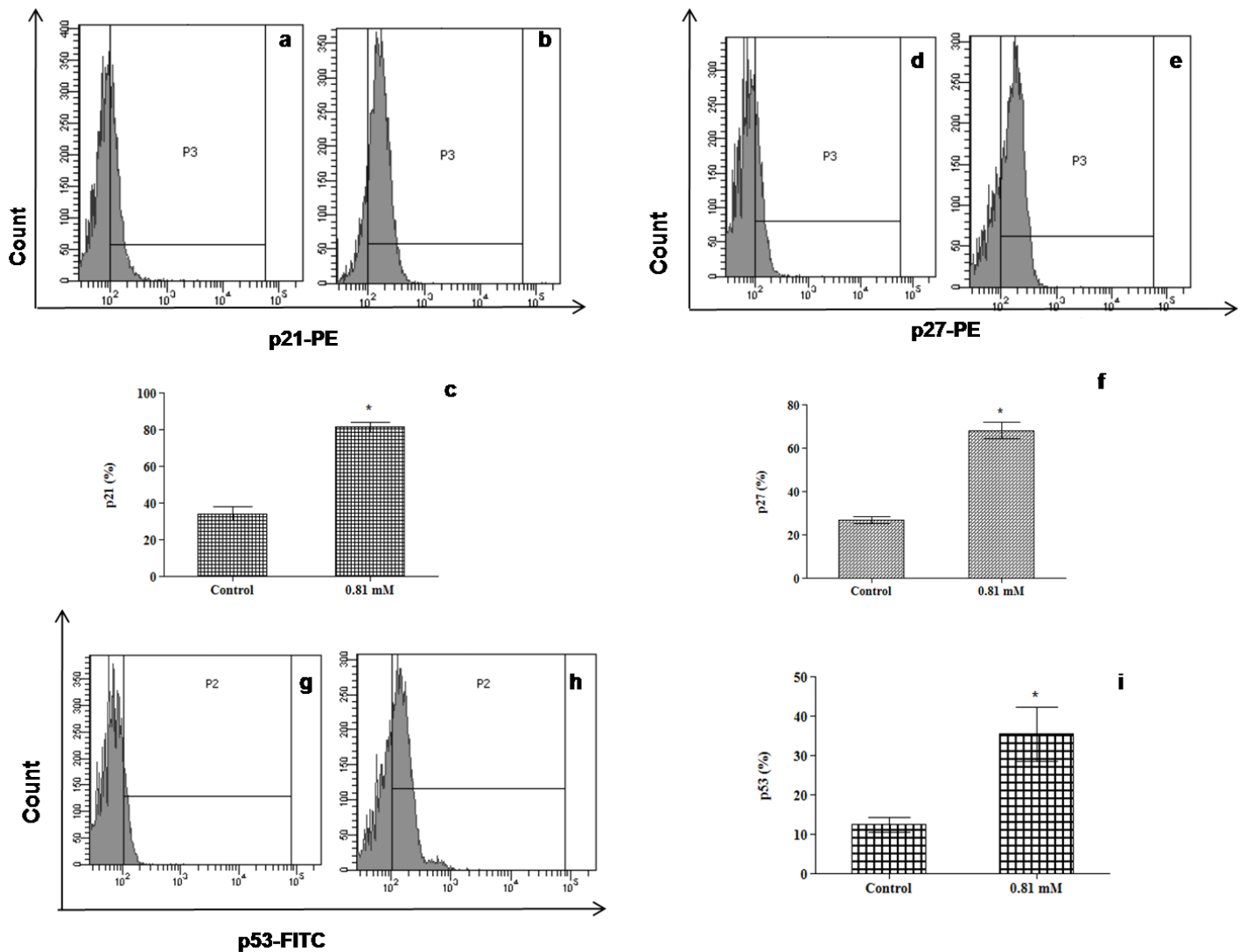


3.6 LQFM030 modulated p21, p27, and p53 proteins in EAT cells

To understand the mechanisms by which LQFM030 induces G1 phase arrest and to elucidate whether the upstream regulation of p53 plays a major role in the

induction of apoptosis by LQFM030, we analyzed the expression of the pro-apoptotic proteins p21, p27, and p53. Our results showed an increase in p21 ($81.25 \pm 2.89\%$), p27 ($68.20 \pm 3.67\%$), and p53 ($33.80 \pm 5.76\%$) protein levels in the treated compared to the untreated cells ($34.10 \pm 3.81\%$; $26.80 \pm 1.55\%$ and $12.03 \pm 2.32\%$, respectively; $p < 0.05$). Based on the above results, we suggest that LQFM030 mediated apoptosis by a p53-dependent mechanism (Figure 6).

Figure 6. Effect of LQFM030 on the expression of p21, p27 and p53. EAT cells were treated for 24 h with 0.81 mM LQFM030 and analyzed on a flowcytometer. Histograms displaying PE/FITC-fluorescence (x-axis) versus counts (y-axis) has been shown in logarithmic fluorescence intensity. (a,d,g) Untreated cells (b,e,h) Cells treated with 0.81 mM LQFM030 for 24h. (c,f,i) Comparison of fluorescence intensity of PE/FITC between untreated and LQFM030-treated cells. The bar presents mean $\pm$ SD of two independent experiments (* $p < 0.05$ compared to control).



