

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA-RENORBIO

GLAUCIA VERÍSSIMO FAHEINA MARTINS

**POTENCIAL ANTICÂNCER E ANTI-INFLAMATÓRIO DE ADUTOS DE
MORITA BAYLIS-HILLMAN**

João Pessoa - PB

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA-RENORBIO

GLAUCIA VERÍSSIMO FAHEINA MARTINS

**POTENCIAL ANTICÂNCER E ANTI-INFLAMATÓRIO DE ADUTOS DE
MORITA BAYLIS-HILLMAN**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Renorbio, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como pré-requisito parcial para obtenção do título de doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Demetrius A. M. Araújo

João Pessoa - PB

2015

M386p Martins, Glaucia Veríssimo Faheina.
Potencial anticâncer e anti-inflamatório de adutos de Morita
Baylis-Hillman / Glaucia Veríssimo Faheina Martins.- João
Pessoa, 2015.
152f. : il.
Orientador: Demetrius A. M. Araújo
Tese (Doutorado) - UFPB/CB
1. Biotecnologia. 2. Adutos de Morita Baylis-Hillman.
3. Células de leucemia mielóide humana K562. 4. Apoptose.
5. Canais iônicos. 6. Ciclo celular.

UFPB/BC

CDU: 60(043)

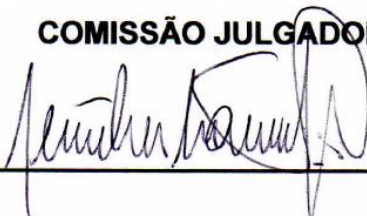
GLAUCIA VERÍSSIMO FAHEINA MARTINS

**POTENCIAL ANTICÂNCER E ANTI-INFLAMATÓRIO DE ADUTOS DE
MORITA BAYLIS-HILLMAN**

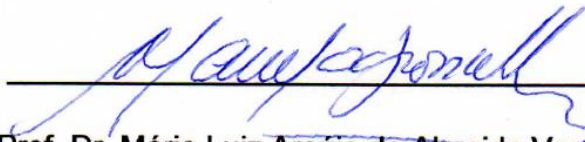
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Renorbio, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como pré-requisito para obtenção do título de doutor em Biotecnologia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

Data da defesa: 29 de maio de 2015.

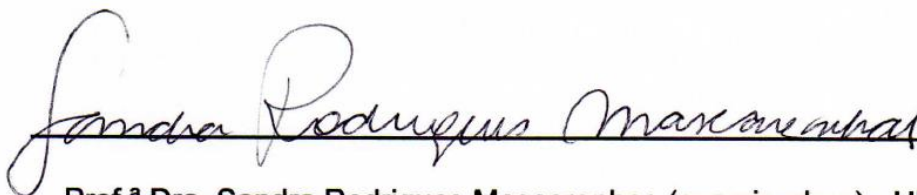
COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Demetrius Antônio Machado de Araújo (Orientador/Presidente) – UFPB



Prof. Dr. Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos (examinador) - UFPB



Prof.ª Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas (examinadora) - UFPB



Prof.ª Dra. Patrícia Mirella da Silva Scardua (examinadora) - UFPB



Prof.ª Dra. Teresinha Gonçalves da Silva (examinadora) - UFPE

Aos meus amados filhos: Gabriel e Bernardo

Ao meu esposo Paulo Rogério e

Aos meus pais Gualberto e Marluce

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu maravilhoso Deus pelo dom da vida e pelo cuidado comigo até aqui. Me erguestes nos momentos difíceis e me fizeste acreditar que eu sou capaz, que mesmo as circunstâncias sendo contrárias eu poderia realizar meus sonhos profissionais e pessoais.

Ao meu esposo, Paulo Rogério P. Martins, por estar ao meu lado em mais esta etapa de minha vida. Obrigada pela paciência, sei que não foi fácil as minhas ausências e aguentar os estresses desse doutorado, mas confio que haverá uma recompensa e que nós teremos muito tempo e histórias boas para compartilhar juntos.

Ao meu giga filho Gabriel Faheina por existir em minha vida. Tenho certeza que você fez a grande diferença na minha vida, pois quando olho para trás e vejo que consegui tantas coisas, lembro que você sempre esteve comigo dizendo “relaxe” vai dar certo. E agora vejo você trilhando o caminho da pesquisa, meu futuro Químico.

Ao meu pequeno Bernardo, que chegou durante a finalização do meu doutorado e foi um grande presente de Deus em minha vida, pois me fez enxergar que ser mãe é na verdade o título mais prazeroso que eu poderia ter na vida. Seu sorriso é precioso e renova as minhas forças a cada dia.

Aos meus pais, Gualberto e Marluce Faheina, por todo amor, apoio, preocupação e bons exemplos, que me alicerçaram na caminhada da vida. Em especial ao meu pai que tem cuidado da minha mãe nos momentos de enfermidade, permitindo que eu tivesse mais tranquilidade sabendo que ela está sendo cuidada. Agradeço também pelas orações constantes que me sustentam até hoje.

Aos meus filhos Rayane Martins, Aline Martins e Daniel Martins, por existirem na minha vida e me permitirem ter o sentimento de possuir: “A grande família”.

A toda minha família que sempre torceu por mim, principalmente meu irmão Glauber Faheina e minha cunhada Evelyn Faheina, pelo incentivo e por compartilhar momentos tão especiais nessa fase do doutorado, e me conceder a benção de ter uma sobrinha tão linda como a pequena Emíly.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Demetrius Araújo, pelo apoio e incentivo durante toda minha formação acadêmica. Por permitir que o meu crescimento e amadurecimento científico fosse pleno. Por me receber sempre com aquele sorriso e dizendo; “diga Glaucinha” o que você quer? Nunca mediu esforços para conseguir investimentos e suporte para realização dos nossos trabalhos. Contudo, agradeço principalmente por proporcionar um ambiente saudável, alegre e estimulador para a realização das pesquisas em seu laboratório.

Aos alunos do grupo de citotoxicidade do Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular (LBCM), em especial a Msc. Bruna Braga e Caroline Soares, as “Marias do Lab”, pela persistência, companheirismo e amizade em todos os momentos e colaboração em muitos resultados deste trabalho. Sem vocês seria bem mais difícil obter esses resultados.

A Aliny Vasconcelos, a menina da “eletro”, altamente competente na realização de experimentos minuciosos, que me ajudou muito na realização dos experimentos do “patch-clamp”. Você é uma pesquisadora nata.

A todos os alunos, professores e pesquisadores do LBCM pela convivência agradável e por contribuir com meu crescimento profissional.

A amiga e Dra. Teresa Cristina, pela amizade e companheirismo em todas as áreas, por fazer a diferença por onde passa e mostrar que é possível ser mulher, mãe, pesquisadora, amiga e tudo mais.

Ao amigo de turma 2011 (Renorbio) Dr. Itácio Padilha, pelo companheirismo nas disciplinas e no laboratório, e principalmente pelo exemplo de organização e comprometimento com a pesquisa de qualidade.

Ao Prof. Dr. Mario Vasconcellos e Prof. Dr. Cláudio Lima Júnior do Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal pela colaboração e parceria na síntese das moléculas sintéticas usadas neste estudo.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Renorbio, bem como todos os professores da Rede que contribuíram com minha formação.

A Prof.^a Dra. Sandra Mascarenhas pela colaboração nos ensaios do modelo de inflamação.

Aos membros da banca pela contribuição e sugestões com o trabalho.

Aos ex-alunos do LBCM, Caio Bomfim, Dr. Hervé Couliadiati, Rephany, André Monteiro, Prof. Dr. Juan Carlos, pela amizade.

A grande amiga, Dra. Alethéia Lacerda, por ser minha parceira por muitos anos no laboratório na área de oncologia experimental. Por mostrar sua força, persistência, inteligência e capacidade de extrair o melhor nas dificuldades. Obrigada por todos os momentos juntas e principalmente pelos momentos inesquecíveis em São Paulo, em 2013.

A grande amiga e irmã, Msc. Isabela Arruda, pela amizade reconquistada, o apoio, incentivo e toda nossa história desde a graduação no curso de Ciências Biológicas. Por compartilhar a mesma fé e hoje dividir a bancada novamente no laboratório.

A amiga Dra. Bruna Priscila, pela amizade conquistada durante o doutorado, pelo apoio nos experimentos e por transmitir uma tranquilidade que só você tem, mesmo nos momentos de estresse.

A Msc. Jacqueline Leite, hoje doutoranda na USP, pela amizade ímpar, pela ajuda nos experimentos de inflamação e principalmente pela companhia e apoio durante a estadia em São Paulo, quando estagiei no Instituto Butantan.

A coordenação do Curso de Medicina da FCM-Campina Grande, em especial ao prof. Dr. Adriano Mello, pelo apoio e compreensão nos momentos que precisei me afastar da Instituição por causa do doutorado.

*Ao prof. Dr. Durvanei Maria por me receber em seu laboratório no Instituto Butantan, e promover o acesso ao conhecimento de várias metodologias e modelos experimentais antitumorais *in vivo*.*

Ao Msc. Arthur Cássio pela amizade, carinho, companheirismo e exemplo de paraibano “arretado”, que se destaca na USP e conquistou

minha amiga Alethéia e carregou-a para São Paulo. Você é um ser humano especial e com certeza será um grande pesquisador e colaborador.

A amiga Sabrina Lima, pela amizade e companheirismo desde a infância e por estar sempre ao meu lado nas etapas importantes de minha vida. Por me deixar amar sua filha Carolzinha como se fosse minha. Saiba que quero usufruir de sua amizade por toda vida.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Biologia Molecular, onde comecei minha carreira acadêmica e ainda faço parte do corpo técnico.

Aos meus irmãos e amigos da Igreja Presbiteriana dos Bancários, que me apoiaram e me sustentaram com suas orações.

Ao CNPq pelo apoio financeiro aos projetos que suportaram a obtenção dos resultados deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o
melhor fosse feito” (Marthin Luther King).*

POTENCIAL ANTICÂNCER E ANTI-INFLAMATÓRIO DE ADUTOS DE MORITA BAYLIS-HILLMAN. Tese de doutorado. Autora: Glaucia Veríssimo Faheina Martins. Orientador: Demetrius Antônio Machado de Araújo. Departamento de Biotecnologia. Universidade Federal da Paraíba

Resumo

Apesar dos avanços das pesquisas no campo da oncologia, existe um aumento na incidência do câncer e na mortalidade por esta doença, consistindo em um dos principais problemas de saúde pública. A literatura relata que os Adutos de Morita Baylis-Hillman (AMBH) apresentam atividades biológicas promissoras, tais como: antiparasitária, contra *Leishmania sp.*, *Plasmodium sp.*, e *Trypanosoma cruzi*, bem como, efeito no desenvolvimento de células embrionárias de ouriço-do-mar. Para avaliar o potencial anticâncer e anti-inflamatório de três AMBH: A2CN, A3CN e A4CN, utilizou-se vários modelos biológicos. Os resultados mostraram que no teste de redução do MTT, os adutos foram potencialmente citotóxicos para as oito linhagens cancerígenas testadas (HL-60, MOLT-4, K562, K562-Lucena, MCF-7, HT-29, L929, B16F10), contudo A2CN foi o AMBH mais citotóxico, apresentando menor CI_{50} para a maioria das linhagens. As linhagens de leucemia mielóide aguda HL-60 e MOLT-4 foram as mais sensíveis, e A2CN apresentou CI_{50} de 22 e 21 μM nestas células. Nas células de leucemia mielóide crônica K562 e Lucena, A2CN apresentou CI_{50} de 58 e 60 μM , respectivamente. A2CN foi menos citotóxico para as células normais do sangue periférico e para a linhagem de fibroblastos humano normal (FN1), cuja CI_{50} foi de 78 e 126 μM , respectivamente. O mecanismo de ação de A2CN foi estudado nas células K562, nas concentrações de 15, 30 e 60 μM . A viabilidade da membrana celular não foi alterada, quando analisada com iodeto de propídeo em citômetro de fluxo, mostrando que, a molécula não induziu necrose nestas células. A2CN promoveu um aumento da despolarização da membrana mitocondrial em 20 %, na maior concentração testada, caracterizando um envolvimento da via intrínseca da apoptose. A atividade citotóxica de A2CN em K562 está relacionada à parada no ciclo celular na fase G1, a partir de 15 μM , e na fase S na maior concentração testada de 60 μM . A produção de ROS foi aumentada na maior concentração testada. A parada no ciclo celular na fase S está relacionada com o aumento na expressão do RNAm de p21, p27 e p53 e diminuição na expressão de ciclina D1. A expressão dos genes para Kv1.3 e Kv3.1 também foi aumentada nas células K562, tratadas com 60 μM . Nos ensaios eletrofisiológicos usando a técnica de whole-cell, “patch clamp”, A2CN (120 μM) promoveu um aumento na corrente total de K^+ em K562, bem como, aumentou a condutância ao íon K^+ . O bloqueador de canal de potássio, 4-aminopiridina (4-AP) (1 mM) reduziu a citotoxicidade de A2CN nas células K562, analisadas pela redução do MTT, indicando que os canais de K^+ estão envolvidos na citotoxicidade desta molécula. A atividade anti-inflamatória de A2CN, A3CN e A4CN, foi avaliada *in vitro* na linhagem de macrófagos Raw 264.7, estimulada com (1 $\mu g/ml$) de LPS. Os AMBH não reduziram a viabilidade das células até a concentração de 20 μM , contudo inibiram a produção de NO e a produção de ROS induzida pelo LPS a partir da menor concentração dos AMBH, de 2,5 μM . A produção das citocinas IL-1 e IL-6 foi

completamente inibida por 10 μ M dos AMBH, mas não houve alteração nos níveis de TNF- α . A expressão nos genes das citocinas IL-1 e IL-6, também foram alteradas por A2CN, A3CN e A4CN, porém, apenas A2CN foi capaz de inibir a expressão do gene da Ciclo-oxigenase-2 (COX-2). Isto posto, pode-se concluir que A2CN apresentou potente atividade anticâncer, atuando em alvos moleculares que são objetos de estudos pré-clínicos e clínicos na área oncológica, como p53, p21, p27 e ciclina D1, bem como demonstrou ser um potente ativador de canais de potássio. Além disso, os adutos apresentaram notável potencial anti-inflamatório, com diminuição de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e IL-6, e inibição da expressão de COX-2 por A2CN.

Palavras-chave: Adutos de Morita Baylis-Hillman; células de leucemia mielóide humana K562; apoptose; canais iônicos; ciclo celular; inflamação.

Abstract

Despite advances in research oncology field, has been an increased incidence and mortality caused by cancer, consisting in a major public health problem. Literature reports, that Morita-Baylis Hillman adducts (MBHA) show promising biological activities, such as: antiparasitic, against *Leishmania*, *Plasmodium sp.* and *Trypanosomes*, as well as effect on sea urchin embryo development. To assess anticancer and anti-inflammatory potential of three AMBH: A2CN, and A3CN, A4CN, we used various biological models. In MTT assay, the adducts were potentially toxic to eight cancer cell lines tested (HL-60, MOLT-4, K562, K562-Lucena, MCF-7, HT-29, L929 and B16F10), however A2CN was the most cytotoxic, with IC₅₀ lower for most cells. Acute myeloid leukemia cells, HL-60 and MOLT-4, were more sensitive and A2CN had IC₅₀ 22 and 21 μ M in these cells. In chronic myelogenous leukemia cells, K562 and Lucena, A2CN presented IC₅₀ of 58 and 60 μ M, respectively. A2CN has been less cytotoxic to normal cells in peripheral blood and normal human fibroblasts (FN1), and IC₅₀ was 78 and 126 μ M, respectively. The action mechanism induced by A2CN in K562 cells was studied at 15, 30 and 60 μ M. The cell viability has not altered when analyzed with propidium iodide, using flow cytometry, showing that A2CN not induced necrosis in these cells. A2CN increased mitochondrial membrane depolarization by 20 % at highest concentration tested. Cytotoxicity of A2CN in K562 cells were related to cell cycle arrest in G1-phase at 15 μ M, and S-phase at highest concentration (60 μ M) and ROS production increased at the highest concentration tested. Cell cycle arrest in S-phase was related to high expression mRNA of p21, p27 and p53, together with decreased expression of cyclin D1. A2CN also augmented expression of Kv1.3 and Kv3.1 genes in K562 cells treated with 60 μ M. In electrophysiological assays, using the whole-cell "patch clamp", A2CN (120 μ M) promoted increase total K⁺ current in K562, and conductance K⁺ ion was elevated. The potassium channel blocker, 4-aminopyridine (4-AP) (1 mM) decreased the A2CN cytotoxicity in K562 cells analyzed by MTT reduction, indicating that K⁺ channels have been involved in its cytotoxicity. The *in vitro* anti-inflammatory activity of A2CN, A3CN and A4CN was evaluated in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. AMBHs did not reduced cell viability to concentration 20 μ M, however, inhibited NO and ROS production induced by LPS. IL-1 β and IL-6 production was

completely inhibited by 10 μ M of AMBH, but no change in TNF- α levels. Expression of IL-1 β and IL-6 genes were also altered by A2CN, A3CN and A4CN, but only A2CN was able to inhibit gene expression of cyclooxygenase-2 (COX-2). Therefore, it can be concluded that A2CN showed be potent anticancer activity, acting on molecular targets that are objects preclinical and clinical studies in oncology, such as p53, p21, p27 and cyclin D1, and proved to be a potent activator of potassium channels. Furthermore, adducts showed remarkable anti-inflammatory potential, a reduction of proinflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-6 and COX-2 expression by A2CN.

Keywords: Morita Baylis-Hillman Adducts; Line cells; apoptosis; ion channels; cell cycle; inflammation.

Lista de ilustrações

Figura 1: Regulação do ciclo celular de mamíferos pelo complexo ciclinas-CDK.	33
Figura 2: Rb e a progressão do ciclo celular em G1.	34
Figura 3: Arrasto no ciclo-celular na fase G1-S.	35
Figura 4: Via extrínseca e intrínseca da apoptose.	40
Figura 5: Estrutura esquemática do canal de potássio.	44
Figura 6: Ilustração esquemática da função das citocinas na carcinogênese.	49
Figura 7: Esquema da reação de Morita-Baylis-Hillman, com aldeídos por exemplo.	53
Figura 8: Representação esquemática da síntese de A2CN	54
Figura 9: Estruturas químicas dos AMBH utilizados nos testes de citotoxicidade.	59
Figura 10: Efeito de A2CN na viabilidade de células K562 tratadas com A2CN (15, 30 e 60 μM) por 24 horas.	80
Figura 11: Alteração do potencial transmembrânico mitocondrial (ψ_m) em células K562.	82
Figura 12: Efeitos no ciclo celular da linhagem K562 após 24 h de incubação com A2CN (15, 30 e 60 μM) ou com Etoposídeo (5 μM).	84
Figura 13: Análise da geração de ROS na linhagem K562 após 24 h de incubação com A2CN (15, 30 e 60 μM) ou com etoposídeo (5 μM).	86
Figura 14: Expressão relativa dos genes p21, p27 e p53 nas células K562 tratadas com A2CN (60 μM) por 24 h em comparação ao grupo controle não tratado.	88
Figura 15: Expressão relativa dos genes para ciclinas E e D1 nas células K562 tratadas com A2CN (60 μM) por 24 h em comparação ao grupo controle não tratado.	89
Figura 16: Análise dos produtos da PCR em tempo real, por eletroforese em gel de agarose 1,5 %, para avaliação do tamanho dos fragmentos.	90

Figura 17: Expressão relativa dos genes para Kv1.3 e Kv3.1 nas células K562 tratadas com A2CN (60 µM) por 24 h em comparação ao grupo controle não tratado.	92
Figura 18: Análise dos produtos da PCR em tempo real por eletroforese em gel de agarose 1,5 % para avaliação do tamanho dos fragmentos.	93
Figura 19: Efeito de A2CN nos canais de potássio voltagem-dependentes (Kv) em células K562.	95
Figura 20: Efeito de A2CN na condutância ao potássio em células K562 tratadas com 120 µM.	96
Figura 21: Efeito de 4-AP na viabilidade das células K562 tratadas com A2CN (60 µM) por 24 h.	98
Figura 22: Efeito dos adutos A2CN, A3CN e A4CN sobre o acúmulo de nitrito no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 µg/mL) por 22 h.	100
Figura 23: Efeito dos adutos A2CN (A), A3CN (B) e A4CN (C) na viabilidade das células Raw 264.7 tratadas por 22 h.	102
Figura 24: Efeito dos adutos A2CN, A3CN e A4CN sobre a produção de ROS de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 µg/mL) por 22 h.	104
Figura 25: Expressão relativa dos genes para IL-1β nas células Raw 264.7 tratadas com LPS (1 µg/mL) ou incubadas juntamente com LPS e A2CN, A3CN ou A4CN (10 µM) por 24 h em comparação ao grupo controle tratado apenas com LPS.	106
Figura 26: Expressão relativa dos genes para IL-6 nas células Raw 264.7 tratadas com LPS (1 µg/mL) ou incubadas juntamente com LPS e A2CN, A3CN ou A4CN (10 µM) por 24 h em comparação ao grupo controle tratado apenas com LPS.	107
Figura 27: Expressão relativa do gene para COX-2 nas células Raw 264.7 tratadas com LPS (1 µg/mL) ou incubadas juntamente com LPS e A2CN, A3CN ou A4CN (10 µM) por 24 h em comparação ao grupo controle não tratado.	108
Figura 28: Determinação da citocina pró-inflamatória IL-1β liberada pelas células Raw 264.7 após estímulo com LPS (1 µg/mL) por 22 h.	110
Figura 29: Determinação da citocina pró-inflamatória IL-6 liberada pelas células Raw 264.7 após estímulo com LPS (1 µg/mL) por 22 h.	111
Figura 30: Determinação da citocina pró-inflamatória TNF-α liberada	112

pelas células Raw 264.7 após estímulo com LPS (1 µg/mL) por 22 h.