3.7 LQFM030 did not modulate the p53 gene in EAT cells

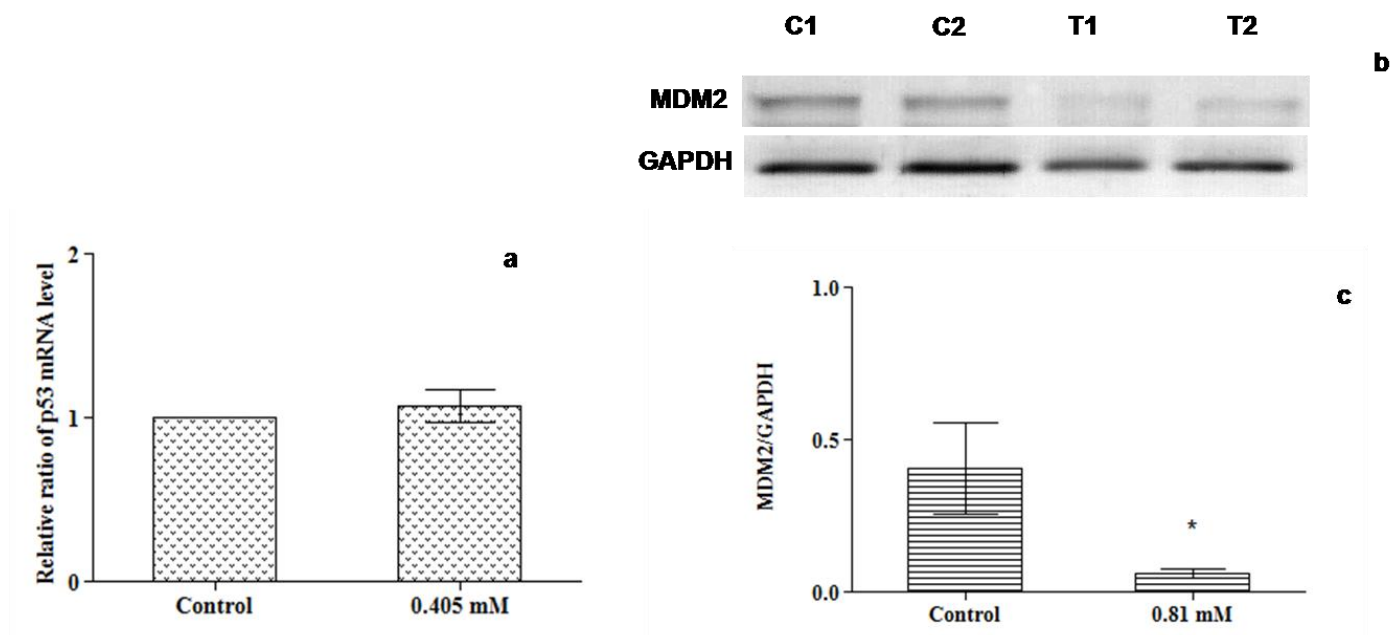
The mRNA levels of p53 were measured by real-time PCR after 24 h of incubation with 0.405 mM LQFM030. The transcription of the p53 gene was

unaffected by LQFM030 (Figure 7a), indicating that LQFM030 up-regulated p53 by means of a posttranslational mechanism.

3.8 LQFM030 reduced the expression of MDM2 in EAT cells

A western blot analysis of the p53 inhibitor protein MDM2 showed that MDM2 was down regulated after 24 h of treatment with 0.81 mM LQFM030 (0.06 ± 0.05), with a significant reduction in the band density in relation to the control cells (0.37 ± 0.13) (Figure 7b-c).

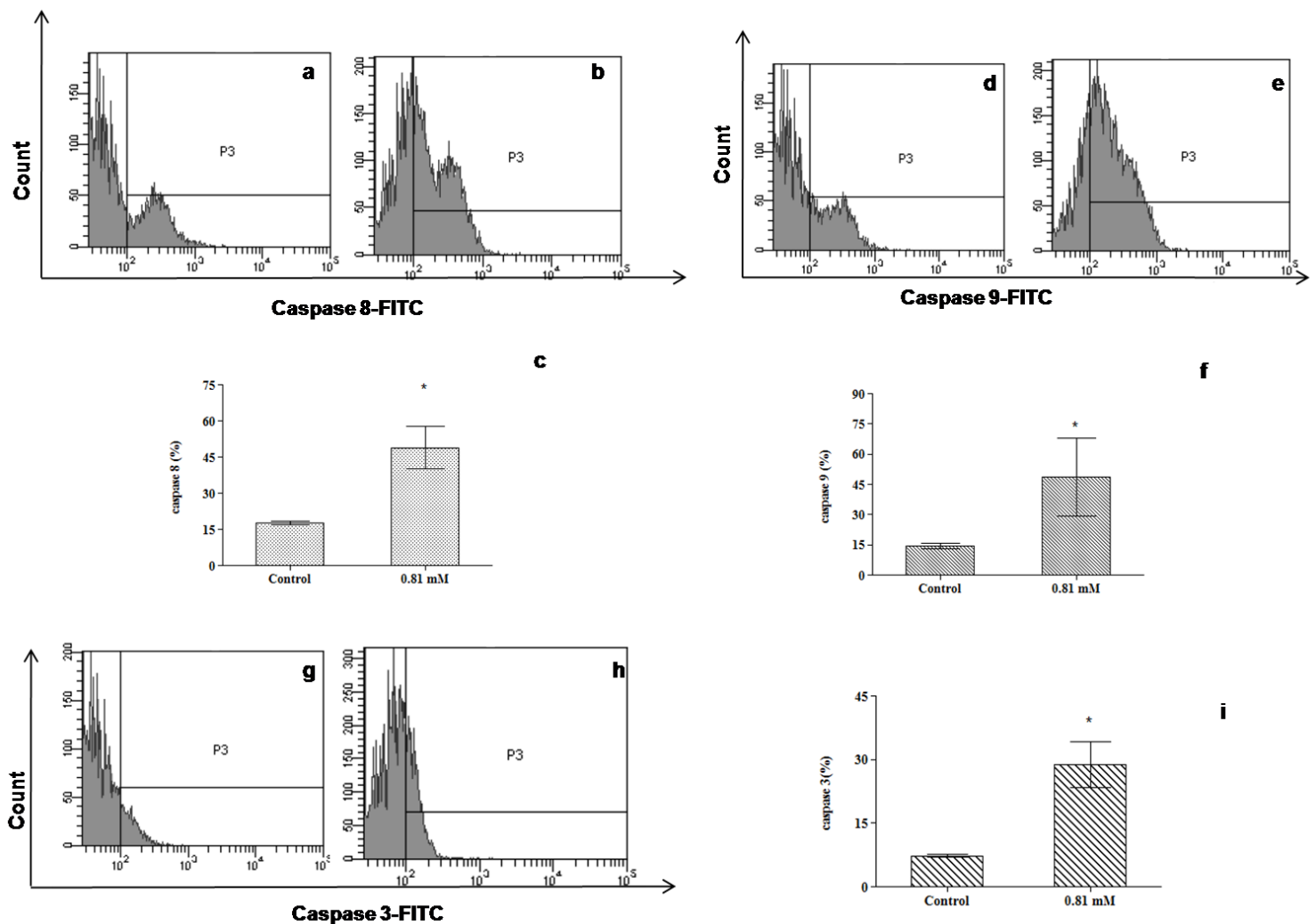
Figure 7. (a) Real-time PCR analysis of p53 mRNA after exposure of 0.405 mM LQFM030 for 24 h. The normalize gene was Pgk1. The bar presents mean $\pm$ SD of two independent experiments. (b) Effect of LQFM030 on the expression of MDM2. Western blot analysis after treatment of EAT cells for 24 h with 0.81 mM LQFM030. Blot of two independent experiments (C1 and T1- control and treated cells, respectively, of experiment 1; C2 and T2- control and treated cells, respectively, of experiment 2). GAPDH is shown as a loading control. (c) Band density of untreated and LQFM030-treated cells calculated as the ratio of GAPDH expressed in the same sample. The bar presents mean $\pm$ SD of two independent experiments (* $p < 0.05$ compared to control).