Figura 31: Mecanismo de ação proposto para A2CN nas células K562 127

Figura 32: Mecanismo de ação proposto para AMBH em células Raw 264.7 128

Lista de tabelas

Tabela 1: Modelos de linhagens e células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade	60
Tabela 2: Sequências dos primers utilizados para amplificação dos genes.	70
Tabela 3. Efeito dos isômeros A2CN, A3CN e A4CN no crescimento das linhagens celulares por 24 horas. Resultados são reportados como valores de CI50 (concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular) em μM.	78

Lista de Abreviaturas e Siglas

%: Porcentagem

µg: micrograma

µL: microlitro

µM: micromolar

°C: Grau celsius

Δψ_m: Potencial transmembrânico mitocondrial

λ: comprimento de onda

4-AP: 4-Aminopiridina

5-LOX: 5-Lipoxigenase

Ag: prata

AgCl₂: cloreto de prata

AIF: Fator indutor de apoptose

AINES: Anti-inflamatório não-esteroidais

AKT: proteína quinase serina/treonina específica

AMBH: Adutos de morita-Baylis-Hillman

AP-1: fator de transcrição

APAF-1: Fator ativador plaquetário

ATM: Ataxia telangiectasia mutated (proteína quinase)

ATP: Adenosina-5-trifosfato

ATR: Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein

BAX: Proteína reguladora da apoptose

BCL-2: B-cell lymphoma protein 2

Bid: BH3 interacting-domain (ativador de morte)

CAF: Fibroblastos associados ao câncer

CCCP: Carbonil cianeto m-clofenildrazona

CDK: Quinase dependente de ciclina

cDNA: DNA complementar

CD95: cluster de diferenciação 95 ou receptor do TNF

CHK: Checkpoint kinase

Cit c: citocromo c

CKI: Inibidor de quinase-dependente de ciclina

CO₂: Dióxido de carbono

COX-2: Cicloxigenase - 2

Ct: cycle threshold

DABCO: 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano

DISC: Complexo de sinalização indutor de morte

DMEM: Meio essencial mínimo modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetilsufóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

E2F: Fator de transcrição E2

EDTA: Ácido tetracético etilenodiamino dissódico

EGTA: Ácido tetracético etilenoglicol

Endo G: Endonuclease G

EPM: Erro padrão da média

ERK ½: quinase reguladora de sinal extracelular

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato-dehidrogenase

GΩ: gigaohm

GRE: Grupo retirador de elétron

GM-CSF: Fator estimulador de colônia para macrófagos/granulócitos

HEPES: Ácido N-2-hidroximetilpiperazina-N'-2-etanosulfônico

HIF-1α: Fator indutor de hipóxia 1

IAP: Proteína inibidora de apoptose

IFN- γ : Interferon- γ

IL-1: Interleucina

IL-6: Interleucina 1

IL-8: Interleucina 8

IL-10: Interleucina 10

IL-17: Interleucina 17

IL-6R: Receptor para interleucina-6

I: Corrente elétrica

JAK: Janus kinase

KCl: Cloreto de potássio

KHz: Kilohertz

KOH: Hidróxido de potássio

Kv: Canal de potássio dependente de voltagem

LLC: Leucemia linfocítica crônica

LMC: Leucemia mielóide crônica

LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógenos

MDR: Resistência a múltiplas drogas

MgCL₂: Cloreto de magnésio

mitoKv1.3: canal de potássio Kv1.3 mitocondrial

M Ω : megaohm

mL: mililitro

mOsm: Miliosmol

mM: milimolar

MMP: permeabilização da membrana mitocondrial

MMPS: metaloproteinases

MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difeniltetrazólio

nM: nanomolar

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato-oxidase

NO₂[•]: radical nitro

NO: Óxido nítrico

NOS_i: Sintase de óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

NOXA: Proteína homóloga a BCL-2, que em latim significa “dano”

NOX₂: NADPH oxidase 2

NF-κB: Factor nuclear kappa B

Oct4: octamer-binding transcription factor 4

p53: Proteína citoplasmática de massa molecular 53 Kd

pA: picoAmpére

PBS: Solução de fosfato tamponada

pF: picoFaraday

pH: Potencial hidrogeniônico

pRb: proteína Retinoblastoma

PBMC: Células mononucleares do sangue periférico, do inglês “peripheral blood mononuclear cell”

PTM: Transição da permeabilidade mitocondrial

PUMA: p53 upregulated modulator of apoptosis

qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RNA: Ácido ribonucleico

RNA_m: RNA mensageiro

RPMI: meio Roswell Park Memorial Institute

RNS: Espécies reativas de nitrogênio

RONs: Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

ROS: Espécies reativas de oxigênio

rpm: Rotações por minuto

R: ponto de Restrição

SFB: Soro fetal bovino

SMAC: Second mitochondria-derived activator of caspases

Stat-3: Signal transducer and activator of transcription 3

TAMs: Macrófagos associados ao tumor

TGF- β : Fator de transformação crescimento beta

TIL: Linfócitos infiltrantes tumorais

TMRM: Tetrametilrodamina

TNF: Fator de necrose tumoral

TRAIL: Ligante indutor de apoptose relacionado ao receptor TNF

UV: ultravioleta

V: voltagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. REFERENCIAL TEÓRICO	28
2.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER	28
2.1.1 Epidemiologia do câncer	28
2.1.2 Tumorigênese	29
2.2 CICLO CELULAR E CÂNCER	32
2.3 MORTE CELULAR E CÂNCER	36
2.3.1 Apoptose	36
2.3.1.1 Vias da apoptose	37
2.3.1.2 P53 na regulação da apoptose	41
2.4 CANAIS IÔNICOS E CÂNCER	42
2.4.1 Canais de potássio	43
2.4.1.1 Canais de potássio e proliferação celular	44
2.4.1.1 Canais de potássio e apoptose	45
2.5 INFLAMAÇÃO E CÂNCER	46
2.5.1 Citocinas envolvidas no desenvolvimento do tumor	47
2.5.2 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no processo da carcinogênese	51
2.6 ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN	52
2.6.1 Adutos de Morita-Baylis-Hillman com Atividade Anticâncer	55
3. OBJETIVOS	56
3.1 OBJETIVO GERAL	57
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
4. MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1 MATERIAL	59
4.1.1 Compostos químicos	59
4.2 METODOLOGIA	60
4.2.1 Células normais e tumorais	60
4.2.2 Cultivo celular	60
4.2.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC)	61

4.2.4 Avaliação da atividade citotóxica pelo método de redução de (MTT)	62
4.3 ENSAIOS DE MECANISMO DE MORTE CELULAR	63
4.3.1 Viabilidade celular- iodeto de propídeo	63
4.3.2 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial	64
4.3.3 Análise dos efeitos no ciclo celular	65
4.3.4 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)	66
4.3.5 Avaliação da expressão de genes envolvidos no ciclo celular e apoptose	66
4.3.5.1 Extração de RNA	66
4.3.5.2 Obtenção do DNA complementar (cDNA)	67
4.3.5.3 Expressão gênica pelo método de quantificação relativa por q-PCR em tempo real	68
4.3.6 Patch-clamp	70
4.3.6.1 Preparo das células para os experimentos de patch clamp	72
4.3.7 análise estatística	72
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	73
4.4.1 Avaliação da produção de óxido nítrico (ON)	73
4.4.2 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por citometria de fluxo	73
4.4.3 Expressão dos genes, IL-1, IL-6 e COX-2 por PCR em tempo real	74
4.4.4 Produção de citocinas pela técnica de ELISA	74
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	75
5. RESULTADOS	76
5.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA 50% (CI ₅₀) DOS AMBH	77
5.2 AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE MORTE DE A2CN NAS CÉLULAS K562	78
5.2.1 Efeito de A2CN na viabilidade celular por citometria de fluxo	79
5.2.2 Determinação da variação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	81
5.2.3 Efeitos no ciclo celular	83
5.2.4 Avaliação da participação das espécies reativas de oxigênio (ROS)	85
5.2.5 Análise da expressão gênica em tempo real (qPCR) em células k562	87

5.2.5.1 Expressão de genes envolvidos no ciclo celular	87
5.2.5.2 Expressão de genes de canais iônicos	91
5.2.7 Análise eletrofisiológica em K562	94
5.2.7.1 Efeito do composto A2CN sobre os canais para potássio sensíveis a voltagem na linhagem celular K562	94
5.2.7.2 Efeito do composto A2CN sobre a cinética de ativação dos canais para potássio sensíveis a voltagem em células K562	96
5.2.8 Efeito do inibidor de canais Kv, 4-Aminopiridina (4-AP) na proliferação de células K562	97
5.2.9 Avaliação da atividade anti-inflamatória in vitro em células RAW 264.7	99
5.2.9.1 Avaliação da produção de NO	99
5.2.9.2 Avaliação de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por citometria de fluxo em células Raw 264.7	103
5.2.9.3 Avaliação da expressão dos genes para IL-1, IL-6 e COX-2 em células Raw 264.7	105
5.2.9.4 Avaliação da produção de citocinas	109
6. DISCUSSÃO	113
7. CONCLUSÃO	129
8. PERSPECTIVAS	131
Referências	133

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O aumento na incidência e mortalidade por câncer, tem tornado esta doença a segunda causa de morte no mundo, e esse crescimento também se tem verificado no Brasil (INCA, 2014). A carcinogênese é um processo complexo que ocorre em estágios múltiplos, envolvendo geralmente mais de uma alteração genética nos oncogenes e nos genes supressores de tumor. Quando ocorrerem falhas nos sistemas de reparo e nos mecanismos de morte celular por apoptose, as células cancerígenas passam a proliferar de forma descontrolada, gerando os tumores (FULDA; DEBATIN, 2006).

A proliferação descontrolada em células cancerígenas ocorre principalmente por causa de defeitos no controle do ciclo celular (FOSTER et al., 2008). O ciclo celular é controlado por diversas proteínas, inclusive por canais iônicos de membrana, que são essenciais para a proliferação celular e tem uma função no desenvolvimento do câncer (FELIPE et al., 2006). Muitos autores têm mostrado que alterações na expressão, ou na modulação de alguns tipos de canais iônicos, estão diretamente correlacionadas com as vias de tumorigênese de vários tipos de câncer. Dentre estes canais, destacam-se os canais para potássio (HAN et al., 2008; WANG, 2004; PARIHAR et al., 2003; PARDO; STÜHMER, 2014).

Na última década, foi possível observar o grande interesse da comunidade científica na identificação de alguns canais iônicos, como marcadores moleculares e possíveis alvos farmacológicos, dentre estes, destacam-se os canais para potássio: Kv1.3, Kv1.5, Kv3.4, Kv10.1 e Kv11.1 (STOREY et al., 2003; SZABÓ et al., 2008, GULBINS et al., 2010; LANSU; GENTILE, 2013; LANG; STOURNARAS, 2014; PALME et al., 2013; PARDO; STÜHMER, 2014).

Apesar de existir na prática clínica um arsenal de fármacos quimioterápicos, é bem relatado na literatura o desenvolvimento de resistência por alterações no metabolismo das drogas ou modificações nos alvos das drogas (ZAHREDDINE; BORDEN, 2013), bem como a apresentação de diversos efeitos colaterais causados por estes medicamentos. Sendo assim, é de grande interesse a busca por novas moléculas bioativas que atuem como moduladores de alvos específicos para o

câncer e sejam mais seletivos, causando menos efeitos adversos e melhorem a capacidade imune do paciente. Os adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH) são moléculas sintéticas, com atividades biológicas bem relatadas na literatura, como antiparasitária e anti-mitótica, além de anti-neoplásica, por isso, essas moléculas tem um grande potencial como drogas anticâncer. Como a síntese dessas moléculas atualmente é simples e rápida, devido ao melhoramento da obtenção das mesmas, é possível obter as moléculas com facilidade, bem como analisar a diferença na atividade de moléculas muito parecidas, como os isômeros de posição A2CN, A3CN e A4CN.

Nesse contexto, foi objetivo deste trabalho, avaliar o potencial antiproliferativo dos AMBH, A2CN, A3CN e A4CN em cultura de células tumorais e não-tumorais, buscando identificar o mecanismo de morte induzido por estas moléculas e encontrar possíveis alvos intracelulares e moleculares envolvidos. Adicionalmente, foram avaliados os efeitos destas moléculas na resposta inflamatória induzida por LPS em células Raw 264.7, objetivando avaliar o potencial anti-inflamatório destas moléculas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER

2.1.1 Epidemiologia do câncer

Embora nas duas últimas décadas tenha havido um melhor entendimento sobre os processos de tumorigênese e o surgimento de terapias mais específicas para o tratamento do câncer, as estimativas da Sociedade Americana do Câncer e da União Internacional Contra o Câncer indicam que, aproximadamente, sete milhões de pessoas morrem de câncer anualmente em todo o mundo, e que em 2030 são esperados 27 milhões de novos casos, com 17 milhões de óbitos, o que torna essa doença responsável por 12,5% das mortes mundiais (AGGARWAL et al., 2009).

Em 2012, o câncer aumentou para cerca de 14 milhões de novos casos por ano, o quadro deverá subir para 22 milhões por ano nas próximas duas décadas. No mesmo período, as mortes por câncer estão previstas para aumentar de uma estimativa de 8,2 milhões por ano para 13 milhões por ano. Em nível mundial, em 2012, a maioria dos cânceres comuns diagnosticadas foram os de pulmão (1,8 milhões de casos, 13,0% do total), de mama (1,7 milhões, 11,9%), e intestino grosso (1,4 milhões, 9,7%). As causas mais comuns de morte por câncer foram cânceres de pulmão (1,6 milhões, 19,4% do total), fígado (0,8 milhões, 9,1%), e estômago (0,7 milhões, 8,8%) (OMS, 2015).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2015, apontam a ocorrência de 518.510 casos novos de câncer, onde são esperados 257.870 para o sexo masculino e 260.640 para sexo feminino. Estima-se que, o câncer de pele do tipo não melanoma (134 mil novos casos), será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (60 mil), mama (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) (Instituto Nacional do Câncer, 2014).

Como consequência do crescimento e envelhecimento da população, os países em desenvolvimento são desproporcionalmente afetados pelo aumento do número de câncer. Mais de 60% do total de casos no mundo ocorrem na África, Ásia e regiões da América do Sul e Central, e são responsáveis por cerca de 70% das mortes por câncer no mundo, uma situação que é agravada pela falta de detecção precoce e acesso ao tratamento.

2.1.2 Tumorigênese

O câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Outros termos utilizados são tumores malignos e neoplasias. Uma característica que define o câncer é o crescimento rápido de células anormais que crescem além dos seus limites usuais, e que podem então invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos, estabelecendo a metástase. As metástases são a principal causa de morte por câncer (OMS, 2015).

O câncer é uma doença, relacionada às mudanças na dinâmica do genoma, onde estas definem os mecanismos moleculares envolvidos na progressiva transformação das células normais, em cada tipo específico de tumor (HARRIS; MCCORMICK, 2010). A tumorigênese é um processo composto por múltiplos passos, os quais refletem alterações genéticas, que surgem tanto da ativação de proto-oncogenes (os quais controlam os processos de crescimento, divisão e sobrevivência celular) em oncogenes (formas alteradas dos proto-oncogenes), quanto de mutações que levam a perda da função e/ou inativação dos genes supressores tumorais, relacionados com o controle do crescimento celular desregulado e a ativação de vias de reparo do DNA (ácido desoxorribonucléico). Mecanismos epigenéticos também contribuem para a alteração da expressão destes genes (LEE; MULLER, 2010; SANTARIUS et al., 2010).

Um importante trabalho, publicado por Hanahan e Weinberg (2000), descreveu as alterações funcionais essenciais que ocorrem durante a tumorigênese, as quais foram identificadas como sendo as características do câncer: autossuficiência em relação aos sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais de

inibição do crescimento, evasão aos mecanismos de morte por apoptose e senescência, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão dos tecidos e capacidade de metástase.

Recentemente, com os avanços das pesquisas na área oncológica, características adicionais têm sido incluídas por contribuírem de forma relevante para a sobrevivência, proliferação e disseminação das células cancerosas. São elas: instabilidade genômica, habilidade de escapar do sistema de vigilância imunológica, capacidade de crescer em um ambiente com inflamação crônica e a reprogramação do metabolismo celular (CAVALLO et al., 2011; NEGRINI et al., 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Ainda, outras cinco características têm sido propostas, as quais diferem das descritas por Hanahan e Weinberg no sentido de não representarem capacidades funcionais adquiridas, mas por definirem o estado das células cancerosas em detrimento as condições de estresse celular: danos ao DNA e estresse durante a replicação do DNA, estresse metabólico, estresse mitótico, estresse proteotóxico e estresse oxidativo, sendo estas duas últimas consideradas características secundárias (LUO et al., 2009; NEGRINI et al., 2010).

A habilidade da população tumoral em se expandir não depende apenas da capacidade de proliferação, mas também da evasão dos mecanismos de apoptose (BAGULEY, 2011; MOFFITT et al., 2010). Esta consiste em uma forma de morte celular programada a qual exerce importante papel em diversos processos biológicos, como no desenvolvimento embrionário, crescimento, proliferação, diferenciação, imunidade, remoção de células indesejadas e manutenção da homeostase dos tecidos (ELMORE, 2007; PLATI et al., 2011).

Devido à importância fisiológica da morte celular por apoptose, esse processo é estritamente controlado. As vias intrínseca e extrínseca da morte apoptótica são reguladas por diversas proteínas, como p53, os membros da família Bcl-2 (B-cell lymphoma protein 2), as IAPs (proteínas inibidoras da apoptose) e as MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos) (LIU et al., 2011). A supressão dos mecanismos apoptóticos está envolvida tanto no processo de tumorigênese e manutenção do fenótipo maligno quanto no desenvolvimento de resistência a drogas (BAGULEY, 2011; FULDA et al., 2010; PORTT et al., 2011).

Os efeitos da maioria dos quimioterápicos e o sucesso dos atuais esquemas de intervenção terapêutica para o tratamento do câncer, como radioterapia e imunoterapia, dependem fortemente da capacidade de induzir a célula tumoral a desencadear sua morte por apoptose (FULDA, 2009; GYRD-HANSEN; MEIER, 2010). Então, o desenvolvimento de drogas que tenham como alvo as vias intracelulares e moléculas envolvidas na execução da morte apoptótica constitui uma das estratégias terapêuticas na área da oncologia (CIAVARELLA et al., 2010; MOFFITT et al., 2010; OLA et al., 2011; RUSSO et al., 2006; STRAUB, 2011; FAHEINA-MARTINS, 2012).

Outro mecanismo de intervenção na quimioterapia é a indução de parada no ciclo celular. As moléculas essenciais que regulam a progressão do ciclo celular são as ciclinas e kinases dependentes de ciclinas (CDKs). Antes da entrada em mitose a célula passa por um período de crescimento celular denominado intérfase, que é subdividido nas fases G1, S e G2. Na fase G1 inicial, a ciclina D é expressa em resposta a mitógenos e subsequentemente se liga a CDK4/6. O complexo ciclina D/CDK4/6 é então ativado por kinase ativadoras de CDK as quais levam a fosforilação da proteína Retinoblastoma (Rb). A fosforilação de Rb rompe a associação com a família E2F de fatores de transcrição. E2F liberado induz a expressão de proteínas essenciais para o ciclo celular, tais como ciclina E e ciclina A. O complexo ciclina/CDK é inibido por kinases inibidoras de CDK (CKIs). Membros da família Cip/KIPs incluem p21^{cip}, p27^{kip1} e p57^{kip2}. Estudos prévios mostram que estas proteínas se ligam ao complexo ciclina/CDK e previnem fisicamente o complexo de fosforilar seus alvos (CHEN et al., 2005).

Células normais têm as vias de sinalização do ponto de checagem celular intactos, e o controle defeituoso do ponto de checagem em G1 é um fator comum de células cancerígenas, por exemplo, uma mutação em p53 ou pRb, que são genes supressores tumorais ou em CDKs e seus inibidores. O ponto de checagem em S/G2 é outro alvo atrativo para quimioterapia (CHEN et al., 2012). Muitos fármacos antitumorais atuam inibindo a progressão do ciclo celular e essas moléculas tem grande potencial para indústria farmacêutica.

2.2 CICLO CELULAR E CÂNCER

É bem relatado na literatura que o câncer é mais acuradamente descrito, como sendo o produto do mal funcionamento da regulação do ciclo celular, tal que células mutadas e injuriadas, as quais são normalmente mortas, progridem através do ciclo celular, acumulando mutações (FOSTER, 2008).

O ciclo de divisão celular é caracterizado em quatro fases distintas, incluindo duas fases de intervalos, denominadas “gaps” (G1 e G2), que preparam e avaliam a disponibilidade das células para entrar na fase S (fase de síntese do DNA) ou a fase-M (mitótica) (SURYADINATA et al., 2010). O controle estrito da fase S é importante para assegurar que as células passem por uma única replicação do DNA cromossomal, enquanto que a fase M vai regular a separação do material genético duplicado em duas células filhas idênticas (NORBURY; NURSE, 1992; SURYADINATA et al., 2010).

Em células de mamíferos, a divisão celular é regulada por fatores mitogênicos, que atuam na fase G1 do ciclo celular para ativar CDKs e fazem a célula atravessar um ponto denominado, ponto de restrição (R), após o qual, elas estão comprometidas para um ciclo de divisão celular, independente de fatores de crescimento. A progressão das células pelo ciclo celular é fortemente regulada por complexos de quinases diméricos ciclina-CDK, onde CDK é a subunidade catalítica e a ciclina é a subunidade de ativação (figura 1) (SURYADINATA et al., 2010). A atividade de CDK é verificada por proteínas inibitórias do ciclo celular, chamadas inibidores de CDK (CKI). Há duas distintas famílias de CKI, a ink4, que incluem p15, p16, p18, p19 (inibem cdk 4 e 6), e a família cip/Kip que incluem p21, p27, p57 (inibem complexos ciclina-cdk) (FOSTER, 2008).

A função crítica das proteínas quinases nos processos biológicos centrais é exemplificada pelas CDKs, as quais controlam a progressão do ciclo celular em organismos eucarióticos. Este processo, evolutivamente conservado, é fundamental na regulação da divisão celular de organismos unicelulares, bem como organismos superiores, tais como mamíferos.

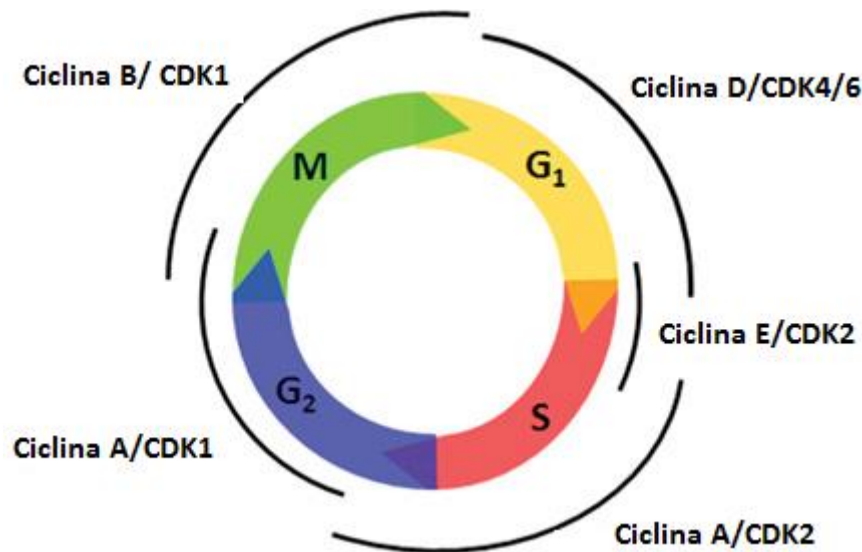


Figura 1: Regulação do ciclo celular de mamíferos pelo complexo ciclinas-CDK. O ciclo celular consiste de uma síntese de DNA (S) e uma fase mitótica (M), separada por dois “gaps” (G₁ e G₂) entre as fases. Em células de mamíferos diferentes complexos ciclina-CDK regulam a progressão das células pelas diferentes fases do ciclo celular (Fonte: adaptado de SURYADINATA et al., 2010).

O genoma humano codifica 21 CDKs, no entanto somente sete (CDK1-4, 6, 10 e 11) têm mostrado ter uma função direta na progressão do ciclo celular. Diferentes famílias de ciclinas, as subunidades regulatórias necessárias para atividade de CDK, têm sido identificadas e sua expressão flutua significativamente durante as fases do ciclo celular (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2015).

Há muitas alterações genéticas que contribuem para cânceres humanos, uma grande maioria destas mutações são em genes que codificam proteínas que regulam progressão através da fase G₁ do ciclo celular. (SHERR, 2000; WEINBERG, 2007; FOSTER et al., 2011). Embora muito seja conhecido acerca do controle da progressão do ciclo celular em G₁, ainda permanece confuso a compreensão do ponto de restrição “R”. Há dois pontos em G₁ chamados de “R”: um relativamente inicial em G₁, e outro mais tardio, antes de iniciar a fase S. O primeiro R representa o sensor de sinais de fatores de crescimento apropriados, que suprimem a saída da célula do ciclo celular para um estado quiescente. (PARDEE, 1974; FOSTER et al., 2011). O segundo ponto “R” ocorre tardiamente em G₁, como um ponto de checagem do crescimento celular, um sensor de nutrientes. As células

cancerígenas apresentam alterações genéticas que facilitam a passagem destas pelos sítios “R” (HARTWELL et al., 1974; FOSTER et al., 2011).

No início da fase G1, o complexo CDK4/CDK6 com a ciclina D recebe sinais mitogênicos que resultam na ativação da entrada no ciclo celular. Os eventos chave da sinalização incluem início da fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb) e sequestro de $p21^{cip1}$ e $p27^{kip1}$, os quais são inibidores de CDK2, com isso promovem a ativação do complexo CDK2/ciclina E. No final de G1, CDK2 complexada a ciclina E completam a fosforilação e inativam pRb, a qual pode liberar o fator de transcrição E2F, que promove a transcrição de ciclina E, necessária para a transição da fase G1/S (FOSTER, 2008; ALEEM; ACERCI, 2015).

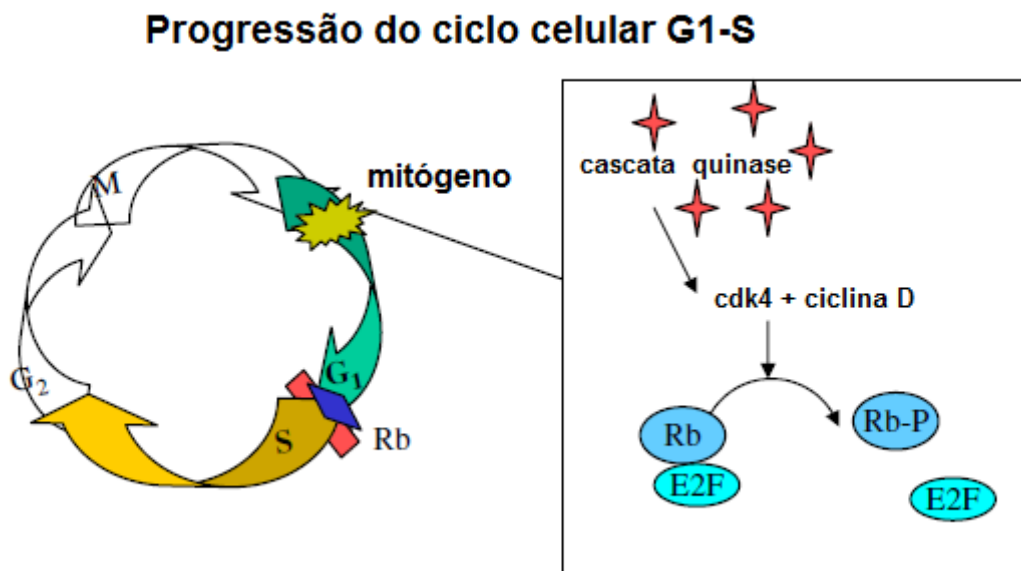


Figura 2: Rb e a progressão do ciclo celular em G1. Sinais mitogênicos são recebidos pela célula na parte inicial de G1, o qual estimula e resulta na cascata quinase dependente de Ras. A ciclina D é complexada com cdk-4. O complexo ciclina-cdk fosforila a proteína retinoblastoma (Rb), a qual libera o fator de transcrição E2F. Este ativa a transcrição de genes necessários para a célula entrar na fase S. (Adaptado de Foster, 2008).

A radiação ionizante e muitas quimioterapias são tratamentos frequentes no câncer que causam dano no DNA, e a resposta das células cancerígenas a tais danos é um fator determinante da eficácia do tratamento. Um ponto crítico para a resposta ao dano é a ativação de pontos de checagem que causam parada no ciclo celular a qual facilita efetivamente o reparo do DNA ou indução da morte celular se o dano exceder a capacidade de reparo (GARRET; COLLINS, 2011).

A resposta dominante no ponto de checagem ao dano no DNA em células de mamíferos é a via ATM(ATR)/CHK2(CHK1)-p53/MDM2-p21, que está presente em G1, a qual é capaz de induzir um arrasto sustentado e permanente em G1. Embora a expressão de ATM e CHK2 seja relativamente constante durante o ciclo celular, a concentração de ATR e CHK1 são baixas do início para o meio de G1, e sua atividade torna-se importante somente para finalizar a transição de G1/S. ATM/ATR fosforila diretamente o fator de transcrição p53 dentro do seu domínio de transativação amino-terminal, particularmente, na serina 15. O alvo chave transcrricional de p53 é o inibidor de quinases dependente de ciclinas p21^{cip1/waf1}, o qual silencia a quinase Cdk2/ciclina E que promove a transição G1/S e assim causa arrasto em G1 (figura 3) (KASTAN; LIM, 2000; WAHL; CARR, 2001; CRAIG et al., 2003; KASTAN; BARTEK, 2004; FOSTER, 2008). Isto leva não somente a incapacidade de iniciar a síntese de DNA, mas também preserva a via RB/E2F no seu modo ativo, suprimindo o crescimento, assim causando um bloqueio sustentado em G1 (MASSAGUÉ, 2008). O ponto de checagem em G1 responde a 2 vias supressoras tumorais, governado por p53 e pRB. Estes pontos de checagem são indiscutivelmente os dois mecanismos mais desregulados em cânceres humanos (KASTAN; BARTEK, 2004).

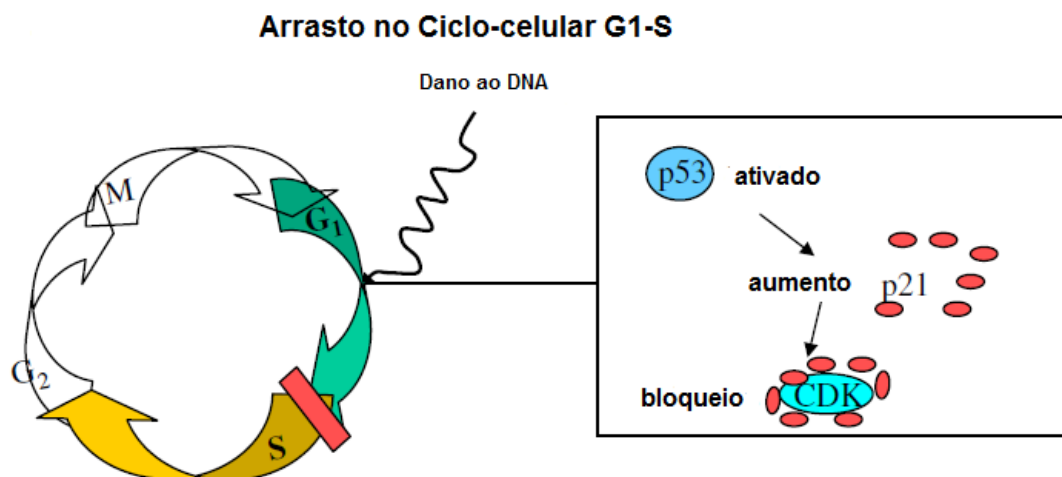


Figura 3: Arrasto no ciclo-celular na fase G1-S. Os níveis de p53 aumentam em resposta ao dano no DNA. P53 ativado aumenta a transcrição de p21, um inibidor de CDK. Inibição da expressão de CDK leva ao arrasto no ciclo celular. (Fonte: Adaptado de Foster, 2008)

Alteração nos genes que codificam CDKs ou suas ciclinas padrão pode levar a sua superexpressão, amplificação e translocação, como por exemplo alterações na ciclina D1, a qual é observada em leucemia linfocítica crônica (LLC), leucemia linfocítica aguda de células B (LLA-B) e mieloma múltiplo.

Inibidores de CDK tem um potencial terapêutico para muitas doenças incluindo câncer, diabetes, doenças renais, neurodegenerativas e infecciosas. Embora o foco tenha sido em drogas anticâncerigenas e no seu desenvolvimento, com ênfase no ciclo celular e CDKs transcricionais. Programas de descoberta de drogas na indústria e academia tem gerado potentes inibidores de CDKs desde o início da década de 1990s, e em particular CDK4 e CDK6 são consideradas altamente validadas como alvos para drogas anticâncer. CDK4 e CDK6 e via Rb associada são desreguladas na maioria dos tumores humanos o que gera muitas oportunidades terapêuticas. Alguns inibidores farmacológicos de CDK4/6 como o Palbociclib (PD-0332991) e o Ribociclib (LEE-011) têm sido desenvolvidos e estão sendo testados em experimentos clínicos (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ et al., 2015).

2.3 MORTE CELULAR E CÂNCER

Morte celular é uma parte essencial do ciclo de desenvolvimento e maturação normal de organismos multicelulares. Um controle homeostático entre a taxa de proliferação e morte celular é crítico para manter o processo fisiológico normal. Alterações nestes mecanismos normais de morte podem levar a doenças, como síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas e câncer (INDRAN et al., 2011).

2.3.1 Apoptose

O termo apoptose foi primeiramente estudado em um artigo clássico, escrito por Kerr, Wyllie e Currie em 1972, para descrever uma forma morfológicamente distinta de morte celular, embora certos componentes do conceito de apoptose

tenham sido descritos explicitamente muitos anos anteriormente (KERR et al., 1972; ELMORE, 2007)

Apoptose é um evento orquestrado, no qual células são programadas para morrer, depois de receber estímulos específicos, além de ser um componente importante do controle de crescimento celular (KOFF et al., 2015). Apoptose é caracterizada por alterações morfológicas, tais como condensação de cromatina, fragmentação nuclear e redução do volume celular (conhecido como picnose) (KROEMER et al., 2008), bem como alterações bioquímicas que incluem ativação de caspases, quebra do DNA e modificações na superfície da membrana e em proteínas, que fazem a célula apoptótica ser reconhecida e engolfada por células fagocíticas.

Regulação alterada do processo de apoptose tem sido ligada a todos os diferentes processos de oncogênese, incluindo iniciação, progressão e metástase. Uma variedade de outras alterações que levam ao aumento da resistência a apoptose tem sido descrita em diferentes células cancerígenas (FULDA et al., 2010; SAKAMOTO; KYPRIANOU, 2010). Estas incluem a diminuição na expressão de genes pró-apoptóticos, tais como BAX, assim como a sinalização diminuída de receptores de morte. Embora, a regulação positiva de genes anti-apoptóticos seja o mais provável mecanismo reportado para evasão da apoptose.

Uma compreensão completa das vias de sinalização da apoptose e como as células tumorais resistem a apoptose é imperativo, para fornecer instruções que desvendem novas terapias para superar ou complementar os tratamentos atuais contra o câncer (INDRAN et al., 2011).

2.3.1.1 Vias da apoptose

A apoptose pode ser induzida por dois mecanismos principais: ligação de ligantes de morte a receptores de morte na via extrínseca ou citotoxicidade que inicia a via intrínseca mitocondrial (KOFF et al., 2015). Em geral, estas vias convergem para ativar uma série de proteases cisteína-aspartato específicas

(caspases), que clivam proteínas celulares chave e desmontam a célula (figura 4). Estes dois processos, embora não sejam exclusivos, eles podem estar ligados as moléculas de uma via e podem influenciar na outra (KOFF et al., 2015). Além disso, evidências recentes apoiam funções não-apoptóticas para muitas moléculas efetoras da via de sinalização apoptótica. Por exemplo, caspase 2, o membro mais conservado da família da caspases, também possui uma função na regulação do ciclo celular, reparo do DNA e supressão tumoral (VAKIFAHMETOGLU-NORBERG; ZHIVOTOVSKY, 2010).

A via extrínseca, mediada por receptor de morte, requer um efetivo engajamento entre os receptores encontrados na superfície da membrana celular e seus respectivos ligantes (INDRAN et al., 2011). A via mediada por receptor envolve receptores de morte da superfamília do fator de necrose tumoral, tais como TNF, CD95 (Fas) e ligante indutor de apoptose relacionado ao receptor TNF (TRAIL). Estes receptores têm um domínio extracelular, que envolve os ligantes e um domínio citoplasmático, que é também referido como um domínio de morte. Este domínio de morte é responsável por transmitir o sinal de morte da superfície para a via de sinalização intracelular (ASHKENAZI; DIXIT, 1998). A ativação dos receptores CD95 ou TNF frequentemente leva ao agrupamento e recrutamento de proteínas intracelulares em complexo de sinalização indutor de morte (DISC), o qual então ativa uma caspase iniciadora, pró-caspase 8. caspase 8 ativada induz a execução das fases da apoptose, pela ativação das caspases efetoras, caspase 3. As caspases ativadas podem também induzir dano mitocondrial e reforçar o sinal de morte, por facilitar a saída de proteínas amplificadoras de morte do espaço interno mitocondrial (ELMORE, 2007; INDRAN et al., 2011)

A via mitocondrial de morte celular pode ser ativada por uma variedade de estímulos independentes de receptor, tais como, radiação, radicais livres, infecções virais e deprivação de fatores de crescimento e soro (figura 4). Foi demonstrado inicialmente, que estes indutores, invariavelmente, resultam em alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial devido a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTM). As principais consequências desta alteração na permeabilidade são: a diminuição do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\psi_m$), a liberação de proteínas pró-apoptóticas e a parada no funcionamento bioenergético da organela. Estas proteínas pró-apoptóticas liberadas podem ser

classificadas em duas categorias: 1) As proteínas que ativam a via dependente das caspases, como a via do citocromo c (cit c); 2) e da Smac/DIABLO.

A permeabilização da membrana mitocondrial conduz a liberação do holocitocromo c induz oligomerização de Apaf-1, levando a ativação da caspase 9. Este complexo ativo cit c/Apaf-1/caspase-9, forma o apoptossoma e ativa a caspase-3 e 7, executoras, resultando no desmantelamento da célula pela fragmentação nuclear (ELMORE, 2007).

O complexo Smac/DIABLO se liga as IAPS (proteínas inibidoras da apoptose) e desativa-as. O segundo grupo de proteínas pró-apoptóticas, tais como AIF (fator indutor de apoptose) e endonuclease G (Endo G), são vistos em alguns modelos como proteínas de evento tardio na apoptose, o qual ocorre uma vez que as células são acometidas para morrer. Seguindo a liberação de AIF, ele transloca para o núcleo aonde ele promove fragmentação do DNA. Ambos AIF e EndoG agem como uma maneira independente de caspase para executar a morte celular (JOZA et al., 2001; INDRAN et al., 2011).

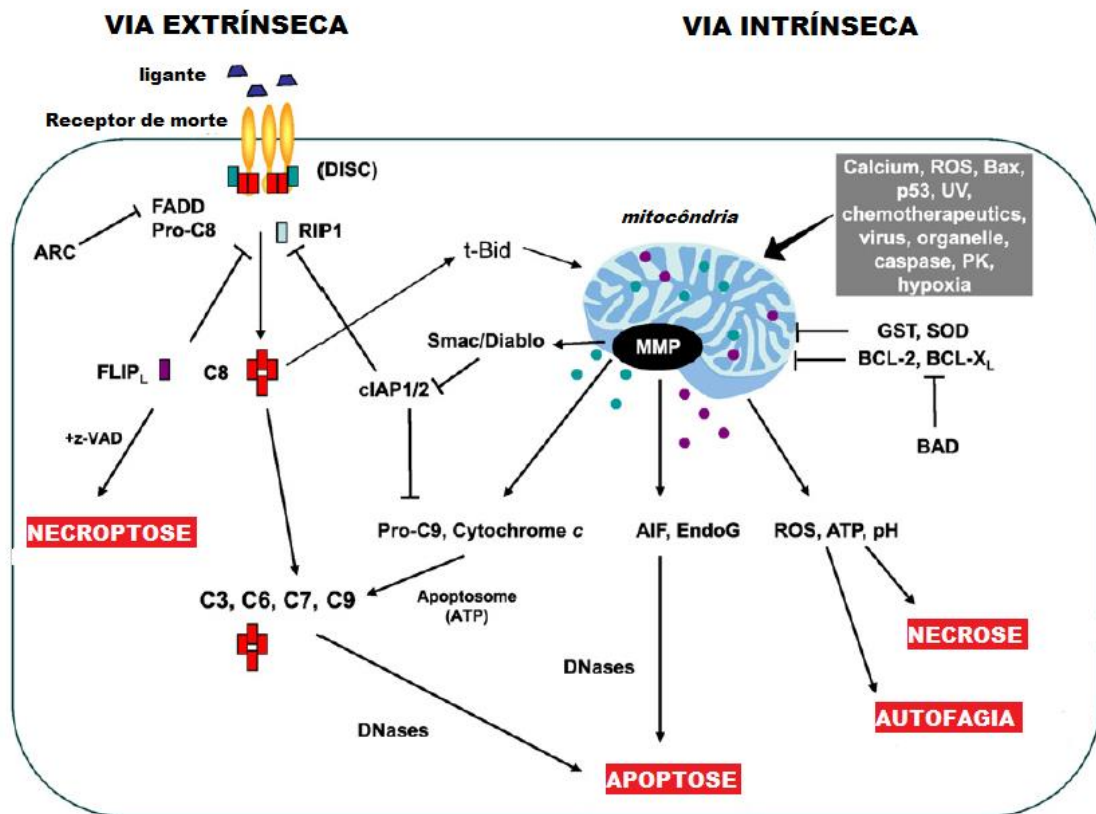


Figura 4: Via extrínseca e intrínseca da apoptose: A via de receptor de morte (esquerda) é iniciada pela ligação de ligantes a seus respectivos receptores de superfície. Isto leva a oligomerização de receptor e formação do DISC, o qual induz a ativação da cascata das caspases, que resulta em modificações no citosol, membrana e núcleo. Quando as caspases não forem ativadas, a morte celular parece se assemelhar a necrose e é chamada necroptose. A via intrínseca (direita) é ativada por múltiplos estímulos, a qual converge para a mitocôndria e induz a permeabilização da membrana mitocondrial (MMP) e resulta subsequentemente na liberação de proteínas mitocondriais pró-apoptóticas no citosol. Isto ativa os processos dependentes e independentes de caspase, culminando na morte celular. MMP dificulta a função mitocondrial, o que desencadeia uma crise bioenergética devido à perda de ATP, a produção de ROS e alterações de pH. Dependendo da intensidade do insulto mitocondrial, a célula pode entrar em apoptose, necrose e/ou morte celular autofágica. Ambas as vias intrínseca e extrínseca podem ser inibidas por proteínas, tais como Bcl-2 e cIAP1/2, que promovem a sobrevivência celular (Fonte: Adaptado de INDRAN et al., 2011).