3.9 LQFM030 induced caspase-mediated apoptosis in EAT cells

In addition to the morphological and biochemical features of apoptosis in EAT cells after treatment with LQFM030, we also observed a 2.8-fold increase in caspase 8, 3.7-fold increase in caspase 9, and 4-fold increase in caspase 3 compared to the control cells ($p < 0.05$) (Figure 8).

Figure 8. Effect of LQFM030 in caspase 8, 9 and 3 activity. (a,d,g) Untreated cells (b,e,h) Cells treated with 0.81 mM LQFM030 for 24h. (c,i,f) Comparison of fluorescence intensity of FITC between untreated and LQFM030-treated cells. Each bar presents mean $\pm$ SD of two independent experiments (* $p < 0.05$ compared to control).



4. Discussion and Conclusion

Considering the crucial role of p53 in tumor suppression, the reactivation of the p53 function by disrupting the p53-MDM2 interaction using non-peptide small compound inhibitors is now recognized as a promising strategy for anticancer drug design. Many series of small compound inhibitors have been described to date, including benzodiazepinediones, nutlins, spiro-oxindoles, quinolinols, isoindolinones, chlorofusin, norbornanes, sulfonamides, chalcones, terphenyls, and piperazine-4-phenyl derivatives, many of which show relatively weak bioactivity. Within this context, only the nutlins, spiro-oxindoles, and benzodiazepinediones are considered to be particularly valuable⁴.

Several studies have revealed the potential of nutlins in inhibiting the p53-MDM2 interaction and promoting apoptosis in different cancer cell lines^{1, 12-21}.

According to ref. 1, the treatment of cells with an inhibitor of p53-MDM2 binding should result in the stabilization and accumulation of the p53 protein due to the blockage of its nuclear export and degradation, activation of MDM2 expression, and activation of other p53-regulated genes and the p53 pathway. Furthermore, these events cause cell cycle arrest in the G1 and G2 phases and/or apoptosis.

In the present study, we demonstrated that LQFM030 induced the accumulation of the p53 protein and activated the p53 pathway through an enhancement of the p21 and p27 proteins. The compound caused cell cycle arrest in G1 phase and was cytotoxic to EAT cells, leading to death via apoptosis, as indicated by the apoptotic morphology of the cells, DNA fragmentation, PS externalization, and activation of initiators and effector caspases.

However, unlike nutlins, LQFM030 caused a decrease in the expression of the MDM2 protein, in essence acting as an inhibitor of MDM2. These results

corroborate the findings of ref. 22, showing that a benzofuroxan derivative, XI-011, designed to inhibit the p53-MDMX interaction caused a decrease in MDMX, an MDM2 homolog, and the activation of p53, leading to the death of breast cancer cell. It is worth noting that EATs are derived from murine breast carcinoma.

Ref. 20 also demonstrated a decrease in the expression of the MDM2 protein after the treatment of osteosarcoma cells with nutlin-3. In addition, these authors demonstrated that nutlin-3 promoted anti-proliferative and cytotoxic effects on osteosarcoma cells due to G1 cell cycle arrest, an increase in p53 and p21, and apoptosis both *in vitro* and *in vivo*.

Under normal circumstances, the intracellular concentration of MDM2 is typically very low²², but there is an increase in MDM2 expression in tumor cells, and increased expression of MDM2 or MDMX inhibits the function of p53³. The treatment of EAT cells with LQFM030 was able to reduce the MDM2 levels and increase p53. In addition to reducing MDMX expression, compound XI-011 promoted increases in p53 and p21 and the retention of the cell cycle in the G0/G1 phase and increased the number of TUNEL-positive cells, with more than 40% of breast cancer cells becoming apoptotic after 5 days of treatment. These results corroborate our results obtained with the treatment of EAT cells with compound LQFM030, though the EAT cells began to show apoptotic characteristics after only 24 h of treatment.

In this study, we demonstrate a significant increase in the number of cells in the G1 phase of the cell cycle and the nearly complete depletion of cells in S phase, corroborating the findings of ref. 1 after nutlin-1 treatment in tumor cells. Moreover, the treatment of EAT cells with LQFM030 showed a dose-dependent antiproliferative and cytotoxic activity, with IC₅₀ values of 0.81 and 0.10 mM after

24 and 48 h, respectively. However, treatment of different tumor cell lines with nutlin-1 for 5 days (120 h) presented IC₅₀ values between 1.4 and 1.8 μ M, demonstrating that the novel compound LQFM030, a simplified analog of nutlin-1, could be more potent than the original molecule.

Moreover, the treatment of human breast adenocarcinoma and colon carcinoma cells with a new series of indoline-3,2'-thiazolidine-derivative p53-modulating compounds also presented anti-proliferative effects, inhibited the p53-MDM2 interaction by increasing p53, p21, p27 and MDM2 levels, and induced apoptosis by caspase 3 activation, without significantly affecting the cell cycle²⁴.

The treatment of gastric cancer and hepatoblastoma cells with the new compound PK7088 also promoted a reduction in cell viability, increase in p53 and p21 protein levels, cell cycle arrest, induction of caspase 3, and apoptosis, with no effect on the p53 mRNA level²⁵, consistent with our findings.

Colon cancer cell lines treated with nutlin-1 exhibited an increase in the levels of p53, p21, and MDM2 proteins. To confirm that the accumulation of p53 was due to the decreased degradation of the protein rather than elevated expression of the p53 gene, ref. 1 treated three wild-type p53 cancer cell lines with nutlin-1 and monitored the expression of the p53 gene by RT-PCR, observing that the transcription of the p53 gene was unaffected by nutlin-1 and indicating that p53 was up-regulated by nutlins in a posttranslational manner. The treatment of EAT cells with LQFM030 was also found to not affect the transcription of the p53 gene.