2.3.1.2 P53 na regulação da apoptose

P53, também conhecida como “guardião do genoma” (LANE, 1992), tem mostrado possuir uma função crítica na via intrínseca de supressão tumoral por dois mecanismos, parada no ciclo celular e indução da apoptose. A ativação de p53 pode acontecer por uma variedade de indutores, tais como, dano ao DNA, ativação oncogênica e destruição da telomerase. P53 controla um grande número de genes que promovem parada no ciclo celular em G1 e G2/M, reconhecimento de dano no DNA, reparo do DNA, apoptose e senescência (LEVINE; OREN, 2009).

Danos no DNA podem ocorrer devido a exposição à radiação ou drogas. Subsequentemente, estes danos sinalizam a ativação das quinases de ponto de checagem celular, tais como ATM e ATR, o qual então leva a fosforilação de p53. A fosforilação de p53 interrompe a interação de p53 com Mdm2 e promove sua ativação (CHEN et al., 2005). P53, em seguida, mantém, a célula em um estágio até que o dano seja reparado. Se o dano for irreversível, a apoptose será induzida.

P53 tem mostrado regular apoptose em ambas formas, dependente e independente de transcrição (MOLL et al., 2005). Na via dependente de transcrição, p53 ativa a expressão de muitas proteínas apoptóticas, tais como, PUMA, Bax e BID, as quais são envolvidas na via intrínseca da apoptose, bem como regula positivamente os receptores CD95 (Fas/Apo1) e DR5, os quais medeiam os sinais da via extrínseca. Na via independente de transcrição, p53 no citosol, ativa diretamente Bax/Bak e neutraliza o efeito anti-apoptótico de Bcl-2 e/ou Bcl-XL na mitocôndria, levando a permeabilização mitocondrial e liberação de citocromo c (BECKERMAN, 2010; INDRAN et al., 2011; PFLAUM et al., 2014).

Como o gene P53 é frequentemente mutado ou inativado em diferentes tipos de câncer, ele é um alvo terapêutico altamente atrativo para tratar a doença. Embora, p53 mutante tenha reportado conferir resistência a diferentes tipos de câncer (LAI et al., 2012), como a principal função de p53 é matar as células tumorais, numerosas estratégias tem sido desenvolvidas para ativar p53 ou restaurar sua função para terapia anticâncer. Embora algumas drogas genotóxicas da quimioterapia tradicional, tais como, Adriamicina e drogas baseadas em platina,

ativam a via p53, elas também causam toxicidade sistêmica e induzem resistência a múltiplas drogas. Torna-se criticamente importante que, quimioterápicos não-genotóxicos sejam desenvolvidos especificamente para o alvo p53 (HAO; CHO, 2014).

2.4 CANAIS IÔNICOS NO CÂNCER

A primeira função importante atribuída aos canais iônicos de membrana plasmática, cerca de 60 anos atrás, foi sua participação na eletrogênese e excitabilidade elétrica. Embora, numerosos estudos subsequentes tenham firmemente estabelecido a contribuição dos canais iônicos em virtualmente todos os comportamentos básicos celulares, incluindo algumas funções cruciais para manter a homeostase do tecido tais como: proliferação, diferenciação, e apoptose (LANG et al., 2005). O maior mecanismo pelo qual os canais iônicos contribuem para estes processos cruciais incluem: prover o influxo de íons de sinalização essenciais, regulação do volume celular e manutenção do potencial de membrana.

A transformação de células malignas resulta do aumento da proliferação, aberrante diferenciação e comprometida habilidade de morrer, que são razões principais para o crescimento anormal do tecido, o qual pode eventualmente se transformar em uma expansão descontrolada e invasão, característica do câncer (HANAHN; WEINBERG, 2011).

O transporte de íons através da membrana possui uma função crucial nas características fundamentais da célula tumoral, tais como a regulação do volume celular, migração, progressão do ciclo celular, proliferação celular (TURNER; SONTHEIMER, 2014; BERCCHETTI, 2011), bem como a morte celular (LANG; HOFFMAN, 2012; TURNER; SONTHEIMER, 2014). Todas estas funções são criticamente importantes para a sobrevivência da célula tumoral e metástase (LANG; STOURNARAS, 2014).

Alguns canais iônicos relevantes para os tumores são regulados por fatores de crescimento e hormônios (FRASER et al., 2014). Na medida em que esses

canais são criticamente importantes para a sobrevivência da célula tumoral, eles podem se tornar alvos terapêuticos promissores (LANG; STOURNARAS, 2014). É necessário dizer, no entanto, que os canais aplicáveis clinicamente para a supressão tumoral são aqueles que não apresentam funções importantes em outras células, por exemplo, os canais necessários para repolarização cardíaca.

2.4.1 Canais de potássio

Os canais de potássio são proteínas transmembrana definidas pela sua habilidade de facilitar seletivamente a permeação de íons K^+ entre o ambiente intracelular e extracelular. Íons, tais como K^+ , Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} , são assimetricamente distribuídos através da membrana plasmática, e isto resulta em um gradiente eletroquímico, o qual é mantido através do transporte ativo (dependente de ATP). Na presença dos canais iônicos que facilitam o movimento de íons específicos, o gradiente eletroquímico também resulta em um potencial de membrana que é usado para dirigir o transporte de muitas moléculas e como um proeminente mecanismo de sinalização. A magnitude do potencial de membrana depende da presença da permeabilidade iônica específica, e sua abertura resulta em um fluxo de íons para baixo do seu gradiente eletroquímico. Com isto o potencial de membrana também altera até o potencial de equilíbrio do íon ser atingido. Na presença da permeabilidade para um único íon, este potencial de equilíbrio é unicamente dependente da concentração do íon em ambos os lados da membrana. Quando a célula encontra-se em condições de repouso, quase todos os íons que se movem através da membrana são íons K^+ , e isto resulta no potencial de membrana negativo. Íons K^+ podem também se mover através do canal de cátion não-seletivo, a ativação do qual tende a cancelar o potencial de membrana pelo equilíbrio da concentração de íons em ambos os lados (PARDO; STÜHMER, 2014).

Os canais de K^+ são uma das classes mais diversas de proteínas de membrana. Eles têm mais de 77 genes diferentes, e estes são agrupados em família de genes KCNA, KCNB, KCNC, KCND, KCNF, KCNG, KCNH, KCNJ, KCNK, KCNM, KCNN, KCNG, KCNS, KCNT, KCNU e KCNV (GUTMAN et al., 2005). Estes canais

têm uma estrutura tipicamente conservada, que consiste de dois domínios transmembrana e uma estrutura hairpin (conhecida como loop formador do poro) (figura 5) (PARDO; STÜHMER, 2014).

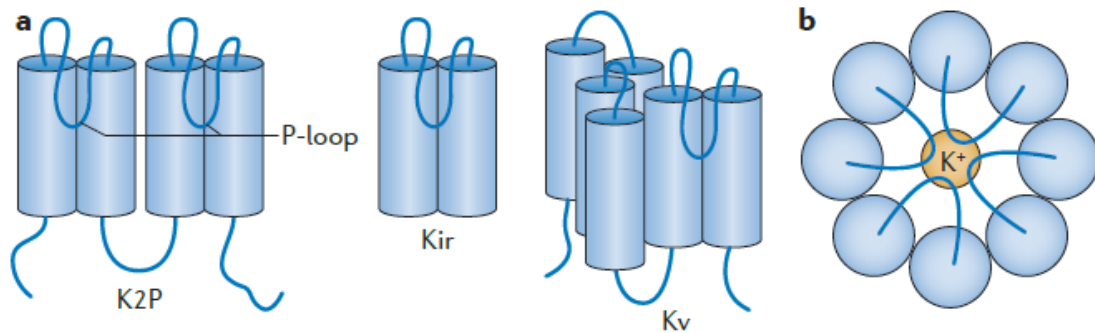


Figura 5: Estrutura esquemática do canal de potássio. A) Uma visão lateral dos monômeros de um canal de potássio retificador de entrada (Kir), um canal de potássio com dois poros de domínio, (K2P) e um canal de potássio voltagem-dependente (Kv). B) Uma visão de cima de um canal Kir ou KV, mostrando os dois segmentos transmembrana de cada uma das quatro subunidades e seus correspondentes “loops” formadores do poro. Para os canais K₂P, a figura deveria mostrar quatro segmentos transmembrana de cada uma das duas α-subunidades (cada uma com 2 P-loops) constituindo o canal (Fonte: PARDO; STÜHMER, 2014).

2.4.1.1 Canais de potássio e proliferação celular

A partir de ferramentas farmacológicas, tem sido possível melhorar o entendimento da função dos canais de K⁺ na proliferação celular. Evidências experimentais, na fisiologia celular e farmacologia, demonstram que os canais de K⁺ são envolvidos na proliferação de células normais e células tumorais. A função fisiológica dos canais de K⁺ no crescimento celular tem sido confirmada por diversos experimentos (FELIPE et al., 2006). Desde 1996, uma lista de drogas, as quais demonstram que o bloqueio farmacológico dos canais de K⁺ inibe a proliferação celular, tem aumentado consideravelmente. A atividade destes canais é importante durante a transição G1/S, embora nem todas as isoformas possam atuar ao mesmo tempo. Tem sido estabelecido que os canais de K⁺ podem ser importantes nos

estágios iniciais de G1, durante a transição G1/S e durante a fase G2. O uso de ferramentas farmacológicas sugere que, o controle dos canais de K^+ pode envolver alguns inibidores de CDK, tais como p21 e p27 (RENAUDO et al., 2004).

2.4.1.2 Canal de potássio na apoptose

Canais de potássio são envolvidos na manutenção do potencial de repouso e eles representam uma parte integral de todas as células. Como estes canais provêm um efluxo de K^+ , o qual é o cátion dominante do meio intracelular, eles também são importantes reguladores do volume celular. Alguns destes canais têm sido identificados em vários tipos de carcinoma, onde eles estão envolvidos na proliferação e inibição da apoptose em células tumorais (WANG, 2004). Isto é consistente com o paradigma do qual o aumento do efluxo de K^+ é associado com a promoção da apoptose, e inversamente, que a apoptose é atenuada se o efluxo de K^+ é diminuído (REMILLARD; YUAN, 2004; YU, 2003).

O mecanismo para os efeitos pró-apoptóticos do efluxo de K^+ aumentado incluem: 1) queda do potencial de membrana; 2) encolhimento celular apoptóticos e ativação de efetores pró-apoptóticos (YU, 2003). Em particular, diminuição no K^+ intracelular parece promover eventos críticos durante as fases iniciais da morte celular, incluindo clivagem proteolítica de pró-caspase 3 e atividade de endonucleases (REMILLARD; YUAN, 2004).

O bloqueio dos canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de larga condutância (canais BK) em células HeLa e células A2780 resultam em apoptose das células tumorais e parada do ciclo celular na fase G1. Neste estudo a via de transdução ligada ao efeito anti-proliferativo é ligada ao aumento da expressão da proteína apoptótica p53 (HAN et al., 2007).

Adicionalmente aos canais iônicos localizados na membrana plasmática, muitos canais iônicos mitocondriais, incluindo o poro de transição de permeabilidade mitocondrial e os canais aniônicos dependentes de voltagem, têm sido envolvidos na regulação da morte por apoptose, especialmente de eventos apoptóticos localizados

na mitocôndria (JONAS, 2009; SHOSHAN-BARMATZ, et al, 2006; O'ROURKE, 2004). O fluxo de potássio mitocondrial é importante, para controlar a força motora de prótons na mitocôndria energizada (BERNARDI, 1999; GARLID, et al., 2003; CZYZ, et al., 1995). Muitos agentes que agem nos canais de K^+ mitocondrial estão sendo desenvolvidos, para possível atividade antitumoral (PATHANIA et al., 2009). Por exemplo, os ativadores de canais de potássio, diazoxida e cromacalina, conhecidos por afetar os canais de K_{ATP} da membrana plasmática, bem como da mitocôndria (GARLID et al., 1996), tem potencial antitumoral em neuroblastoma humano e astrocitoma humano (LEE et al., 1994). Diazoxida tem mostrado diminuir a divisão de células leucêmicas, por causar a despolarização da membrana mitocondrial (HOLMUHAMEDOV, et al., 2002).

Gulbins e colaboradores (2010), demonstraram a importância do mitoKv1.3 (canal Kv1.3 mitocondrial) para apoptose em linfócitos. A inibição promovida pela inserção de Bax no canal mitoKv1.3, da membrana externa da mitocôndria, leva a hiperpolarização inicial, liberação de ROS, despolarização tardia e liberação de citocromo c.

Para se evadir da morte por apoptose, as células malignas se previnem da diminuição do K^+ intracelular, pela regulação negativa dos canais de K^+ (BONNET et al., 2007).

2.5 INFLAMAÇÃO E CÂNCER

A inflamação tem sido associada ao câncer, mas só na última década tem sido possível entender, como células inflamatórias e outras moléculas do estroma tumoral impulsionam a progressão do tumor, por criar um microambiente, que é enriquecido pelas mesmas citocinas que são protagonistas da inflamação crônica associada ao câncer de fígado, estômago e cólon. De fato, a inflamação é uma condição que promove o tumor, afeta e converge em quase todos os tipos de cânceres sólidos para permitir muitas das características do câncer e promover a progressão de neoplasias incipientes em tumores malignos completos (CAO et al., 2011).

A função crítica da inflamação crônica no câncer foi primeiramente proposta por Rudolf Virchow em 1863, quando ele observou a presença de leucócitos em tecidos neoplásicos (MANTOVANI, et al., 2008; AGGARWAL et al., 2009; SETHI et al., 2012).

O microambiente tumoral consiste do tumor, células inflamatórias imunes e estromais, todas as quais produzem citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão que podem promover a promoção do tumor e metástase. De forma interessante, há uma associação entre a inflamação crônica e desenvolvimento e progressão do tumor e 15% de todos os cânceres são atribuídos a etiologias inflamatórias (COLOTTA, et al., 2009).

A inflamação crônica age como um regulador na promoção e progressão tumoral, por muitos mecanismos, incluindo, aceleração da proliferação celular, evasão da morte por apoptose, aumento da angiogênese e metástase (AGGARWAL et al., 2006; SETHI et al., 2012). O mecanismo para o desenvolvimento do câncer, na presença da inflamação crônica, envolve a presença contínua de citocinas, quimiocinas, ROS, oncogenes, COX-2 (Ciclo-oxigenase-2), 5-LOX (5-Lipoxigenase), MMPs (metaloproteinases) e ativação de importantes fatores de transcrição, tais como, NF- κ B (fator nuclear κ B) e STAT-3, AP-1 e HIF-1 α .

Drogas que tem o alvo na inflamação relacionada ao câncer tem o potencial para inibir o infiltrado inflamatório que promove o tumor ou para prevenir tais células de migrar para o local do tumor. Essas drogas podem ser capazes de “realinhar” o microambiente promotor do tumor, tornando-o microambiente inibidor de tumor. O potencial para reverter a inflamação que dá suporte ao tumor deve ser o início de uma nova era promissora para terapia anticâncer.

2.5.1 Citocinas envolvidas no desenvolvimento do tumor

Citocinas são proteínas de baixo peso molecular que medeiam a comunicação célula-célula. Citocinas regulam crescimento, tráfego de sinalização e diferenciação de ambas as células, estromais e células tumorais. As citocinas

produzidas pelas células cancerígenas funcionam para criar condições para favorecer o microambiente tumoral, e as citocinas secretadas pelas células estromais podem influenciar o comportamento de células malignas (BALKWILL; MANTOVANI, 2001). Células imunes e estromais, tais como fibroblastos e células endoteliais, sintetizam citocinas, e estas regulam a proliferação, sobrevivência celular, diferenciação, ativação imune, migração celular e morte. Dependendo do microambiente tumoral, as citocinas podem modular uma resposta anti-tumoral, mas durante a inflamação crônica, elas podem induzir a transformação celular e malignidade (figura 6), dependendo do balanço entre as citocinas pró e anti-inflamatórias, suas relativas concentrações, conteúdo expresso de receptor de citocina e estado de ativação de células ao redor do tumor (ZAMARRON; CHEN, 2011; LANDSKRON et al., 2014).

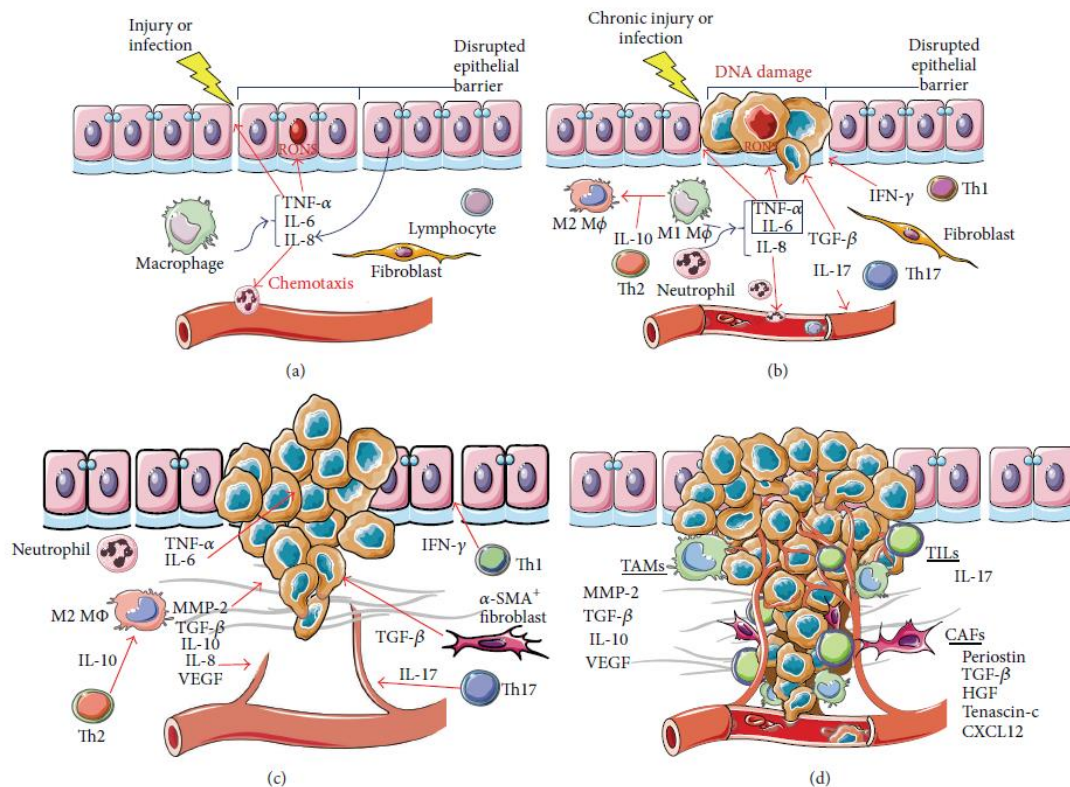


Figura 6: Ilustração esquemática da função das citocinas na carcinogênese. (a) durante a injúria tecidual ou infecção, uma resposta imune ativa a expressão de mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF- α , IL-6 e IL-8 de macrófagos e neutrófilos. Estas citocinas podem romper a barreira epitelial, induzir espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS) e promover a infiltração de outras células inflamatórias. (b) Na inflamação crônica, citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α podem induzir dano ao DNA através de RONS, os quais levam a iniciação tumoral. (c) crescimento e invasão tumoral são também favorecidos por citocinas pró-inflamatórias que estimulam a proliferação celular, reduzem apoptose aumentam a transição epitelial-mesenquimal (EMT) e angiogênese, a qual é facilitada pelo fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) e IL-8. Citocinas anti-inflamatórias, tais como, IL-10 e TGF- β , contribuem para a evasão imune tumoral. (d) Macrófagos associados ao tumor (TAMs), linfócitos infiltrantes tumorais (TIL) e fibroblastos associados ao câncer (CAF), secretam muitos fatores que contribuem para o crescimento tumoral e metástase (Fonte: LANDSKRON et al., 2014).

TNF- α é um mediador da inflamação aguda e crônica e tem sido detectado em carcinomas de cólon, mama, próstata e ovário, assim como linfomas e leucemias. O potencial pró-inflamatório de TNF- α tem sido analisado em vários modelos animais de câncer. Em um modelo genético de câncer de fígado, o TNF- α produzido por células mielóides, promoveu tumores associados à inflamação (BALKWILL, 2009). Níveis elevados de TNF- α têm sido detectados em vários pacientes com câncer. Em pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC), os níveis de TNF- α foram significativamente maiores quando comparados à população

controle saudável e tem agido como um preditor de sobrevivência do paciente (FERRAJOLI et al., 2002).