In parallel, after treatment of EAT cells with LQFM030 for 24 hours, we observed several cells displaying the morphological features of apoptosis, such as membrane blebbing, vacuolization, nuclear fragmentation, and shrinking nuclei, by light and fluorescence microscopy. Indeed, approximately 38% of cells showed DNA

fragmentation. In contrast ref. 1 after 24 h of treatment of tumor cells with nutlin-3, with 45% of the cells becoming TUNEL positive only after 48 h of incubation.

Caspases are the principal effectors of apoptosis, and their activation leads to characteristic morphological changes to the cell²³. We demonstrated the activation of caspases 8, 9, and 3 after treatment of EAT cells with LQFM030. The activation of caspases 8 and 9 suggests the involvement of both the intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis, culminating in the activation of caspase 3 and cell death.

Our results demonstrate that a simplified analog of nutlin-1, LQFM030, possesses an inhibitory activity on the p53-MDM2 interaction, reactivating p53 and its main functions, cell cycle arrest and apoptosis. These results suggest that the small molecule p53 activator LQFM030 could be of value in the development of a novel cancer therapeutic agent.

5. Acknowledgements

This study was supported by Fundação de Apoio à Pesquisa (FUNAPE)-UFG, Goiânia–GO, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudo e Projetos (FINEP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

6. References

1. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, *et al.* In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*. 2004; **303**: 844-848.
2. Secchiero P, Bosco R, Celeghini C, Zauli G.. Recent advances in the therapeutic perspectives of nutlin-3. *Curr Pharm Des*. 2011; **17**: 569-577.
3. Shen H and Maki CG. Pharmacologic Activation of p53 by Small-Molecule MDM2 Antagonists. *Curr Pharm Des*. 2011; **17**: 560-568.
4. Guo Z, Zhuang C, Zhu L, Zhang Y, Yao J, Dong G, *et al.* Structure-activity relationship and antitumor activity of thio-benzodiazepines as p53-MDM2 protein-protein interaction inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2012; **56**: 10-16.
5. Mir R, Tortosa A, Martinez-Soler F, Vidal A, Condom E, Pérez-Perarnau A, *et al.* Mdm2 antagonists induce apoptosis and synergize with cisplatin overcoming chemoresistance in TP53 wild-type ovarian cancer cells. *Int J Cancer*. 2013; **132**: 1525-1536.
6. Saha MN, Qiu L, Chang H. Targeting p53 by small molecules in hematological malignancies. *J Hematol Oncol*. 2013; **6**: 1-9.
7. Chattopadhyay S, Das T, Sa G, Ray PK. Protein A-activated macrophages induce apoptosis in Ehrlich's ascites carcinoma through a nitricoxide-dependent pathway. *Apoptosis*. 2002; **7**: 49-57.
8. Das T, Sa G, Chattopadhyay S, Ray PK.. Protein A-induced apoptosis of cancer cells is effected by soluble immune mediators. *Cancer Immunol Immunother*. 2002; **51**: 376-380.
9. Janouskova H, Ray AM, Noulet F, Lelong-Rebel I, Choulier L, Schaffner F, *et al.* Activation of p53 pathway by Nutlin-3a inhibits the expression of the therapeutic target $\alpha 5$ integrin in colon cancer cells. *Cancer Lett*. 2013; **336**: 307-318.
10. Mota MF, Benfica PL, Batista AC, Martins FS, Paula JR, Valadares MC. Investigation of Ehrlich ascites tumor cells death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. *J Ethnopharmacol*. 2012; **139**: 319-329.
11. Hu X, Yu AX, Qi BW, Fu T, Wu G, Zhou M, *et al.* The expression and significance of IDH1 and p53 in Osteosarcoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010; **29**: 1-10.
12. Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, Higgins B, Kolinsky K, Hilton H, *et al.* Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: Implications for therapy. *PNAS*. 2006; **103**: 1888-1893.

13. Cheok CF, Dey A, Lane DP. Cyclin-dependent kinase inhibitors sensitize tumor cells to nutlin-induced apoptosis: a potent drug combination. *Mol Cancer Res.* 2007; **5**: 1133-1145.
14. Secchiero P, di Iasio MG, Gonelli A, Zauli G. The MDM2 Inhibitor Nutlins as an Innovative Therapeutic Tool for the Treatment of Haematological Malignancies. *Curr Pharm Des.* 2008; **14**: 2100-2110.
15. Miyachi M, Kakazu N, Yagyu S, Katsumi Y, Tsubai-Shimizu S, Kikuchi K, *et al.* Restoration of p53 Pathway by Nutlin-3 Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Rhabdomyosarcoma Cells. *Clin Cancer Res.* 2009; **15**: 4077-4084.
16. Pishas KI, Al-Ejeh F, Zinonos I, Kumar R, Evdokiou A, Brown MP, *et al.* Nutlin-3a is a Potential Therapeutic for Ewing Sarcoma. *Clin Cancer Res.* 2011; **17**: 494-504.
17. Ghassemifar S and Mendrysa SM. MDM2 antagonism by nutlin-3 induces death in human medulloblastoma cells. *Neurosci Lett.* 2012; **513**: 106-110.
18. Künkele A, De Preter K, Heukamp L, Thor T, Pajtler KW, Hartmann W, *et al.* Pharmacological activation of the p53 pathway by nutlin-3 exerts anti-tumoral effects in medulloblastomas. *Neuro Oncol.* 2012; **14**: 859–869.
19. Ye F, Lattif AA, Xie J, Weinberg A, Gao S. Nutlin-3 induces apoptosis, disrupts viral latency and inhibits expression of angiopoietin-2 in Kaposi sarcoma tumor cells. *Cell Cycle.* 2012; **11**: 1393-1399.
20. Wang B, Fang L, Zhao H, Xiang T, Wang D. MDM2 inhibitor Nutlin-3a suppresses proliferation and promotes apoptosis in osteosarcoma cells. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2012; **44**: 685-691.
21. Park EJ, Choi KS, Yoo YH, Kwon TK. Nutlin-3, a small-molecule MDM2 inhibitor, sensitizes Caki cells to TRAIL-induced apoptosis through p53-mediated PUMA upregulation and ROS-mediated DR5 upregulation. *Anticancer Drugs.* 2013; **24**: 260–269.
22. Wang H and Yan C. A small-molecule p53 activator induces apoptosis through inhibiting MDMX expression in breast cancer cells. *Neoplasia.* 2011; **13**: 611-619.
23. Costa OD. A novel therapeutic strategy for inhibiting the MDM2-p53 interaction in cancer? *TSMJ.* 2005; **6**: 74-77.
24. Bertamino A, Soprano M, Musella S, Rusciano MR, Sala M, Vernieri E, *et al.* Synthesis, in vitro, and in cell studies of a new series of [Indoline-3,2'-thiazolidine]-based p53 modulators. *J Med Chem.* 2013; **56**: 5407-5421.
25. Liu X, Wilcken R, Joerger AC, Chuckowree IS, Amin J, Spencer J, *et al.* Small molecule induced reactivation of mutant p53 in cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 2013; **41**: 6034-6044.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O composto LQFM030 inibiu o crescimento do tumor dos animais portadores do TAE de maneira dose-dependente através da redução do volume tumoral, do volume do líquido ascítico, do número de células tumorais e da angiogênese peritoneal. Houve ainda uma tendência de redução na produção de VEGF;
- O composto não promoveu alterações significativas nos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais portadores do TAE e o tratamento não restabeleceu as alterações hematológicas e bioquímicas provocadas pelo tumor;
- Após o tratamento *in vivo* com o composto LQFM030, houve aumento na expressão das proteínas apoptóticas p53 e p21 e das caspases 3, 8 e 9, demonstrando que a atividade antitumoral *in vivo* do composto LQFM030 ocorre pela via apoptótica;
- No tratamento *in vitro* o composto LQFM030 apresentou atividade antiproliferativa e citotoxicidade concentração-dependente e tempo-dependente em células do TAE;
- O composto LQFM030 ativou a via de p53 nas células do TAE. O composto foi capaz de promover o aumento das proteínas p53, p21 e p27 e a redução da proteína MDM2, levando à retenção do ciclo celular em G1, substancial redução da fase S e ativação das caspases 8, 9 e 3;

- A morte das células do TAE por apoptose após o tratamento com o composto LQFM030 foi confirmada ainda pelas alterações na morfologia celular e nuclear, pela fragmentação de DNA e pela externalização da fosfatidilserina;
- O composto não alterou a expressão do gene p53, demonstrando que a ativação da proteína e consequentemente da via p53 foi um mecanismo pós-transcricional, ou seja, provavelmente foi promovido pelo composto.

Assim como os nutlins, o composto 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. Esses resultados sugerem que LQFM030 é um interessante candidato no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos antitumorais.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, S. S.; SARASWATI, S.; MATHUR, R.; PANDEY, M. Antitumor properties of Boswellic acid against Ehrlich ascites cells bearing mouse. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n.9, p. 1924-1934, 2011.

ANISIMOV, V. N.; UKRAINTSEVA, S. V.; YASHIN, A. I. Cancer in rodents: does it tell us about cancer in humans? **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 807-819, 2005.

BAI, L.; ZHU, W. G. p53: structure, function and therapeutic applications. **Journal of Cancer Molecules**, v. 2, n. 4, p. 141-153, 2006.

BATTACHARYYA, A. B.; CHOUDHURI, T.; PAL, S.; CHATTOPADHYAY, S.; DATTA, G. K.; SA, G.; DAS, T. Apoptogenic effects of black tea on Ehrlich's ascites carcinoma cell. **Carcinogenesis**, v. 24, n.1, p. 75-80, 2003.

BERTAMINO, A.; SOPRANO, M.; MUSELLA, S.; RUSCIANO, M. R.; SALA, M.; VERNIERI, E.; DI SARNO, V.; LIMATOLA, A.; CAROTENUTO, A.; COSCONATI, S.; GRIECO, P.; NOVELLINO, E.; ILLARIO, M.; CAMPIGLIA, P. GOMEZ-MONTERREY, I. Synthesis, in vitro, and in cell studies of a new series of [Indoline-3,2'-thiazolidine]-based p53 modulators. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, p. 5407-5421, 2013.

BODE, A. M.; DONG, Z. Cancer prevention research – then and now. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 508-516, 2009.

BOLETI, A. P. A.; VENTURA, C. A.; JUSTO, G. Z.; SILVA, R. A.; SOUSA A. C. T.; FERREIRA, C. V.; YANO, T.; MACEDO, M. L. R. Pouterin, a novel potential cytotoxic lectin-like protein with apoptosis-inducing activity in tumorigenic mammalian cells. **Toxicon**, v. 51, p. 1321-1330, 2008.

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011. 118 p.

BREHMER, J. S. **Estudo de extrato de plantas medicinais no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí. 2005. 72 p.

BROMBERG, N.; DREYFUSS, J. L.; REGATIERI, C. V.; PALLADINO, M. V.; DURAN, N.; NADER, H. B.; HAUN, M.; JUSTO, G. Z. Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. **Chemico-Biological Interactions**, v. 186, p. 43-52, 2010.

CARVALHO, F. S. **Avaliação farmacológica e toxicológica de novos candidatos a protótipos de fármacos antitumorais**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás. 2011. 98 p.

CHAVALA, S. H.; KIM, Y.; TUDISCO, L.; CICATIELLO, V.; MILDE, T.; KERUR, N.; CLAROS, N.; YANNI, S.; GUAQUIL, V. H.; HAUSWIRTH, W. W.; PENN, J. S.; RAFII, S.; DE FALCO, S.; LEE, T. C.; AMBATI, J. Retinal angiogenesis suppression through small molecule activation of p53. **The Journal of Clinical Investigation**, 2013.

CHATTOPADHYAY, S.; DAS, T.; SA, G.; RAY, P. K. Protein A-activated macrophages induce apoptosis in Ehrlich's ascites carcinoma through a nitric oxide-dependent pathway. **Apoptosis**, v. 7, p. 49-57, 2002.

CHEOK, C. F.; DEY, A.; LANE, D. P. Cyclin-dependent kinase inhibitors sensitize tumor cells to nutlin-induced apoptosis: a potent drug combination. **Molecular Cancer Research**, v. 5, p. 1133-1145, 2007.