Muitas interleucinas (ILs) têm sido ligadas ao processo inflamatório e subsequente desenvolvimento do câncer. Dentre estas, inclui-se IL-1, IL-6, IL-8 e IL-17. IL-1 α , a qual é expressa em tecido normal e por muitas células tumorais, é uma citocina regulatória, que pode induzir a ativação de fatores de transcrição, incluindo NF- κ B e AP-1, e promove a expressão de vários genes envolvidos na sobrevivência celular, proliferação e angiogênese (WOLF et al., 2001). Evidências diretas para a função da IL-1 β em cânceres humanos têm sido encontradas em mieloma múltiplo. IL-1 β quando liberada pelas células de mieloma podem induzir a produção de IL-6 pelas células do estroma da medula óssea, a qual funciona como um fator de crescimento autócrino para células de mieloma (LUST et al., 2009). IL-1 β também regula positivamente a proteína HIF- α , através de uma via sinalização clássica inflamatória, envolvendo NF- κ B e COX-2, culminando na regulação positiva de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), um potente fator angiogênico, necessário para o crescimento tumoral e metástase (JUNG et al., 2003).

IL-6 é uma citocina pró-inflamatória associada à inflamação, a qual tem sido envolvida no processo de carcinogênese (HONG et al., 2007; NAUGLER; KARIN, 2008). IL-6 modula a expressão de genes envolvidos na proliferação, sobrevivência e angiogênese pela via de sinalização JAK (Janus-kinase)-STAT (LIN; KARIN, 2007). Níveis elevados de IL-6 têm sido detectados em pacientes com câncer sistêmico, quando comparados a controles saudáveis ou pacientes com doenças benignas (LANDSKRON et al., 2014). Uma superprodução de IL-6, revelada pelos níveis aumentados de proteína C - reativa, tem sido encontrado em 37% de pacientes com diagnóstico de mieloma múltiplo e é associado à agressividade da doença, proliferação de células de mieloma e pior prognóstico (SETHI et al., 2012).

A IL-6, semelhantemente ao TNF- α , facilita o desenvolvimento do tumor, por promover a conversão de células não cancerígenas em células-tronco tumorais. Em particular, a secreção de IL-6 por células-tronco não cancerígenas, em baixas condições de adesão da cultura, regula positivamente a expressão do gene Oct4 pela ativação da via de sinalização IL-6R/JAK/STAT3 (KIM et al., 2013).

Estas descobertas têm levado os pesquisadores a propor que, a IL-6 seja um alvo terapêutico no câncer. Muitas triagens de fase clínica I/II estão avaliando anticorpos contra IL-6 ou IL-6R como alternativas terapêuticas (COWARD et al., 2011; KURZROCK et al., 2013).

2.5.2 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no processo da carcinogênese

Em uma resposta inflamatória, a ativação de células imunes e epiteliais induz a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) por meio da indução da NADPH oxidase e Óxido nítrico sintase (NOS), respectivamente. A ativação de células fagocíticas pode induzir diretamente a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, coletivamente chamados (RONS), ativando NOX₂, NADPH oxidase e iNOS. No entanto, TNF- α , IL-6 e TGF- β induzem a geração de RONS em células não fagocíticas (YANG et al., 2007; KRAUSE et al., 2012; LANDSKRON et al., 2014).

O aumento da expressão de NADPH oxidase e NOS, e seus produtos (RONS) tem sido identificado em vários cânceres, sugerindo que radicais livres tem uma função na gênese e progressão maligna (HUSSAIN et al., 2003).

Diferentes mecanismos têm sido propostos para esclarecer a participação de RONS no desenvolvimento do câncer. RONS induzem estresse oxidativo e danos aos lipídeos, proteínas e DNA, assim como a produção de 8-oxo-7, 8-dihidroxi-2'-deoxiguanosina (8-oxodG), a qual é atualmente usada como marcador de dano ao DNA (LANDSKRON et al., 2014).

RONS são gerados por estresse celular e modificação de macromoléculas, embora eles também estejam envolvidos na regulação de vias de sinalização, como na sobrevivência e proliferação por Akt, Erk1/2 e ativação do fator-1 indutor de hipóxia (HIF-1) (LI et al., 2013).

Há grandes evidências que ligam a carcinogênese a resposta inflamatória e RONS, e estratégias terapêuticas para prevenção do câncer usando inibidores de

radicais livres e sinalização pro-inflamatória tem sido avaliados em modelos animais (RAO et al., 2002; TAKAHASHI et al., 2008).

2.6 ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN (AMBH)

O uso de moléculas obtidas de plantas medicinais tem resultado em algumas alternativas terapêuticas, mas a pequena quantidade do extrato obtido a partir de plantas e/ou a alta complexidade dessas estruturas, tornam a produção desses fármacos naturais, muitas vezes impraticáveis, tanto pela extração natural, como pela síntese química. Dessa forma, a descoberta e identificação de substâncias relativamente simples, que possam ser preparadas através de poucas etapas e com uma boa produtividade, se apresenta como uma alternativa eficiente para a síntese de novas moléculas bioativas (JÚNIOR et al., 2010). Dentro desse contexto encontra-se a reação de Morita-Baylis-Hillman (RMBH).

A RMBH é uma importante via para formação de ligações C-C, entre um carbono eletrofílico (aldeídos, cetonas ou iminas) e a posição α de um alceno (ou Alcino) ligado a grupos retiradores de elétrons (GRE) na presença de aminas terciárias como catalisadores nucleofílicos dos quais o 1,4-diazabicyclo [2.2.2]octano (DABCO) é o mais utilizado, tendo como produto os adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH) (figura 7) (BASAVAIAH et al., 2007; JÚNIOR et al., 2010; JÚNIOR, VASCONCELLOS, 2012).

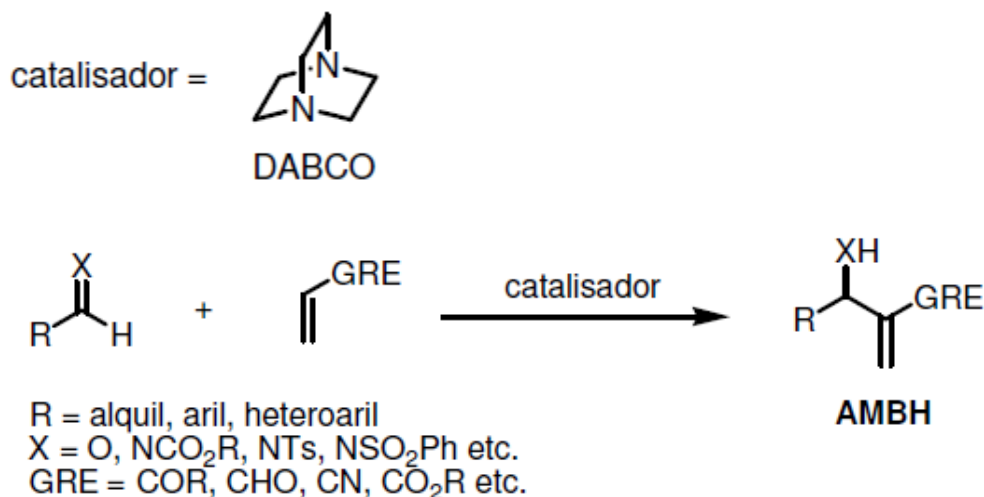


Figura 7: Representação esquemática da reação de Morita-Baylis-Hillman, com aldeídos por exemplo.

Os adutos de Morita-Baylis-Hillman, os quais podem ser preparados em um passo de RMBH, tem sido extensivamente usados como intermediários em síntese orgânica para uma variedade de aplicações (BASAVAIAH et al., 2010). Um inconveniente desta reação é o longo tempo necessário para realizá-la. Há relatos de reações com duração de até 65 dias. Embora, devido ao potencial sintético destes adutos, muitos protocolos têm sido propostos para acelerar este tempo: tais como uso de micro-ondas, ultrassom, adição de sais e metais, alta pressão e líquidos iônicos (BASAVAIAH et al., 2010; LEITE et al., 2012).

Recentemente, Júnior (2012) demonstrou a obtenção de AMBH usando a condição de baixa temperatura (0° C) sob agitação magnética, bem como o uso de um reator de micro-ondas à temperatura de 80 °C, obtendo ótimo rendimento (99%) para vários AMBH, inclusive para as moléculas utilizadas neste estudo, como A2CN, A3CN e A4CN.

Os AMBH são um novo grupo de moléculas sintéticas que tem demonstrado diversas atividades biológicas e potencialidades para a descoberta de novas drogas, como atividade anti-leishmania, anti-malária, anti-tripanosossoma, antibacteriana, herbicida, antifúngica (LIMA-JÚNIOR; VASCONCELLOS, 2012).

O 3-hidroxi-2-metileno-3-(4-nitrofenil)-propanonitrila é um AMBH, o qual pode ser preparado em um passo de reação MBH através de *p*-nitrobenzaldeído e acrilonitrila conforme figura 8 (DE SOUZA; VASCONCELLOS, 2003; BAYLIS; HILLMAN, 1972). Esta molécula, denominada neste trabalho como A2CN, teve sua bioatividade primeiramente descrita em 1999, contra *Plasmodium falciparum*, o parasito causador da malária (KUNDU et al., 1999). Em 2006, a atividade moluscicida de A2CN e outros AMBH aromáticos, foi determinada contra *Biomphalaria glabrata* (VASCONCELLOS et al., 2006). Subsequentemente, uma potente atividade leishmanicida contra *Leishmania amazonenses* (VASCONCELLOS et al., 2007) e *Leishmania chagasi* (BARBOSA et al., 2009) foram também descritas para A2CN. Sandes e colaboradores (2010) demonstraram um potente efeito de A2CN em forma epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, e induziram alterações nestes parasitas características de apoptose. Recentemente, o mesmo grupo, demonstrou que A2CN induz necrose, de forma dependente da mitocôndria (SANDES et al., 2014).

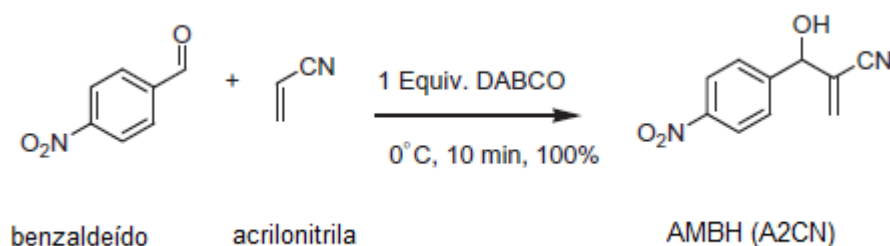


Figura 8: Representação esquemática da síntese de A2CN (Fonte: Silva et al., 2010)

As principais considerações relatadas quanto ao mecanismo de ação biológico dos AMBH, foram extensivamente discutidas na revisão descrita por Lima-Júnior e Vasconcellos (2012), no qual a maioria dos bioligantes α,β -insaturados são eletrófilos e podem reagir com grupos SH, NH e OH (nucleófilicos), presentes em receptores ou enzimas. Alguns AMBH podem atuar inibindo a síntese de glutamina, que geralmente encontra-se alterado em células tumorais.

Um trabalho recente, desenvolvido por Xavier e colaboradores (2014), mostrou pela primeira vez a avaliação das atividades biológicas de um AMBH

enantiomericamente puro. Foi demonstrado por esses autores, que a mistura racêmica de 3-hidroxi-2-metileno-3-(3-nitrofenil)-propanonitrila, um isômero de A2CN, foi mais ativa sobre cepa de *Leishmania (Viannia) brasiliensis*, que seus enantiômeros (R) e (S) purificados.

2.6.1 Adutos de Morita-Baylis-Hillman com Atividade Anticâncer

O primeiro trabalho apresentando a bioavaliação de AMBH contra linhagens de células tumorais humanas foi apresentado no trabalho de Kohn e colaboradores (2006), onde 18 AMBH (aromáticos e alifáticos) e derivados apresentaram atividade antiproliferativa *in vitro*. Foram investigadas neste trabalho, 8 linhagens diferentes de células tumorais: UACC62 (melanoma), MCF7 (mama), NCI460 (pulmão), OVCAR (ovário), PC03 (próstata), HT29 (cólon) e 786-0 (rins). Os compostos aromáticos foram mais ativos que os não aromáticos e os que apresentavam grupos substituintes, retiradores de elétrons tinham a atividade aumentada. Os derivados nitro e ciano mostraram um efeito pronunciado em todas as linhagens testadas.

No mesmo ano (2006), Mohan e colaboradores demonstraram a atividade de alguns AMBH em inibir a linhagem de câncer cervical Hela, em concentrações de 1-2 μ M. As moléculas mais potentes eram derivados hidroximetilados, cuja atividade estava relacionada ao efeito antimicrotúbulos, causando desorganização dos microtúbulos e inibição da tubulina nesta linhagem.

Outro trabalho apresentado por Dadwal e colaboradores (2006), com nove AMBH em linhagem de células Hela, a maioria dos adutos produzia de 70-100 % de inibição destas células em 25 μ M, e seu efeito estava relacionado a inibição da tubulina.

Podemos constatar que os adutos de Morita-Baylis-Hillman vêm se mostrando como uma importante classe de compostos anticâncer, sendo de total relevância investigações da atividade destes frente a linhagens de células tumorais *in vitro*, bem como do mecanismo de ação apresentado por estes compostos e também no aprofundamento dos estudos antitumorais *in vivo* e de sua toxicidade.

OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1 Geral

Avaliar o potencial anticâncer e anti-inflamatório de adutos de Morita-Baillys-Hillman.

3.2 Específicos

- Avaliar a atividade citotóxica de A2CN, A3CN e A4CN em células normais e tumorais;
- Analisar os efeitos dos adutos no ciclo celular;
- Verificar os efeitos de um dos adutos, A2CN, no potencial transmembrânico mitocondrial e na produção de espécies reativas de oxigênio;
- Verificar a expressão dos genes relacionados ao ciclo celular, p21, p27, p53, ciclinas E e D1 em células K562;
- Verificar a expressão dos genes relacionados aos canais iônicos Kv1.3 e Kv3.1 em células K562;
- Investigar o efeito de um dos adutos, A2CN, a partir dos registros dos canais de potássio da membrana de células K562;
- Investigar a participação de canais de K⁺ na citotoxicidade de A2CN;
- Analisar a produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio de células Raw 264.7, após o tratamento com AMBH;
- Verificar a expressão dos genes relacionados à inflamação, IL-1 β , IL-6 e COX-2;
- Avaliar a produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α por células Raw 264.7, após o tratamento com AMBH.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAL

4.1 Compostos químicos

Foram utilizados compostos sintéticos aromáticos obtidos por RMBH (reação de Morita-Baylis-Hillman), para a realização da triagem farmacológica. Todos os compostos foram sintetizados e fornecidos pelo professor Dr. Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos, do Departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba e pesquisador responsável do Laboratório de Síntese Química Medicinal.

Para a realização dos ensaios *in vitro*, os AMBH foram previamente solubilizados em 100 % de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, EUA) puro e estéril para obtenção da solução estoque de 20 mM, em seguida diluídos em meio RPMI 1640 ou DMEM em intervalos de concentrações que variaram de 1-200 μ M. A concentração final de DMSO não ultrapassou 0,5 % na maior concentração testada nas culturas de células. A figura 9 mostra a estrutura química das três moléculas utilizadas nos testes de citotoxicidade.

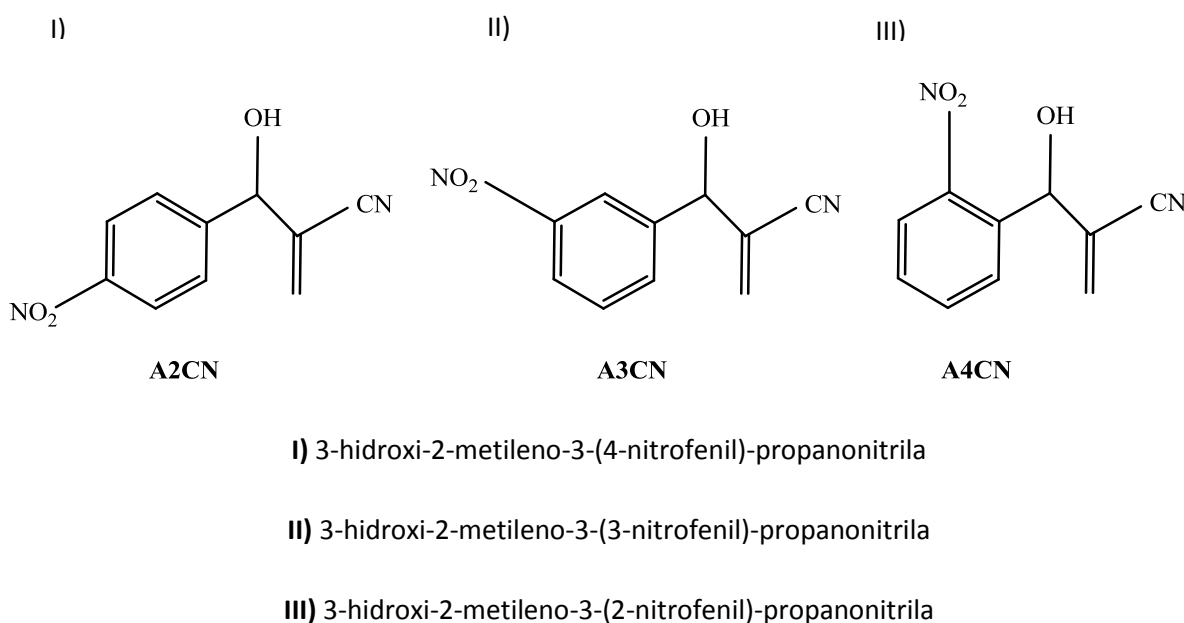


Figura 9: Estruturas químicas dos AMBH utilizados nos testes de citotoxicidade.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Células normais e tumorais

As linhagens de células normais e tumorais foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ): HL-60, MOLT-4, K562, K562-lucena, MCF-7, HT-29, L929, RAW264.7. A linhagem FN1 e B16F10 foram gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, do Instituto Butantan, São Paulo.

Tabela 1: Modelos de linhagens e células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade

<i>Linhagens celulares</i>
<i>PBMC (células mononucleares do sangue periférico)</i>
<i>FN1 (fibroblastos normais humano)</i>
<i>K562 (leucemia mielóide crônica humana)</i>
<i>K562-Lucena (leucemia mielóide crônica humana expressando altos níveis de PgP)</i>
<i>HL-60 (leucemia mielóide aguda humana)</i>
<i>Molt-4 (leukemia linfoblástica aguda humana)</i>
<i>MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano)</i>
<i>HT-29 (adenocarcinoma colorectal humano)</i>
<i>B16F10 (melanoma de pele murino)</i>
<i>L929 (fibrosarcoma murino)</i>

4.2.2 Cultivo celular

As células foram cultivadas em frascos de cultivo utilizando o meio RPMI 1640 (SIGMA, Brasil) ou DMEM (SIGMA, Brasil) acrescido de antibióticos: penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL (SIGMA, Brasil) e suplementado com 10% de soro bovino fetal (CRIPION, Brasil). As células foram manipuladas em

fluxo laminar, para garantir que não houvesse contaminações, e em seguida incubadas com 5% de CO₂ a 37 °C. O crescimento celular foi acompanhado a cada 24 horas, com auxílio de microscópio invertido, sendo o meio de cultura trocado a cada 48 horas. Ao atingir 80% de confluência, era feita a adição de solução de tripsina, por 5 min, para descolamento das células aderentes ou até observar-se o descolamento da monocamada de células da parede do frasco. Após esse período acrescentou-se 5 mL de meio RPMI com 10% de SBF para interromper a ação da tripsina. As células foram centrifugadas a 500 x *g* por 5 min e ressuspensas em 2 mL de meio com SFB para contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi medida usando o corante azul de Tripán (Sigma, Brasil). Se a cultura apresentasse 90% de células viáveis eram então destinadas aos experimentos, e uma alíquota era colocada em novos frascos para cultivo.

Para manter o estoque de células, parte das culturas foram criopreservadas. As células foram removidas das garrafas usando uma solução de tripsina/EDTA em seguida foram centrifugadas por 5 min a 1500 rpm. O sobrenadante era desprezado e o precipitado ressuspenso em 2 mL de meio RPMI com 10% de SBF e 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) como criopreservante. Em seguida as amostras foram adicionadas em tubos criogênicos de 1,0 mL e levadas por meia hora a temperatura de -20°C, em seguida acondicionadas a -80°C por mais meia hora, e finalmente estocado em tambor de nitrogênio líquido.

4.2.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico humano- PBMC (do inglês “peripheral blood mononuclear cell”)

As células PBMC foram isoladas a partir de amostras de sangue, cedidas pelo Hemocentro da Paraíba, de doadores saudáveis, não-fumante que não tenham tomado qualquer medicamento por pelo menos 15 dias antes da amostragem e com idade entre 18-30 anos. As amostras que foram fornecidas seriam descartadas pelo Hemocentro/PB.

Esse estudo foi realizado com base na resolução nº 196/96 do CNS/MS que regulamenta a ética de pesquisa com seres humanos e foi aprovado pelo Comitê de

Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley – CEP/HULW, nº protocolo 655/10, folha de rosto nº 378119.

Para a obtenção das PBMC foi usado uma alíquota de 3 mL de sangue e homogeneizado com 3 mL de meio RPMI sem suplemento, em tubos estéreis, seguido da adição de 4,5 mL de Ficoll-Histopaque. Realizou-se a centrifugação de $400 \times g$ por 30 min sendo o plasma descartado cuidadosamente. A seguir, retirou-se as células PBMC que encontravam-se na interface entre o plasma e o Ficoll, e adicionou-se em um tubo de centrifugação, realizando-se duas lavagens com 12 mL de meio RPMI incompleto, seguido de centrifugação ($400 \times g$, 10 min). Desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi agitado no vórtex com 10 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal. Posteriormente, as células foram avaliadas quanto a sua viabilidade seguindo então para os experimentos, quando a viabilidade obtida foi igual ou superior a 90% (FAHEINA-MARTINS et al., 2012).

4.2.4 Avaliação da atividade citotóxica pelo método de redução de (MTT)

O método MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium) é um simples método colorimétrico que mede a atividade metabólica celular, permitindo avaliar a citotoxicidade, proliferação ou viabilidade celular (MOSMANN, 1983). O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais e outras enzimas lisossomais (LIU et al., 1997). Na verdade, o MTT não interage diretamente com as desidrogenases e sim com os seus subprodutos, NADH e NADPH (LIU et al., 1997). Os cristais de formazan são solubilizados, formando assim um composto colorido cuja medição da densidade óptica é feita em espectrofotômetro, leitor de placa ($\lambda = 570 \text{ nm}$). A intensidade do produto colorido formado é diretamente proporcional ao número de células viáveis presente na amostra, confirmando a capacidade redutora do sistema sobre o MTT (LIU et al., 1997; HEINRICH et al, 2005).

Procedimento experimental

As células foram depositadas em placas de 96 poços e mantidas por 24 horas a 37°C com 5% de CO₂ numa densidade de 3×10^4 células/poço, para as culturas aderentes (MCF-7, HT-29, L929, Raw264.7, FN1, B16F10), e 5×10^4 células/poço para as culturas em suspensão (HL-60, MOLT-4, K562 e K562-lucena). Após 24 horas os AMBH foram adicionados separadamente em concentrações de 1-200 µM. A análise da viabilidade foi realizada após 24 e 72 horas da adição dos AMBH. Para tanto, o sobrenadante foi parcialmente removido. Após 1ª centrifugação (200 x g/5 min), e foi adicionado solução de MTT (5mg/mL em PBS) (m/v). As placas foram incubadas por 3-4 horas, para redução do sal e formação dos cristais de formazan, que foram solubilizados com a adição de 10% de SDS/HCl (0,01N) por 16 h. As placas foram lidas em um espectrofotômetro do tipo Leitora de ELISA (BIOTEK, ELx800, EUA) à 570 nm.

4.3 ENSAIOS DE MECANISMO DE MORTE CELULAR

Após os ensaios de citotoxicidade dos compostos AMBH nas linhagens celulares, foi escolhido o composto A2CN para estudo do mecanismo de ação, devido ao seu melhor potencial citotóxico nas diversas linhagens testadas.

4.3.1 Viabilidade celular- iodeto de propídeo

Esse teste se baseia na capacidade do corante iodeto de propídeo se ligar ao DNA e emitir alta fluorescência quando excitado pelo laser. Células com membrana íntegra não permitem a entrada do corante iodeto de propídeo, portanto as células viáveis não fluorescem. No entanto, células com membrana rompida permitirão a entrada do corante que se ligará ao DNA, emitindo alta fluorescência.

Procedimento experimental

As células K562 na concentração (5×10^5 células/poço) foram incubadas em placas de 24 poços com A2CN (15, 30 e 60 μM) por 24 horas em incubadora à 5% de CO_2 à 37 °C. Após o tratamento as células foram coletadas por centrifugação ($200 \times g/5 \text{ min}$) e ressuspensas em 998 μl da solução PBS gelada. No momento da leitura adicionava-se iodeto de propídeo (50 $\mu\text{g/ml}$)(SIGMA, EUA) e as amostras protegidas da luz. Após 5 min as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo BD FACS Calibur (EUA) em FL-2. Foram analisados 10.000 eventos de fluorescência laranja em 585 nm.

4.3.2 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

A morte celular por apoptose é frequentemente acompanhada por uma diminuição inicial do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\psi\text{m}$) (HUANG, 2002). Um dos fluorocromos mais utilizados neste tipo de ensaio é a tetrametilrodamina-metil-éster (TMRM), por ser específico e não promover grandes interferências no metabolismo da mitocôndria. Esse corante catiônico é sequestrado pela matriz mitocondrial em quantidades que são proporcionais ao potencial mitocondrial. Assim, a partir da quantidade de fluorescência do corante, estima-se o potencial mitocondrial.

Procedimento experimental:

As células K562 foram adicionadas em placas de 24 poços na concentração de 5×10^5 células/poço e tratadas com A2CN (15, 30 ou 60 μM) e com Etoposídeo (5 μM). Como controle negativo usou-se o DMSO 0,5 %. Como controle positivo desse ensaio foi utilizado o protonóforo CCCP (caronil cianeto m-clorofenildrazona)(SIGMA, EUA), na concentração de 100 μM , por 15 min. Após 24 h de exposição, as amostras foram centrifugadas ($200 \times g, 5 \text{ min}$), lavadas com meio

de cultura e marcadas com 150 nM de TMRM (Sigma Aldrich, EUA). Procedeu-se a incubação das amostras por 30 min, no escuro, 37 °C. Em seguida as células foram lavadas com PBS 37 °C. A leitura foi feita em citômetro de fluxo BD FACS Calibur (EUA) no detector FL-2.

4.3.3 Análise dos efeitos no ciclo celular

A quantidade de DNA nas células é frequentemente o único parâmetro medido para estudos de ciclo celular por citometria de fluxo. As análises são feitas com moléculas fluorescentes que se ligam especificamente e estequiometricamente ao DNA, para obter uma relação entre a intensidade de fluorescência celular e a quantidade de DNA. Alguns corantes possuem uma maneira intercalativa de se ligar ao DNA, tais como, iodeto de propídeo e brometo de etídeo, e outros apresentam afinidade por regiões ricas em A-T do DNA como os corantes Hoechst e DAPI (JAYAT; RATINAUD, 1993).

Procedimento experimental

As células K562 foram incubadas (5×10^5 células/poço) em placas de 24 poços com o aduto A2CN (15, 30 e 60 μM) por 24 horas. Como controle positivo foi usado o Etoposídeo (5 μM). Após o tratamento as células foram coletadas por centrifugação 200 x g/5min e ressuspensas em uma solução hipotônica contendo, 1% de citrato de sódio, 0,1% de triton X-100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de IP (Sigma Aldrich, EUA). Procedeu-se a incubação das amostras por 30 min, sob-refrigeração, e protegidas da luz. Em seguida as amostras eram analisadas no citômetro de fluxo BD FACS Calibur (EUA) em FL2-H, sendo coletados 10.000 eventos para as análises. Os resultados foram expressos em porcentagem de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular: G0/G1, S, G2/M e células sub-diploides (Sub-G1).

4.3.4 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Uma sonda amplamente utilizada para identificar a produção de ROS é a H₂-DCFH-DA (2',7'-diacetato dediclorodihidrofluoresceína) (Sigma Aldrich CO). Esta é uma molécula não fluorescente, permeável e muito sensível às mudanças no ambiente redox intracelular. Quando entra na célula é clivada por esterases citoplasmáticas em H₂-DCF (2',7'-diclorodihidrofluoresceína), a qual é oxidada por peroxidases, resultando numa molécula fluorescente, DCF (diclorofluoresceína) (COSSARIZZA *et al.*, 2009). Esta reação de oxidação ocorre principalmente na presença de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), mas também por espécies oxidantes como os radicais hidroxil (OH⁻) e nitrito (NO₂[•]). Sendo assim, quanto maior o estresse oxidativo, maior a intensidade de fluorescência, que será detectada por citometria de fluxo.

Procedimento experimental:

As células K562 foram incubadas em placas de 24 poços na concentração de 5×10^5 células/poço e tratadas com o aduto A2CN nas concentrações de 15, 30 e 60 µM por 24 horas. Como controle positivo deste ensaio foi utilizado H₂O₂ (100 µM), por 15 min e o etoposideo 5 µM. Como controle negativo foi utilizado 0,5 % de DMSO. Após as 24 horas de tratamento as células foram coletadas por centrifugação 200 x g/5min, lavadas com PBS a 37 °C e marcadas com 10 µM de H₂-DCFH-DA. Incubaram-se as amostras por 30 min, no escuro, a 37 °C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS a 37 °C e foi realizada a leitura no citômetro de fluxo em FL1-H, que detecta a fluorescência verde.

4.3.5 Avaliação da expressão de genes envolvidos no ciclo celular e na apoptose

4.3.5.1 Extração de RNA total

Células K562 foram cultivadas em placas de 6 poços (1×10^6 células/ml) e incubadas com A2CN ($60 \mu\text{M}$) por 24 h, o controle negativo foi as células cultivadas com meio RPMI. A extração de RNA de células tratadas e não-tratadas foram feitas usando 1,0 mL de Trizol (Invitrogen, EUA) para cada 1×10^6 células de amostra ou usando o kit RNeasy mini (QIAGEN, Alemanha) de acordo com recomendações do fabricante. Para extração de RNA com Trizol as amostras foram centrifugadas a $300 \times g$ por 4 min, o sobrenadante descartado e o precipitado de células foi homogeneizado rapidamente com 1,0 mL de trizol para reduzir a degradação do RNA. Em seguida, adicionou-se 200 μL de clorofórmio para cada amostra e agitou-se vigorosamente por 15 seg, seguidos de incubação a 3 min a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a $12.000 \times g$ por 15 min a 4°C . A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o RNA total precipitado com 0,5 mL de isopropanol. As amostras foram misturadas gentilmente e centrifugadas a $12.000 \times g$ por 15 min a 4°C . O precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75 % seguidos de centrifugação ($7.500 \times g$ por 3 min). O precipitado foi seco à temperatura ambiente. O RNA total foi ressuscitado em 30 μL de água livre de RNase e armazenados a -80°C . A quantidade de RNA presente nas amostras foi quantificada por espectrofotômetro, Nanodrop (EUA), em absorbância de 260 nm, sendo submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com um kit específico (Ez-vision, Amresco, EUA) para a avaliação da integridade do RNA.

4.3.5.2 Obtenção do DNA complementar (cDNA)

A obtenção do cDNA, a partir do RNA total das amostras de células K562 foi realizada utilizando-se o protocolo do kit, SuperScript III First-Strand conforme descrito pelo fabricante (Invitrogen, EUA). Antes da síntese do cDNA, o RNA foi tratado com DNase (RQ1 RNase free DNase – Promega, EUA). Desta maneira, 3 μg de RNA total foram adicionados a mistura contendo 1 μL de dNTP (deoxinucleotídeos) e 1 μL de “primer” de oligonucleotídeo, essas amostras foram misturadas e incubadas a 65°C por 5 min e colocadas no gelo por 1 min. Em seguida foram misturadas com outra mistura 2 vezes concentrada contendo: 2 μL de tampão Rt, 4 μL de MgCl_2 , 2 μL de DTT e 1 μL de RNaseOUT. As misturas foram

combinadas em um único tubo e incubadas a 42 °C por 2 min. Em seguida adicionou-se 1 µL de transcriptase reversa (SuperScript™ II, EUA), sendo incubada a 42 °C por 50 min, e 70 °C por 15 min. As amostras foram resfriadas no gelo e foi adicionado 1 µL de RNase H e incubado a 37 °C por 20 min. O cDNA obtido foi estocado a -20 °C ou usado imediatamente para reação de PCR Reação em cadeia da polimerase em tempo real.

4.3.5.3 Expressão gênica pelo método de quantificação relativa por q-PCR em tempo real

O cDNA das amostras de células tumorais K562 tratadas e não-tratadas com A2CN (60µM) por 24 h, foi amplificado pelo termociclador Bio-Rad Real-Time PCR CFX96 Touch (BIO-RAD, EUA). O protocolo utilizado foi o Maxima® SYBR® Green/Fluorescein qPCR master Mix (2x), conforme descrito pelo fabricante (Fermentas, EUA). Desta forma, 12,5 µL desse reagente foi misturado com: 1 µL de cDNA de cada amostra em estudo, 10 µM de cada primer específico para cada gene (**Tabela 1**) foram adicionados, sendo o volume completado para um total de 25 µL com água livre de RNase. Os níveis de expressão dos genes estudados foram normalizados em relação ao RNAm do gene endógeno (gliceraldeído-3-fosfato-dehidrogenase, GAPDH).

A reação para cada gene analisado foi cuidadosamente padronizada a fim de evitar amplificação inespecífica. Como controle negativo foram usados amostras com ausência de cDNA, em cada um dos ensaios de qPCR.

A detecção dos produtos foi feita pelo monitoramento do sinal fluorescente emitido pelo corante SYBR Green, que intercala a dupla fita do cDNA, obtido no final de cada ciclo. Os valores quantitativos foram obtidos a partir do ciclo limiar ou cycle threshold (Ct), onde o aumento do sinal é associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR que começam a serem detectados e analisados, usando o programa CFX manager optical system software (EUA). Os níveis de expressão dos genes foram normalizados em relação ao RNAm do gene endógeno (gliceraldeído-3-fosfato-dehidrogenase, GAPDH). O método utilizado neste ensaio foi o método de

quantificação relativa ou $2^{-\Delta Ct}$. Também foi inicialmente determinado à eficiência de amplificação dos genes alvos e do controle endógeno.

Assim, foram realizadas duas curvas com diluições seriadas do cDNA nas concentrações 400, 40, 4 e 0,4 ng e amplificados para cada um dos genes estudados. Cada uma das diluições foi posteriormente amplificada por qPCR nas mesmas condições. As amostras foram amplificadas em duplicata. Tomou-se o cuidado de verificar a especificidade da reação de qPCR realizando a curva de dissociação. Para comparar a eficiência de amplificação dos genes em estudo, os valores de Ct do gene alvo foram subtraídos dos valores de Ct do gene GAPDH. Também se calculou o ΔCt de cada amostra, subtraindo-se os valores de Ct do gene alvo, dos valores de Ct do gene controle (GAPDH). O resultado da diferença foi analisado associando com o logaritmo da quantidade da amostra inicialmente colocada. Quando a inclinação da reta obtida era menor que 0,1, indicava que a eficiência de amplificação era comparável, podendo-se, portanto, aplicar o método relativo, $2^{-\Delta Ct}$.

Todos os primers foram desenhados usando a ferramenta do NCBI (Nucleotide search), pela busca do gene de interesse, escolha da sequência do organismo, neste caso humano ou camundongo, escolha do NM (sequência transcrita), obtenção da sequência no formato FASTA e em seguida obtendo-se os primers. Os primers foram escolhidos após análise da especificidade, usando a ferramenta de alinhamento de sequências do programa BLAST. O conteúdo Citosina/Guanina não foi superior a 55 % e a $T_m \pm 60$ °C para todos os primers testados.

Tabela 2: Sequências dos primers utilizados para amplificação dos genes.

Gene	Sequencia dos primers	Tamanho do fragmento	Região amplificada	NM
p53*	F: 5'-ACACGCTTCCCTGGATTGG-3' R: 5'-CTGGCATTCTGGGAGCTTCA-3'	249 pb	156-404	NM_000546.5
p21*	F: 5'-AGTCAGTTCCTTGTGGAGCC-3' R: 5'-CATTAGCGCATCACAGCGC-3'	184 pb	91-274	NM_001220778.1
p27*	F: 5'-TGGAGAAGCACTGCAGAGAC-3' R: 5'-GCGTGTCTCAGAGTTAGCC-3'	252 pb	606-857	NM_004064.3
Ciclina D1*	F: 5'-CACACGGACTACAGGGGAGT-3' R: 5'-GGAAGCGGTCCAGGTAGTTC-3'	474 pb	1-474	NM_053056.2
Ciclina E*	F: 5'-ATACTTGCTGCTGCTTCGGCCTT-3' R: 5'-CATGGCTTTCTTGCTCGGG-3'	241 pb	1080-1320	NM_001238.2
Kv1.3*	F: 5'-GCCAGACCCAGACAGAGCAT-3' R: 5'-GCCCCGAGATGTTGATGACC-3'	471 pb	91-561	NM_002232.3
Kv3.1*	F: 5'-CCAGACGTACCGCTCGAC-3' R: 5'-CGAACAGCGCCCAGATGC-3'	485 pb	112-596	NM_001112741.1
IL-6**	F: 5'-GGGACTGATGCTGGTGACAA-3' R: 5'-TAACGCACTAGGTTTGCCGA-3'	599 pb	76-674	NM_031168.1
IL-1 β **	F: 5'-AACCTTTGACCTGGGCTGTC-3' R: 5'-AATGGGAACGTCACACACCA-3'	253 pb	176-428	NM_008361.3
Cox-2**	F: 5'-CGTAGCAGATGACTGCCCAA-3' R: 5'-TCTCAGGGATGTGAGGAGGG-3'	383 pb	520-902	NM_011198.3
Gapdh-h*	F: 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3' R: 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'	249 pb	491-748	NM_001289746.1
Gapdh-c**	F: 5'-GACCACAGTCCATGCCATCA-3' R: 5'-TAGGGCCTCTCTTGCTCAGT-3'	535 pb	569-1103	NM_0080084.2

* sequencia humana; ** sequencia de camundongo

4.3.6 Patch-clamp

Os registros de "patch-clamp" foram realizados no modo "whole-cell voltage clamp" (HAMILL et al, 1981). Os registros eletrofisiológicos foram obtidos sob a platina de um microscópio invertido (Carl Zeiss, Alemanha), posicionado sobre uma mesa antivibratória com suspensão pneumática (TMC, EUA). Um micromanipulador hidráulico de alta precisão (Narishige, Japão) foi usado para movimentação do eletrodo responsável pelo registro das correntes, e outro micromanipulador foi

utilizado para posicionar a pipeta de perfusão, contendo a solução controle ou o composto testado.

As correntes foram obtidas por meio de um amplificador (HEKA 10, Alemanha), filtradas por filtro passa-baixa a 2,0 kHz, convertidas em sinais digitais numa frequência de 10 kHz. Correntes de vazamento (“leakage”) foram removidas, com auxílio do protocolo P/4, no qual quatro pulsos de amplitude igual a $\frac{1}{4}$ do pulso teste foram aplicados e a resposta de corrente, foi então, somada e subtraída da corrente do pulso teste. As células que apresentaram valores altos para a resistência em série (acima de 5 M Ω) ou que não se mantiveram estáveis, não foram utilizadas na análise. As correntes foram adquiridas e analisadas em um computador PC-compatível usando-se o “software” PatchMaster e Fitmaster (HEKA Elektronik, Alemanha).

As micropipetas de vidro foram fabricadas por meio de um estirador (“puller”) vertical de 2 estágios (Narishige, Japão). As mesmas foram preenchidas com solução contendo, em (mM) 140 KCl, 1 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES e 5 Glicose, pH 7,2 ajustado com KOH. Foram utilizadas resistências entre 2.5-5 M Ω para as micropipetas. Um fino fio de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) foi introduzido na micropipeta e o conjunto foi acoplado a um pré-amplificador (“headstage”) que, por sua vez, estava conectado à entrada do amplificador. As células foram banhadas por uma solução externa, contendo em (mM) 140 NaCl, 5,4 KCl, 1,2 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES e 10 Glicose, ajustada para pH 7,4 com NaOH. Todas as soluções foram submetidas a um filtro com porosidade (“mesh”) de 0,22 μ m. A osmolaridade das soluções foi ajustada com glicose, para valores de aproximadamente 310 mOsm, solução da micropipeta e 330 mOsm solução do banho.

Os gigaselo (resistência $\geq$ 1G Ω) foram obtidos por meio de uma suave sucção feita no interior da micropipeta, e em seguida por meio de uma sucção mais vigorosa, rompia-se o fragmento de membrana confinado na micropipeta e então as células encontravam-se na configuração “whole-cell”. Assim, a solução interna, contida na pipeta, dialisava o citoplasma da célula em estudo. O aumento brusco do transiente capacitivo indicava a obtenção da configuração de “whole-cell”. Todos os registros foram realizados em células K562 submetidas a um sistema de perfusão (Dagan, EUA), que consistiu de uma pipeta de vidro com aproximadamente 100 μ m

de diâmetro interno que estava conectada à saída de uma válvula solenóide, alimentada por reservatórios de 5 mL, um deles contendo solução fisiológica sem adição do composto teste e no outro compartimento, era adicionado o A2CN (120 μ M) a solução externa. Com auxílio da válvula solenóide era possível selecionar os compartimentos que estavam ligados à pipeta de perfusão, estabelecendo assim, um fluxo do seu conteúdo. Os fluxos ($\sim 0,1$ mL/min) foram impulsionados pela força da gravidade.

4.3.6.1 Preparo das células para os experimentos de patch clamp

Primeiramente, as lamínulas estéreis (24 x 24 mm) foram tratadas com poli-D-lisina (120 μ M) e após 30 min na presença dessa solução, as mesmas foram lavadas com PBS e secas em capela de fluxo laminar. Em seguida uma alíquota de 500 μ L das células K562 em suspensão foi adicionada as lamínulas tratadas que estavam em plaquinhas de cultura, sendo levadas para estufa de CO₂ para melhor adesão das células. Após 5h de adesão os experimentos eletrofisiológicos foram conduzidos conforme a descrição acima.