CHOUDHURY, S. M.; GUPTA, M.; MAJUMDER, U. K. Antineoplastic activities of MT81 and its structural analogue in ehrlich ascites carcinoma-bearing swiss albino mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n.1, p. 61-70, 2010.

COLL-MULET, L.; IGLESIAS-SERRET, D.; SANTIDRIÁN, A. F.; COSIALLS, A. M.; DE FRIAS, M.; CASTAÑO, E.; CAMPÀS, C.; BARRAGÁN, M.; DE SEVILLA, A. F.; DOMINGO, A.; VASSILEV, L. T.; PONS, G.; GIL, J. MDM2 antagonists activate p53 and synergize with genotoxic drugs in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. **Blood**, v. 107, p. 4109-4114, 2006.

COSTA, O. D. A novel therapeutic strategy for inhibiting the MDM2-p53 interaction in cancer? **Trinity Student Medical Journal**, v.6, p. 74-77, 2005.

CUMMINGS, J.; WARD, T. H.; RANSON, M.; DIVE, C. Apoptosis pathway-target drugs – from the bench to the clinic. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1705, p. 53-66, 2004.

DAS, T.; SA, G.; CHATTOPADHYAY, S.; RAY, P. K. Protein A-induced apoptosis of cancer cells is effected by soluble immune mediators. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v. 51, p. 376-380, 2002.

DAS, T.; BHATTACHARYA, S.; HALDER, B.; BISWAS, A.; GUPTA, S. D.; GOMES, A.; GOMES, A. Cytotoxic and antioxidant property of a purified fraction (NN-32) of Indian *Naja naja* venom on Ehrlich ascites carcinoma in BALB/c mice. **Toxicon**, v. 57, p. 1065-1072, 2011.

DE OLIVEIRA, C. H. A.; MAIRINK, L. M.; PAZINI, F.; LIÃO, L. M.; DE OLIVEIRA, A. L.; VIEGAS Jr., C.; DE OLIVEIRA, V.; CUNHA, L. C.; OLIVEIRA, F. G. F.; PAZ Jr., J. L.; EBERLIN, M. N.; MENEGATTI, R. Chemoselective and Regiospecific Formylation of 1-Phenyl-1H-pyrazoles Through the Duff Reaction. **Synthetic Communications**, v. 43, p. 1633-1639, 2013.

DIMASI, J. A.; HANSEN, R. W.; GRABOWSKI, H. G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. **Journal of Health Economics**, v. 22, p. 151-185, 2003.

D'SOUZA, S. S.; GURURAJ, A. E.; RAJ, H. M.; RÖSSLER, J.; SALIMATH, B. P. Inhibition of ascites tumor growth *in vivo* by sTie-2 is potentiated by a combinatorial therapy with sFLT-1. **The Journal of Gene Medicine**, v. 12, p. 968-980, 2010.

EL-AZAB, M.; HISHE, H.; MOUSTAFA, Y.; EL-AWADY, E. S. Anti-angiogenic effect of resveratrol or curcumin in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 652, p. 7-14, 2011.

FINAR, I. L.; GODFREY, K. E. **Journal of the Chemical Society**, 1954.

FRY, D. C.; EMERSON, S. D.; PALME, S.; VU, B. T.; LIU, C. M.; PODLASKI, F. NMR structure of a complex between MDM2 and a small molecule inhibitor. **Journal of Biomolecular**, v. 30, p. 163–173, 2004.

GAMBERO, S.; SECCO, V. N. D. P.; FERREIRA, R. R.; DEFFUNE, E.; MACHADO, P. E. A. Frequência de hemolisinas anti-A e anti-B em doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 1, p. 28-34, 2004.

GHASSEMIFAR, S.; MENDRYSA, S. M. MDM2 antagonism by nutlin-3 induces death in human medulloblastoma cells. **Neuroscience Letters**, v. 513, p. 106-110, 2012.

GLOBOCAN. Estimated cancer incidence, mortality, prevalence and disability-adjusted life years (DALYs) worldwide in 2008. Internacional Agency for Research on cancer (IARC), World Health Organization, 2008.

GUO, Z.; ZHUANG, C.; ZHU, L.; ZHANG, Y.; YAO, J.; DONG, G.; WANG S.; LIU, Y.; CHEN, H.; SHENG, C.; MIAO, Z.; ZHANG, W. Structure-activity relationship and antitumor activity of thio-benzodiazepines as p53-MDM2 protein-protein interaction inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, p. 10-16, 2012.

HARRIS, S. L.; LEVINE, A. J. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. **Oncogene**, v. 24, p. 2899–2908, 2005.

HECTOR, S.; PREHN, J. H. M. Apoptosis signaling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: A review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1795, p. 117-129, 2009.

HOELDER, S.; CLARKE, P. A.; WORKMAN, P. Discovery of small molecule cancer drugs: Successes, challenges and opportunities. **Molecular Oncology**, v. 6, p. 155-176, 2012.

HU, X.; YU, A. X.; QI, B. W.; FU, T.; WU, G., ZHOU, M.; LUO, J.; XU, J. H. The expression and significance of IDH1 and p53 in Osteosarcoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 29, p. 1-10, 2010.

JANOUSKOVA, H.; RAY, A. M.; NOULET, F.; LELONG-REBEL, I.; CHOULIER, L.; SCHAFFNER, F.; LEHMANN, M.; MARTIN, S.; TEISINGER, J.; DONTENWILL, M. Activation of p53 pathway by Nutlin-3a inhibits the expression of the therapeutic target $\alpha 5$ integrin in colon cancer cells. **Cancer Letters**, v. 336, p. 307-318, 2013.

KANNAN, K.; JAIN, S. K. Oxidative stress and apoptosis. **Pathophysiology**, v. 7, n. 27, p. 153- 163, 2000.

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

KOJIMA, K.; KONOPLEVA, M.; SAMUDIO, I. J.; SHIKAMI, M.; CABREIRA-HANSEN, M.; MCQUEEN, T.; RUVOLO, V.; TSAO, T.; ZENG, Z.; VASSILEV, L. T.; ANDREEFF, M. MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy. **Blood**, v. 106, p. 3150-1359, 2005.

KOJIMA, K.; KONOPLEVA, M.; SAMUDIO, I. J.; SCHOBBER, W. D.; BORNMANN, W. G.; ANDREEFF, M. Concomitant inhibition of MDM2 and Bcl-2 protein function synergistically induce mitochondrial apoptosis in AML. **Cell Cycle**, v. 5, p. 2778-2786, 2006.

KOJIMA, K.; KONOPLEVA, M.; MCQUEEN, T.; O'BRIEN, S.; PLUNKETT, W.; ANDREEFF, M. Mdm2 inhibitor nutlin-3A induces p53-mediated apoptosis by transcription-dependent and transcription-independent mechanisms and may overcome Atm-mediated resistance to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 108, p. 993-1000, 2006.

KOJIMA, K.; KONOPLEVA, M.; SAMUDIO, I. J.; RUVOLO, V.; ANDREEFF, M. Mitogen-activated protein kinase inhibition enhances nuclear proapoptotic function of p53 in acute myelogenous leukemia cells. **Cancer Research**, v. 67, p. 3210-3219, 2007.

KUMAR, A.; D'SOUZA, S. S.; NAGARAJ, S. R. M.; GAONKAR, S. L.; SALIMATH, B. P.; RAI, K. M. L. Antiangiogenic and antiproliferative effects of substituted-1,3,4-oxadiazole derivatives is mediated by down regulation of VEGF and inhibition of translocation of HIF-1 α in Ehrlich ascites tumor cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 64, p. 1221-1233, 2009.

KUMAR, A.; MALIK, F.; BHUSHAN, S.; SHAH, B. A.; TANEJA, S. C.; PAL, H. C.; WANI, Z. A.; MONDHE, D. M.; KAUR, J.; SINGH, J. A novel parthenin analog exhibits anti-cancer activity: Activation of apoptotic signaling events through robust NO formation in human leukemia HL-60 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 193, n. 3, p. 204-215, 2011.

KÜNKELE, A.; DE PRETER, K.; HEUKAMP, L.; THOR, T.; PAJTLER, K. W.; HARTMANN, W.; MITTELBRONN, M.; GROTZER, M. A.; DEUBZER, H. E.; SPELEMAN, F.; SCHRAMM, A.; EGGERT, A.; SCHULTE, J. H. Pharmacological activation of the p53 pathway by nutlin-3 exerts anti-tumoral effects in medulloblastomas. **Neuro-Oncology**, v. 14, p. 859–869, 2012.

LANE, D. P.; BROWN, C. J.; VERMA, C.; CHEOK, C. F. New insights into p53 based therapy. **Discovery Medicine**, v. 6, p. 107–117, 2011.

LIU, X.; WILCKEN, R.; JOERGER, A. C.; CHUCKOWREE, I. S.; AMIN, J.; SPENCER, J.; FERSHT, A. R. Small molecule induced reactivation of mutant p53 in cancer cells. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 6034-6044, 2013.

MALINOWSKY, K.; WOLFF, C.; GÜNDISCH, S.; BERG, D.; BECKER, K. F. Targeted therapies in cancer - challenges and chances offered by newly developed techniques for protein analysis in clinical tissues. **Journal of Cancer**, v. 2, p. 26-35, 2011.

MANUJENDRA, N.; SAHA, L. Q.; HONG, C. Targeting p53 by small molecules in hematological malignancies. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 6, 2013.

MIR, R.; TORTOSA, A.; MARTINEZ-SOLER, F.; VIDAL, A.; CONDOM, E.; PÉREZ-PERARNAU, A.; RUIZ-LARROYA, T.; GIL, J.; GIMÉNEZ-BONAFÉ, P. Mdm2 antagonists induce apoptosis and synergize with cisplatin overcoming chemoresistance in TP53 wild-type ovarian cancer cells. **International Journal of Cancer**, v. 132, p. 1525-1536, 2013.

MIYACHI, M.; KAKAZU, N.; YAGYU, S.; KATSUMI, Y.; TSUBAI-SHIMIZU, S.; KIKUCHI, K.; TSUCHIYA, K.; IEHARA, T.; HOSOI, H. Restoration of p53 Pathway by Nutlin-3 Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Rhabdomyosarcoma Cells. **Clinical Cancer Research**, v. 15, p. 4077-4084, 2009.

MOTA, M. F. **Investigação da mielotoxicidade e do potencial indutor de morte celular de *Synadenium umbellatum* pax. em células do tumor ascítico de Ehrlich**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás. 2010.115 p.

MOTA, M. F.; BENFICA, P. L.; BATISTA, A. C.; MARTINS, F. S.; PAULA, J. R.; VALADARES, M. C. Investigation of Ehrlich ascites tumor cells death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 319-329, 2012.

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

PARK, J. H.; LEE, S.; KIM, J. H.; PARK, K.; KIM, K.; KWON, I. C. Polymeric nanomedicine for cancer therapy. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 1, p.113-137, 2008.

PARK, E.J.; CHOI, K.S.; YOO, Y.H.; KWON, T.K. Nutlin-3, a small-molecule MDM2 inhibitor, sensitizes Caki cells to TRAIL-induced apoptosis through p53-mediated PUMA upregulation and ROS-mediated DR5 upregulation. **Anti-Cancer Drugs**, v. 24, p. 260–269, 2013.

PATTERSON, D. M.; GAO, D.; TRAHAN, D. N.; JOHNSON, B. A.; LUDWIG, A.; BARBIERI, E.; CHEN, Z.; DIAZ-MIRON, J.; VASSILEV, L.; SHOHET, J. M.; KIM, E. S. Effect of MDM2 and vascular endothelial growth factor inhibition on tumor angiogenesis and metastasis in neuroblastoma. **Angiogenesis**, v. 14, p. 255-266, 2011.

PEI, D.; ZHANG, Y.; ZHENG, J. Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and MdmX. **Oncotarget**, v. 3, p. 228–235, 2012.

PELLEGRINI, M. P.; PINTO, R. C. V.; CASTILHO, L. R. Mecanismos de crescimento e morte de células animais cultivadas *in vitro*. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologias do cultivo de células animais**. São Paulo: Roca, 2008. Cap. 7, p. 138- 169.

PISHAS, K. I.; AL-EJEH, F.; ZINONOS, I.; KUMAR, R.; EVDOKIOU, A.; BROWN, M. P.; CALLEN, D. F.; NEILSEN, P. M. Nutlin-3a Is a Potential Therapeutic for Ewing Sarcoma. **Clinical Cancer Research**, v. 17, p. 494-504, 2011.