4.3.7 análise estatística

Para realização das análises estatísticas dos ensaios eletrofisiológicos, os registros das correntes de K⁺ foram normalizados em pA/pF, sendo extraída a média $\pm$ e.p.m., de um número significativo de células. As diferenças estatisticamente diferentes foram avaliadas usando o teste t de student.

Nos ensaios de viabilidade celular os dados foram expressos como percentagem da viabilidade celular *versus* concentração do composto. Foi determinada a CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo), a partir de uma curva de regressão não-linear, utilizando o programa GraphPad Prism, versão 5.01. Os dados foram comparados por análise de variância de uma via ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni, sendo considerado significativo quando $p < 0,05$.

Para os ensaios de expressão gênica foi realizada a análise da expressão relativa dos genes expressos nas células tratadas com A2CN e não tratadas de três ensaios independentes em duplicata. As diferenças estatisticamente foram avaliadas usando o teste t de student.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

4.4.1 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO)

A produção de óxido nítrico foi determinada pela análise do sobrenadante em cultura para NO_2^- , um produto mais estável que o NO. Foi utilizada a linhagem de macrófagos murino RAW 264.7, mantidas em laboratório nas mesmas condições de cultivo citada no tópico 3.2.2. As células foram cultivadas em placas de 96 poços por 1 h e em seguida incubadas com os adutos A2CN, A3CN ou A4CN (2,5, 5, 10 e 20 μM) na presença ou ausência de LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) a 37 °C por 24 h (YANG et al., 2013). Após o tratamento, as placas foram centrifugadas (200 x g por 5 min) e 50 μL do sobrenadante foram removidos e misturados a 50 μL do reagente de Griess (1% de sulfanilamida; 0,1% N-[naftil]-etilenodiaminadihidrocloro e 5% de ácido fosfórico) a temperatura ambiente por 15 min. A absorbância da mistura foi medida a 540 nm em leitora de microplaca (Biotek, EUA). A concentração de nitrito foi calculada e comparada com uma curva padrão de nitrito.

4.4.2 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por citometria de fluxo

As células RAW 264.7 foram cultivadas na concentração de 1×10^6 células/poço em placas de 24 poços por 1 h e em seguida incubadas com A2CN, A3CN e A4CN (2,5, 5, 10 e 20 μM) na presença de LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) a 37 °C por 24 h. Como controle positivo deste ensaio foi utilizado H_2O_2 (100 μM), por 30 min. Após 24 horas de tratamento, as células foram coletadas por centrifugação (200 x g por 5

min), lavadas com PBS a 37 °C e marcadas com 10 µM de H₂-DCFH-DA (Sigma Aldrich CO). As amostras foram incubadas por 30 min, no escuro, a 37 °C. Em seguida as células foram lavadas com PBS aquecido (37 °C) e foi realizada a leitura no citômetro de fluxo em FL1-H (525 nm).

4.4.3 Expressão dos genes, IL-1, IL-6 e COX-2 por PCR em tempo real

As células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 6 poços por 1 h e posteriormente incubadas com os adutos A2CN, A3CN e A4CN, nas concentrações de 10 µM na presença de LPS (1µg/mL) a 37 °C por 24 h. Em seguida as células foram removidas do poço com o auxílio de “scrapers” e centrifugadas (200 x *g*, 5 min). O concentrado de células foi ressuspensão em 1 mL de trizol para extração do RNA. A Avaliação da expressão de genes para IL-1, IL-6 e COX-2 foi realizada conforme o protocolo descrito anteriormente no tópico 4.3.6. Os primers utilizados estão representados na tabela 1.

4.4.4. Produção de citocinas pela técnica de ELISA

As células foram cultivadas em placas de 24 poços por 1 h e posteriormente incubadas com os adutos A2CN, A3CN e A4CN, nas concentrações de 2,5, 5, 10 e 20 µM na presença de LPS (1µg/mL) a 37 °C por 24 h. Após o tratamento as células foram centrifugadas (200 x *g*, 5 min) e o sobrenadante das células RAW 264.7 foi coletado e estocado a -80°C até o momento das análises por ELISA sanduíche. A produção das citocinas IL-1β, IL-6, TNF-α foi medida com kits comerciais (eBioscience, Inc.), seguindo o protocolo do fabricante. Curvas-padrão com concentrações conhecidas de IL-1β (11,72 – 250 pg/mL), IL-6 e TNF-α (5,00 – 6000 pg/mL) também tiveram suas densidades ópticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos com o auxílio da equação da reta. As leituras das citocinas IL-1, IL-6 e TNF-α e suas respectivas curvas-padrão foram

realizadas em leitora de microplacas de ELISA (BIOTEK, ELx800, EUA) em 450 nm. Os valores foram expressos em pg/mL

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram obtidos de três ensaios em duplicata ou triplicata para cada concentração e expressos como média $\pm$ desvio padrão, em seguida comparados por análise de variância de uma via (ANOVA), seguidos do pós-teste de Newman Keuls, sendo considerada alguma diferença significativa quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA 50% (CI₅₀) DOS AMBH

O potencial citotóxico dos AMBH: A2CN, A3CN e A4CN, foram avaliados em várias linhagens celulares tumorais e normais, HL-60, MOLT-4, K562, K562-lucena, MCF-7, HT-29, L929, FN1 e B16F10, bem como em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC). Os AMBH foram potencialmente citotóxicos para todas as linhagens testadas após 24 h de tratamento, com menor atividade na linhagem de adenocarcinoma de mama, MCF7, cuja menor CI₅₀ foi de 131,5 µM. As células de leucemia mielóide humana aguda, HL-60 e MOLT-4, foram as células mais sensíveis ao tratamento com CI₅₀ de aproximadamente 20 µM. O Tratamento das células por 72 horas mostrou um aumento da citotoxicidade dos adutos nas linhagens de leucemia mielóide crônica, K562 e K562-Lucena, mas não houve alteração na CI₅₀ das linhagens de leucemia aguda, HL-60 e MOLT-4 (dados não mostrados), pois nestas células possivelmente a droga atingiu seu efeito máximo. A substância A2CN demonstrou ser mais potente nas linhagens K562 e K562-Lucena, bem como nas linhagens de tumores sólidos HT-29, MCF-7. Dessa forma, o composto A2CN foi escolhido para estudar o mecanismo de morte celular.

Tabela 3. Efeito dos isômeros A2CN, A3CN e A4CN no crescimento das linhagens celulares por 24 horas. Resultados são reportados como valores de CI_{50} (concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular) em μM .

<i>Linhagem celular</i>	A2CN	A3CN	A4CN
<i>K562 (leucemia mielóide crônica)</i>	58.4	73.4	95.5
<i>K562-lucena (leucemia mielóide crônica expressando altos níveis de PgP)</i>	60.7	75.09	122.3
<i>HL-60 (leucemia mielóide aguda)</i>	22.39	17.28	24.28
<i>Molt-4 (leukemia linfoblástica aguda)</i>	21.4	22.1	32.1
<i>MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano)</i>	131.5	182.1	225.4
<i>HT-29 (adenocarcinoma colorectal humano)</i>	53.8	134	242
<i>B16F10 (melanoma de pele murino)</i>	50	<i>NR</i>	<i>NR</i>
<i>FN1 (fibroblastos normais humano)</i>	126	<i>NR</i>	<i>NR</i>
<i>L929 (fibrosarcoma murino)</i>	50.7	49.2	76.2
<i>PBMC (células mononucleares do sangue periférico)</i>	71.9	83.7	124

Dados foram obtidos de três experimentos independentes, realizados em triplicata. A análise foi realizada como descrito na seção de análise estatística. *NR* = não realizado.

5.2 AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE MORTE DO ADUTO A2CN NAS CÉLULAS K562

A linhagem de células K562 foi escolhida como modelo para estudo do mecanismo de morte celular, pois a mesma apresentou igual sensibilidade após 72 h de tratamento, comparando a linhagem HL-60. Além disso, a linhagem K562 representa um tipo celular resistente a vários quimioterápicos, bem como apresenta pior prognóstico clínico.

5.2.1 Efeito de A2CN na viabilidade celular por citometria de fluxo

Após avaliar a viabilidade celular pelo método de redução do MTT, foi analisado se o composto A2CN alteraria a viabilidade celular, a partir do dano à membrana plasmática. Assim, as células K562 foram tratadas com 15, 30 e 60 μM ou com 5 μM de etoposídeo por 24 h.

O aduto A2CN não demonstrou alterações na viabilidade celular das células K562 nas concentrações testadas. Esse resultado demonstra que o composto A2CN não causa danos na membrana plasmática, que caracterizariam um fenômeno de necrose. Semelhantemente, nenhuma alteração foi observada nas células tratadas com etoposídeo 5 μM (figura 10).

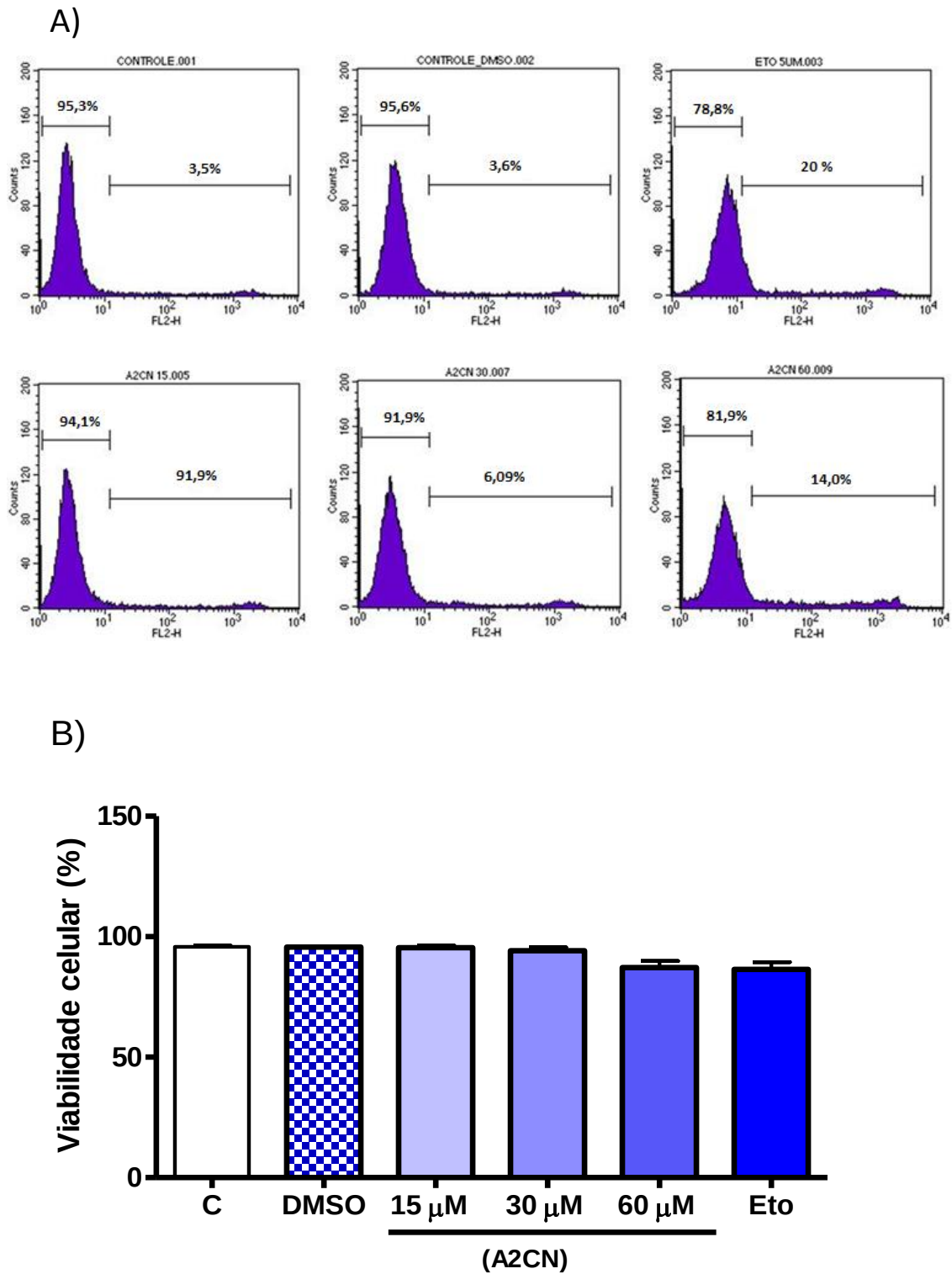


Figura 10: Efeito de A2CN na viabilidade de células K562 tratadas com A2CN (15, 30 e 60 μ M) por 24 horas. As células foram tratadas e em seguida coradas com IP (50 μ g/ml) e analisadas por citometria de fluxo em FL2-H. (A) Histogramas representativos das análises. (B) Gráfico de análise da viabilidade celular. C=Controle, DMSO= controle com solvente, Eto= Etoposídeo 5 μ M (**controle positivo**-droga antitumoral padrão). Dados são expressos como média $\pm$ e.p.m. de três experimentos independentes. Analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls.

5.2.2 Determinação da variação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Para verificar se há o envolvimento da via mitocondrial na ação do A2CN, as variações no $\Delta\psi_m$ foram avaliadas por citometria de fluxo, utilizando o fluorocromo TMRM. As células foram tratadas com A2CN (15, 30 ou 60 μM) ou com 10 μM de etoposídeo por 24 h.

O aduto A2CN promoveu um aumento da despolarização da membrana mitocondrial (figura 11). Na concentração de 15 μM não houve alterações no percentual de células despolarizadas. Contudo, o percentual de células despolarizadas aumentou de $7,2 \% \pm 3,2$ no controle, para 20,4 % e 20,3 % nas concentrações de 30 e 60 μM , respectivamente. O etoposídeo também aumentou o $\Delta\psi_m$ para 20,3 %. O CCCP (controle positivo) promoveu despolarização em 16 % das células.

Os resultados mostram a dissipação do potencial transmembrânico mitocondrial pelo A2CN, sugerindo que a via de morte celular possa ser a apoptose.

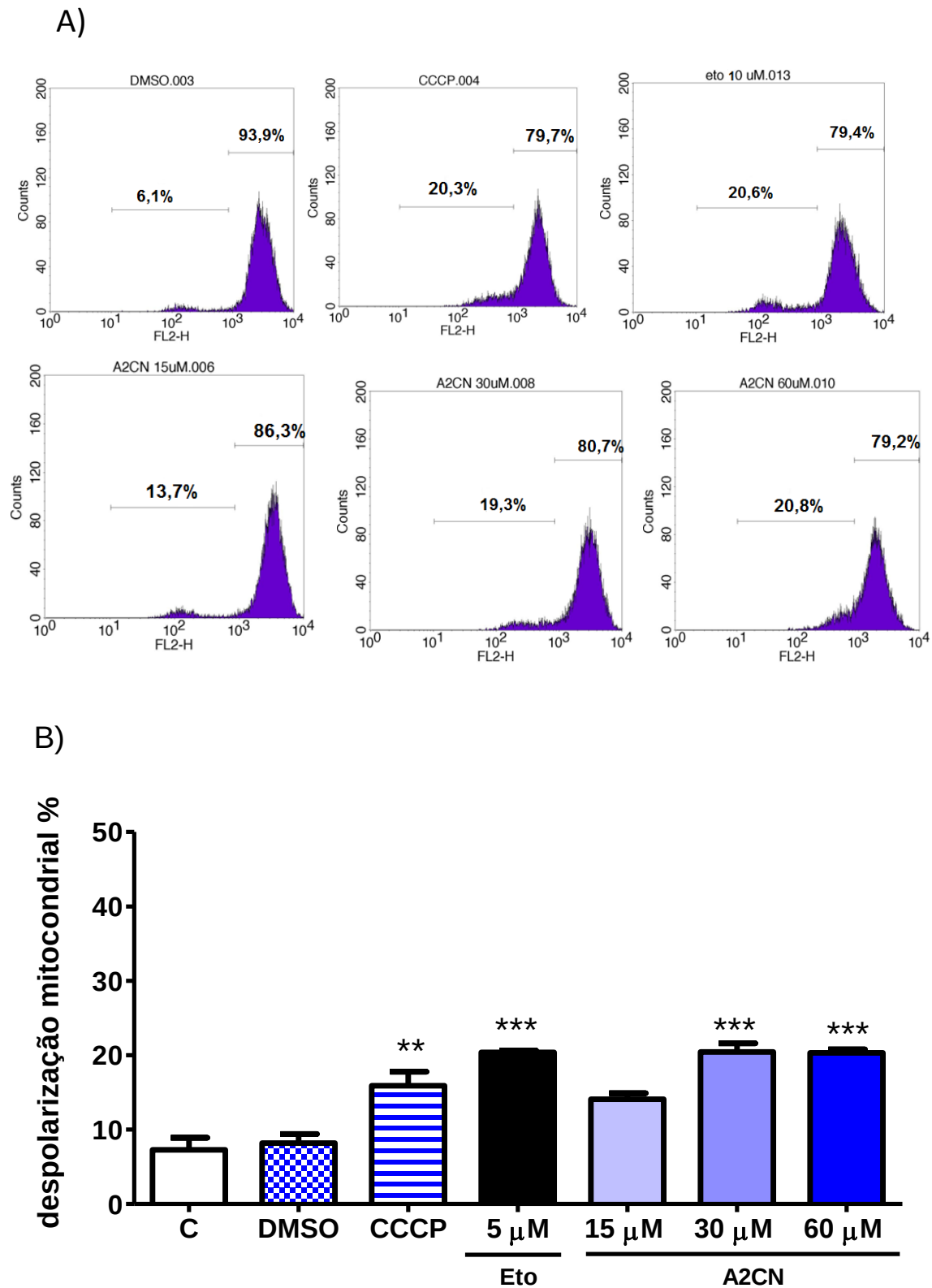


Figura 11: Alteração do potencial transmembrânico mitocondrial (ψ_m) em células K562. As células foram tratadas com A2CN (15, 30 e 60 μ M) por 24 h. Estas células foram marcadas com TMRT e a porcentagem de células despolarizadas foi quantificada por citometria de fluxo no filtro FL2-H. (A) Histogramas representativos das análises. (B) Gráfico do potencial transmembrânico mitocondrial. C=Controle negativo (somente meio RPMI), DMSO= controle negativo + solvente, CCCP= controle positivo de despolarização mitocondrial (100 μ M), Eto= Etoposídeo 5 μ M (**controle positivo**-droga antitumoral padrão). Dados são expressos como média $\pm$ SEM de três experimentos independentes em duplicata. **p < 0.01; ***p<0.001 comparado com o controle por ANOVA, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

5.2.3 Efeitos no ciclo celular

Para avaliar se a indução da morte celular está associada com mudanças no perfil de distribuição das células em alguma das fases do ciclo celular, foi utilizado o corante iodeto de propídeo como marcador das fases de multiplicação celular.

No tempo de 24 h, A2CN promoveu parada no ciclo celular em todas as concentrações testadas (figura 12). Na fase G_0 - G_1 , o percentual de células passou de 48 % no controle, para 51,7 % e 55,9 % ($p < 0,01$), nas concentrações de 15 e 30 μ M, respectivamente. Foi possível observar um aumento significativo também na fase S do ciclo celular, havendo um aumento de 27,5 % no controle, para 37,4 % na concentração de 60 μ M de A2CN. O etoposídeo (5 μ M) promoveu um acúmulo de células na fase S, com um percentual de 39,8 %.