SAHA, M. N.; QIU, L.; CHANG, H. Targeting p53 by small molecules in hematological malignancies. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 6, n. 23, p. 1-9, 2013.

SECCHIERO, P.; BARBAROTTO, E.; TIRIBELLI, M.; ZERBINATI, C.; DI IASIO, M. G.; GONELLI, A.; CAVAZZINI, F.; CAMPIONI, D.; FANIN, R.; CUNEO, A.; ZAULI, G. Functional integrity of the p53-mediated apoptotic pathway induced by the nongenotoxic agent nutlin-3a in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). **Blood**, v. 107, p. 4122-4129, 2006.

SECCHIERO, P.; DI IASIO, M. G.; GONELLI, A.; ZAULI, G. The MDM2 Inhibitor Nutlins as an Innovative Therapeutic Tool for the Treatment of Haematological Malignancies. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 2100-2110, 2008.

SECCHIERO, P.; BOSCO, R.; CELEGHINI, C.; ZAULI, G. Recent advances in the therapeutic perspectives of nutlin-3. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 569-577, 2011.

SEGAWA, K.; SUZUKI, J.; NAGATA, S. Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells. **PNAS**, v. 108, n. 48, p. 19246-19251, 2011.

SELIVANOVA, G. Therapeutic targeting of p53 by small molecules. **Seminars in Cancer Biology**, v. 6, p. 46–56, 2010.

SHANGARY, S.; WANG, S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 6, p. 223–241, 2009.

SHEN, H.; MAKI, C. G. Pharmacologic Activation of p53 by Small-Molecule MDM2 Antagonists. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 560-568, 2011.

SINGHAL, S.; VACHANI, A.; ANTIN-OZERKIS, D.; KAISER, L. R.; ALBELDA, S. M. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non - small cell lung cancer: A review. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 11, p. 3974-3986, 2005.

SUDDEK, G. M. Sunitinib improves chemotherapeutic efficacy and ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in experimental animals. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 67, p. 1035-1044, 2011.

STÜHMER, T.; CHATTERJEE, M.; HILDEBRANDT, M.; HERRMANN, P.; GOLLASCH, H.; GERECKE, C.; THEURICH, S.; CIGLIANO, L.; MANZ, R. A.; DANIEL, P. T.; BOMMERT, K.; VASSILEV, L. T.; BARGOU, R. C. Nongenotoxic activation of the p53 pathway as a therapeutic strategy for multiple myeloma. **Blood**, v. 106, p. 3609-3617, 2005.

TOVAR, C.; ROSINSKI, J.; FILIPOVIC, Z.; HIGGINS, B.; KOLINSKY, K.; HILTON, H.; ZHAO, X.; VU, B. T.; QING, W.; PACKMAN, K.; MYKLEBOST, O.; HEIMBROOK, D. C.; VASSILEV, L. T. Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: Implications for therapy. **PNAS**, v. 103, p. 1888–1893, 2006.

UMAR, A.; DUNN, B. K.; GREENWALD, P. Future directions in cancer prevention. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, p. 835-848, 2012.

UPADHYAY, K. K.; MISHRA, A. K.; CHUTTANI, K.; KAUL, A.; SCHATZ, C.; LE MEINS, J. F.; MISRA, A.; LECOMMANDOUX, S. The in vivo behavior and antitumor activity of doxorubicin-loaded poly(γ -benzyl L-glutamate)-block-hyaluronan polymersomes in Ehrlich ascites tumor-bearing BalB/c mice. **Nanomedicine**, v. 8, n. 1, p. 71 – 80, 2012.

VAN STAVEREN, W. C. G.; WEISS SOLÍS, D. Y.; HÉBRANT, A.; DETOURS, V.; DUMONT, J. E.; MAENHAUT, C. Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1795, p. 92-103, 2009.

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, p. 844-848, 2004.

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

VIRAL, D.; SHIVANAND, P.; JIVANI, N. P. Anticancer evaluation of *Adiantum venustum* Don. **Journal of Young Pharmacists**, v. 3, n.1, p. 48-54, 2011.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A. J. Surfing the p53 network. **Nature**, v. 408, p. 307-310, 2000.

VOLTAN, R.; SECCHIERO, P.; RUOZI, B.; CARUSO, L.; FORNI, F.; PALOMBA, M.; ZAULI, G.; VANDELLI, M. A. Nanoparticles loaded with Nutlin-3 display cytotoxicity towards p53(wild-type) JVM-2 but not towards p53(mutated) BJAB leukemic cells. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 2712-22, 2013.

XIONG, J.; YANG, Q.; LI, J.; ZHOU, S. Effects of MDM2 inhibitors on vascular endothelial growth factor-mediated tumor angiogenesis in human breast cancer. **Angiogenesis**, 2013.

WANG, W.; EL-DEIRY, W. S. Restoration of p53 to limit tumor growth. **Current Opinion in Oncology**, v. 6, p. 90–96, 2008.

WANG, L.; ZHANG, X. Y.; XU, L.; LIU, W. J.; ZHANG, J.; ZHANG, J. P. Expression and significance of p53 and mdm2 in atypical intestinal metaplasia and gastric carcinoma. **Oncology Letters**, v. 2, p. 707-712, 2011.

WANG, H.; YAN, C. A small-molecule p53 activator induces apoptosis through inhibiting MDMX expression in breast cancer cells. **Neoplasia**, v. 13, p. 611-619, 2011.

WIMAN, K. G. Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to cancer patient. **Oncogene**, v. 6, p. 4245–4252, 2010.

YE, F.; LATTIF, A. A.; XIE, J.; WEINBERG, A.; GAO, S. Nutlin-3 induces apoptosis, disrupts viral latency and inhibits expression of angiopoietin-2 in Kaposi sarcoma tumor cells. **Cell Cycle**, v. 11, p. 1393-1399, 2012.

ZABKIEWICZ, J.; CLARKE, A. R. DNA damage-induced apoptosis: insights from the mouse. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1705, p.17-25, 2004.

ZHOU, S.; GU, L.; HE, J.; ZHANG, H.; ZHOU, M. MDM2 regulates vascular endothelial growth factor mRNA stabilization in hypoxia. **Molecular and Cellular Biology**, v. 31, p. 4928–4937, 2011.

ANEXOS

Anexo 1 – Tampão de lise celular :

- 0,1% de citrato de sódio
- 0,1% de triton X-100
- 2 µg/mL de iodeto de propídio