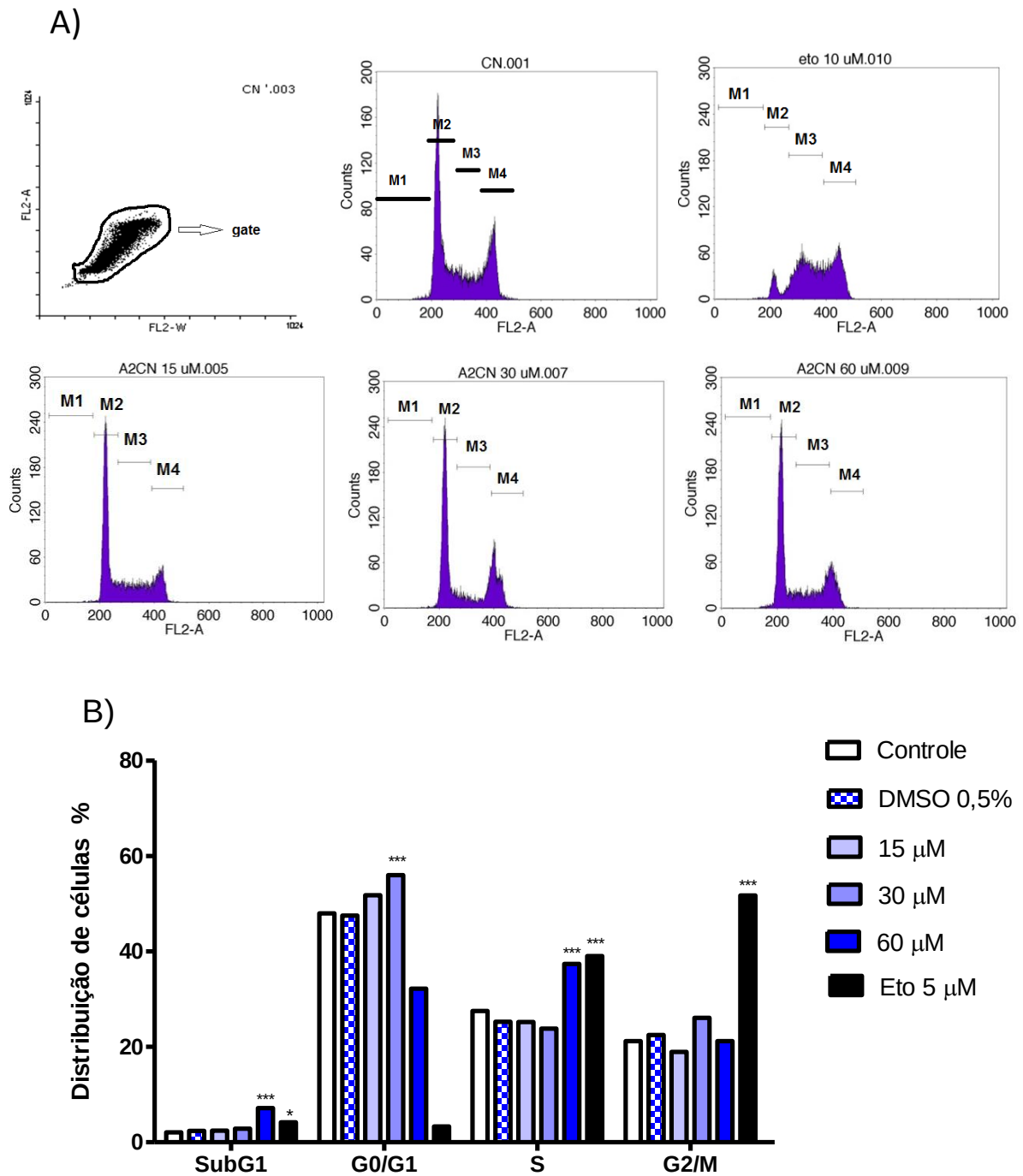


Figura 12: Efeitos no ciclo celular da linhagem K562 após 24 h de incubação com A2CN (15, 30 e 60 μ M) ou com Etoposídeo (5 μ M). (A) Histogramas representativos de 1 experimento. M1= fase sub-G1, M2= fase G1, M3= fase G3, M4= fase G2. (B) Gráfico da análise dos dados. C=Controle negativo (somente meio RPMI), DMSO= controle negativo + solvente, Eto= Etoposídeo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ comparado com o controle por ANOVA, seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls.**

5.2.4 Avaliação da participação das espécies reativas de oxigênio (ROS)

Tendo em vista que o estresse oxidativo pode participar do processo de morte celular por apoptose, foi avaliado se A2CN promoveria a geração de ROS. Assim, utilizando-se a sonda H₂-DCFH-DA, foi realizada a dosagem por citometria de fluxo. As células K562 foram tratadas com 15, 30 e 60 µM ou com etoposídeo (5 µM) por 24 h.

O composto A2CN elevou a produção de ROS apenas na concentração de 60 µM (figura 13). Após 24 h o percentual de células liberando ROS aumentou significativamente de 0,5 % para 12,5 %, na concentração de 60 µM ($p < 0,001$). O etoposídeo e o peróxido de hidrogênio não promoveram mudanças significativas nos níveis de ROS.

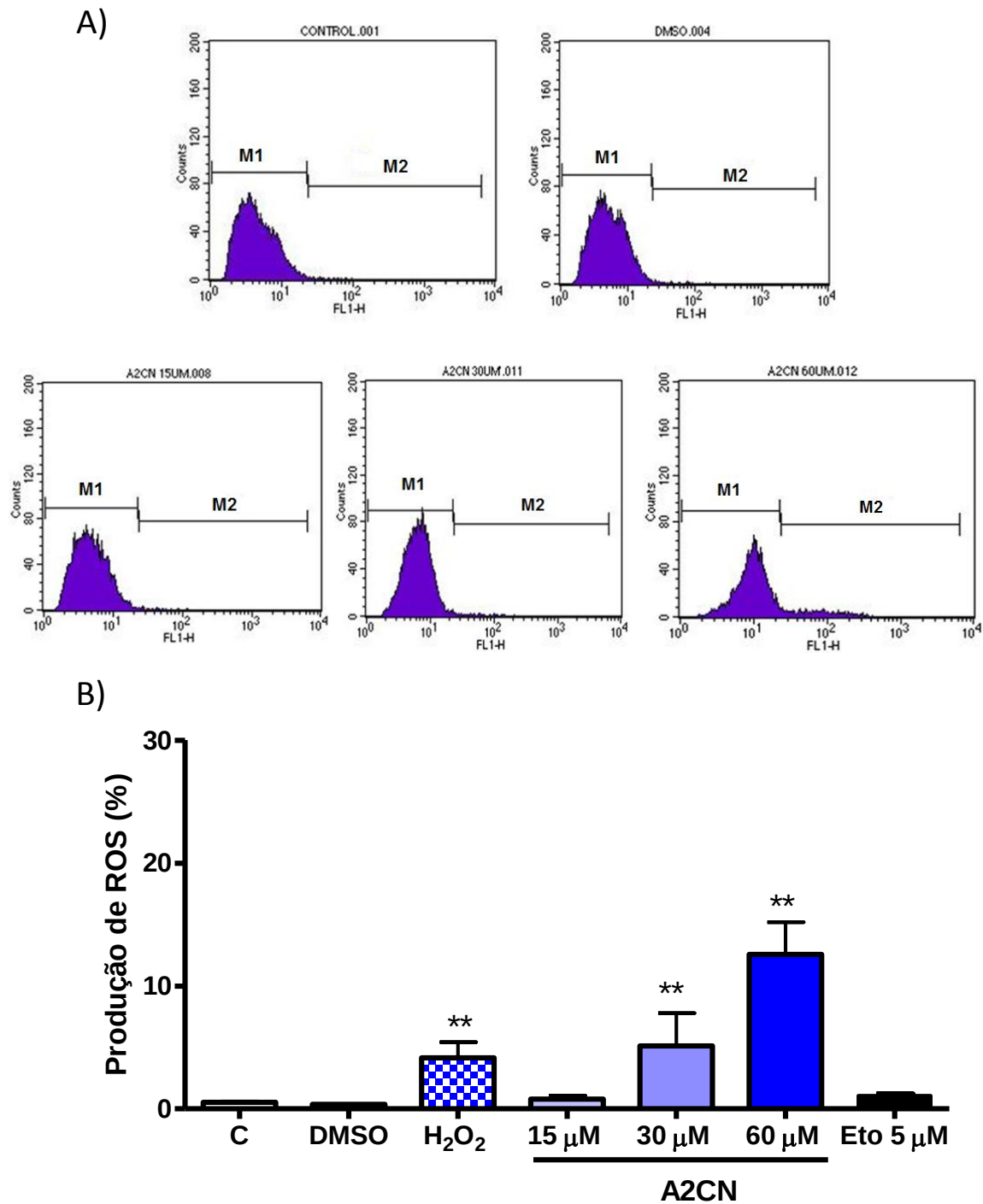


Figura 13: Análise da geração de ROS na linhagem K562 após 24 h de incubação com A2CN (15, 30 e 60 μ M) ou com etoposídeo (5 μ M). (A) Histogramas representativos de 1 experimento. M1= células com baixa produção de ROS; M2= células alta produção de ROS. (B) Gráfico da análise dos dados. C= controle negativo, DMSO= células com a concentração máxima de DMSO testada, H₂O₂= células tratadas com 100 μ M de peróxido de hidrogênio *** $p < 0,001$, comparado ao controle por ANOVA, seguida pelo pós-teste Newman-Keuls.

5.2.5 Análise da expressão gênica em tempo real (qPCR) em células k562

5.2.5.1 Expressão de genes envolvidos no ciclo celular

Com o objetivo de confirmar se o mecanismo molecular referente à capacidade antiproliferativa de A2CN envolve a participação dos genes envolvidos no ciclo celular e apoptose, procedeu-se a análise da expressão dos genes referentes à p21, p27, p53, ciclina E e ciclina D1.

O RNA total das células tumorais K562, foi extraído e após a obtenção do cDNA, os genes de interesse foram amplificados e quantificados por PCR em tempo real. Os resultados das reações da PCR em tempo real para cada gene foram normalizados, considerando-se a expressão relativa do gene constitutivo GAPDH ou beta-actina, com do gene de interesse. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes. Em seguida as reações da amplificação destes genes foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose dos produtos resultantes das reações de PCR.

As células K562 tratadas com A2CN (60 μ M) por 24 h mostraram um aumento significativo na expressão dos genes p21, p27 e p53, comparado com o controle não tratado (figura 14). Esse aumento foi de $4,1 \pm 1,8$ vezes para o gene p21, $1,9 \pm 0,5$ vezes para o gene p27 e $7,4 \pm 3,7$ vezes para o gene p53.

Com o mesmo tratamento anterior e igual tempo de incubação, analisando os genes das ciclinas E e D1, foi possível observar uma redução significativa para o gene da ciclina D1 (figura 15).

Após a PCR, as amostras foram corridas em eletroforese para análise dos fragmentos e foi possível observar que o produto dos genes foi o esperado para os primers utilizados em todos os genes (figura 16), bem como, a análise feita pela curva de “melting” mostrou apenas um pico específico para cada gene.

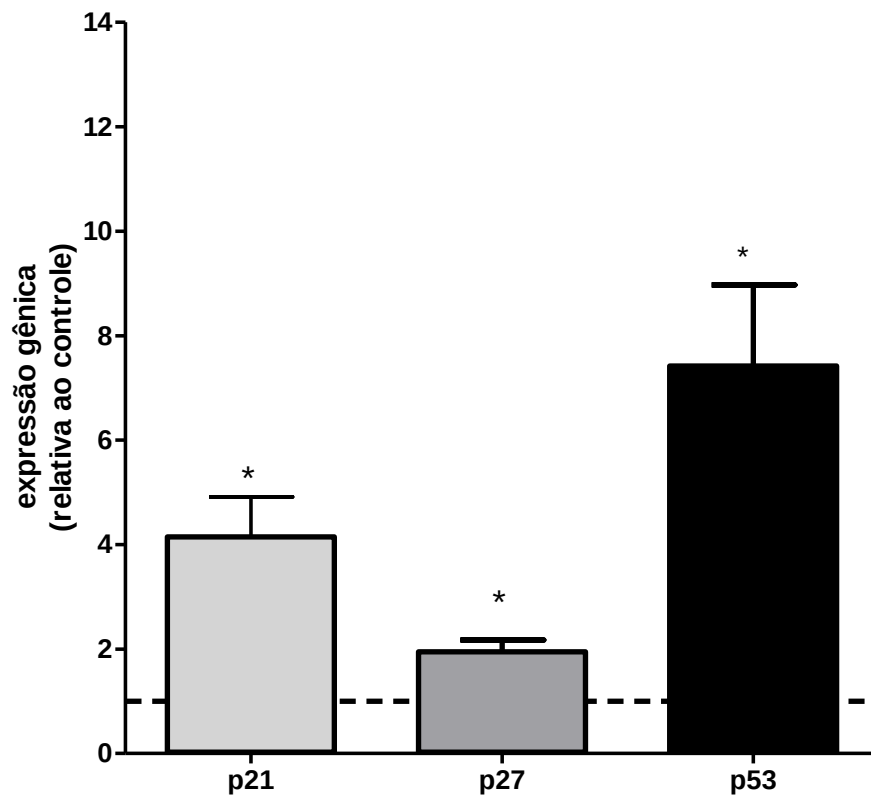


Figura 14: Expressão relativa dos genes p21, p27 e p53 nas células K562 tratadas com A2CN (60 µM) por 24 h em comparação ao grupo controle não tratado. Os dados foram analisados pelo teste t de Student. * $p < 0,05$.

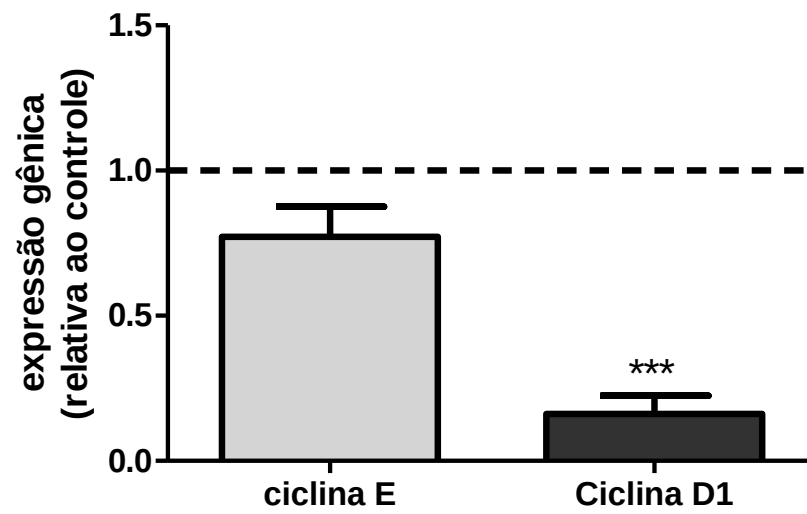


Figura 15: Expressão relativa dos genes para ciclinas E e D1 nas células K562 tratadas com A2CN (60 µM) por 24 h em comparação ao grupo controle não tratado. Os dados foram analisados pelo teste t de Student. *** $p < 0,001$.

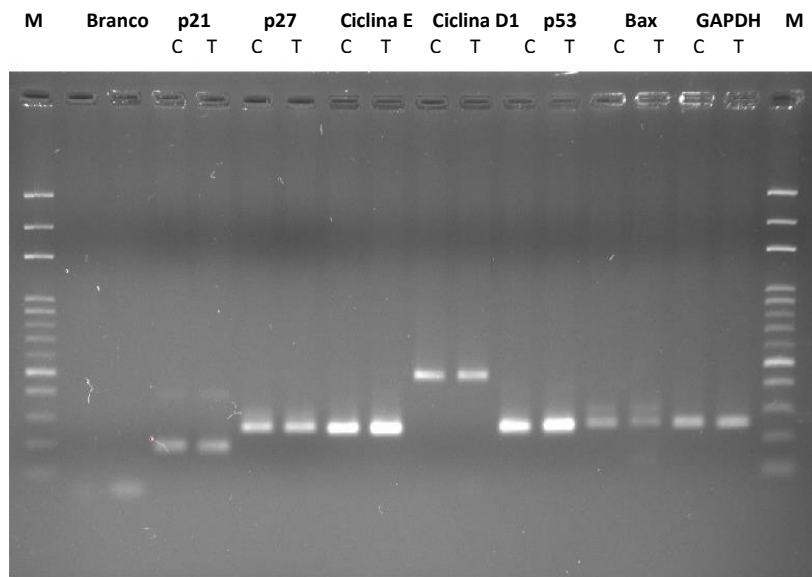


Figura 16: Análise dos produtos da PCR em tempo real por eletroforese em gel de agarose 1,5 % para avaliação do tamanho dos fragmentos. As amostras foram coradas com o Ez-vision e corridas a 100 V por 1,5 h. M= marcador para DNA (100 pb); C= controle; T=células tratadas com A2CN 60 μ M.

5.2.6.2 Expressão de genes de canais iônicos

Com o objetivo de confirmar se o mecanismo molecular referente à capacidade antiproliferativa de A2CN envolve além da participação dos genes envolvidos no ciclo celular, também está relacionado com os genes para canais de potássio dependentes de voltagem (Kv1.3 e 3.1), analisou-se a expressão destes genes.

O RNA total das células tumorais K562, foi extraído e após a obtenção do cDNA, os genes de interesse foram amplificados e quantificados por PCR em tempo real. Os resultados das reações da PCR em tempo real para cada gene foram normalizados, considerando-se a expressão relativa do gene constitutivo GAPDH ou beta-actina, com a do gene de interesse. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes. Em seguida, os produtos resultantes das reações de PCR destes genes foram avaliados por eletroforese em gel de agarose.

As células K562 tratadas com A2CN (60 μ M) por 24 h mostraram um aumento significativo na expressão dos genes Kv1.3 e Kv3.1, quando comparado com o controle, não tratado (figura 17). Esse aumento foi de $4,2 \pm 1,1$ vezes para o gene Kv1.3 e de $2,6 \pm 0,4$ vezes para o gene Kv3.1. Na figura 18 é possível observar que os fragmentos formados a partir da reação de PCR tiveram o tamanho esperado de 471 pb para Kv1.3 e de 485 pb para o gene Kv3.1.

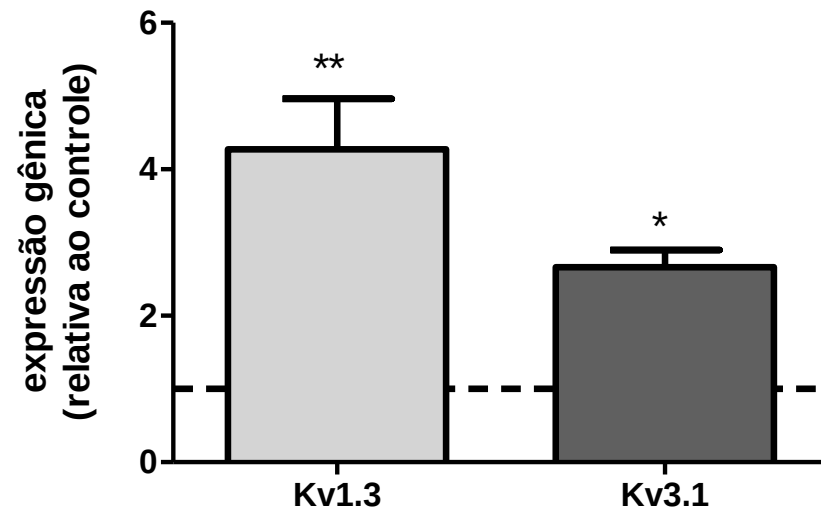


Figura 17: Expressão relativa dos genes para Kv1.3 e Kv3.1 nas células K562 tratadas com A2CN (60 µM) por 24 h em comparação ao grupo controle não tratado. Os dados foram analisados pelo teste t de student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

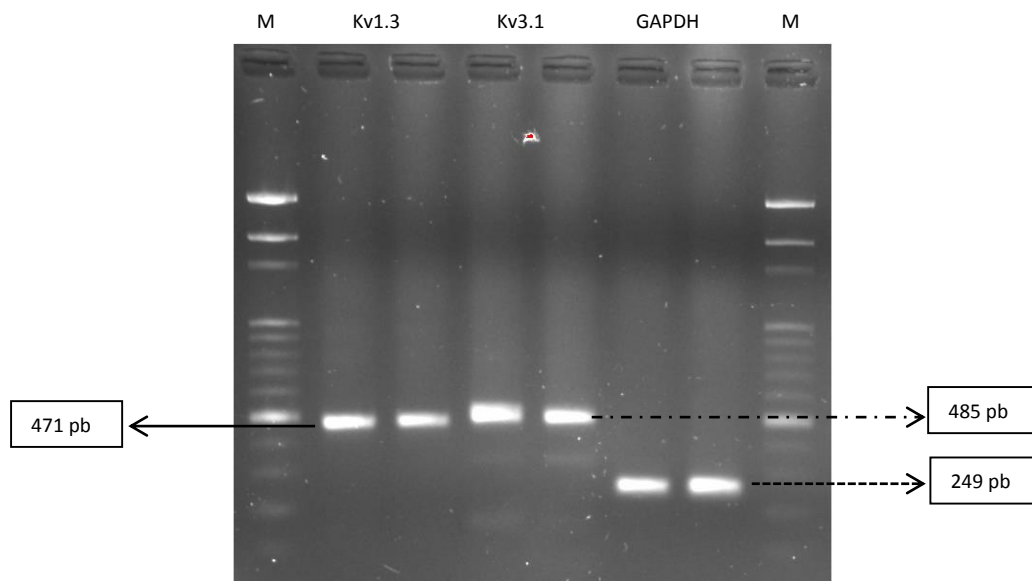


Figura 18: Análise dos produtos da PCR em tempo real por eletroforese em gel de agarose 1,5 % para avaliação do tamanho dos fragmentos. As amostras foram coradas com o Ez-vision e corridas a 100 V por 1,5 h. M= marcador para DNA (100 pb).

5.2.7 Análise eletrofisiológica em K562

5.2.7.1 Efeito do composto A2CN sobre os canais para potássio sensíveis a voltagem na linhagem celular K562

Após avaliar que as células tratadas com A2CN aumentavam a expressão gênica de alguns canais de potássio, tais como, Kv1.3 e Kv3.1, investigou-se o efeito desta molécula estaria alterando a funcionalidade no registro da corrente total dos canais Kv, utilizando a técnica de “whole cell patch-clamp”.

Para obtenção das correntes de potássio da linhagem celular K562, foi utilizado o seguinte protocolo para estabelecer a relação corrente voltagem: foi gerado pulsos despolarizantes a partir do potencial “holding” de -80 mV, para potenciais testes entre -50 mV e +70 mV, com incremento de 20 mV e frequência de estimulação 2Hz. A figura 19A mostra o desenho do protocolo experimental em mais detalhes. A figura 19B mostra os registros experimentais obtidos por meio do protocolo I/V. Na figura 19C podemos ver o gráfico I/V obtido por meio dos registros eletrofisiológicos. É possível observar que A2CN promoveu um aumento significativo na corrente total de potássio desde os pulsos menos despolarizantes, seguindo-se em todos os pulsos testados (Figura 19C).

Na situação controle foi perfundido a solução extracelular contendo (0,5 % DMSO), e na situação teste, a solução extracelular com o composto A2CN na concentração testada. A relação corrente voltagem foi aumentada na presença do A2CN e houve alteração potencial para atingir a densidade máxima de corrente.

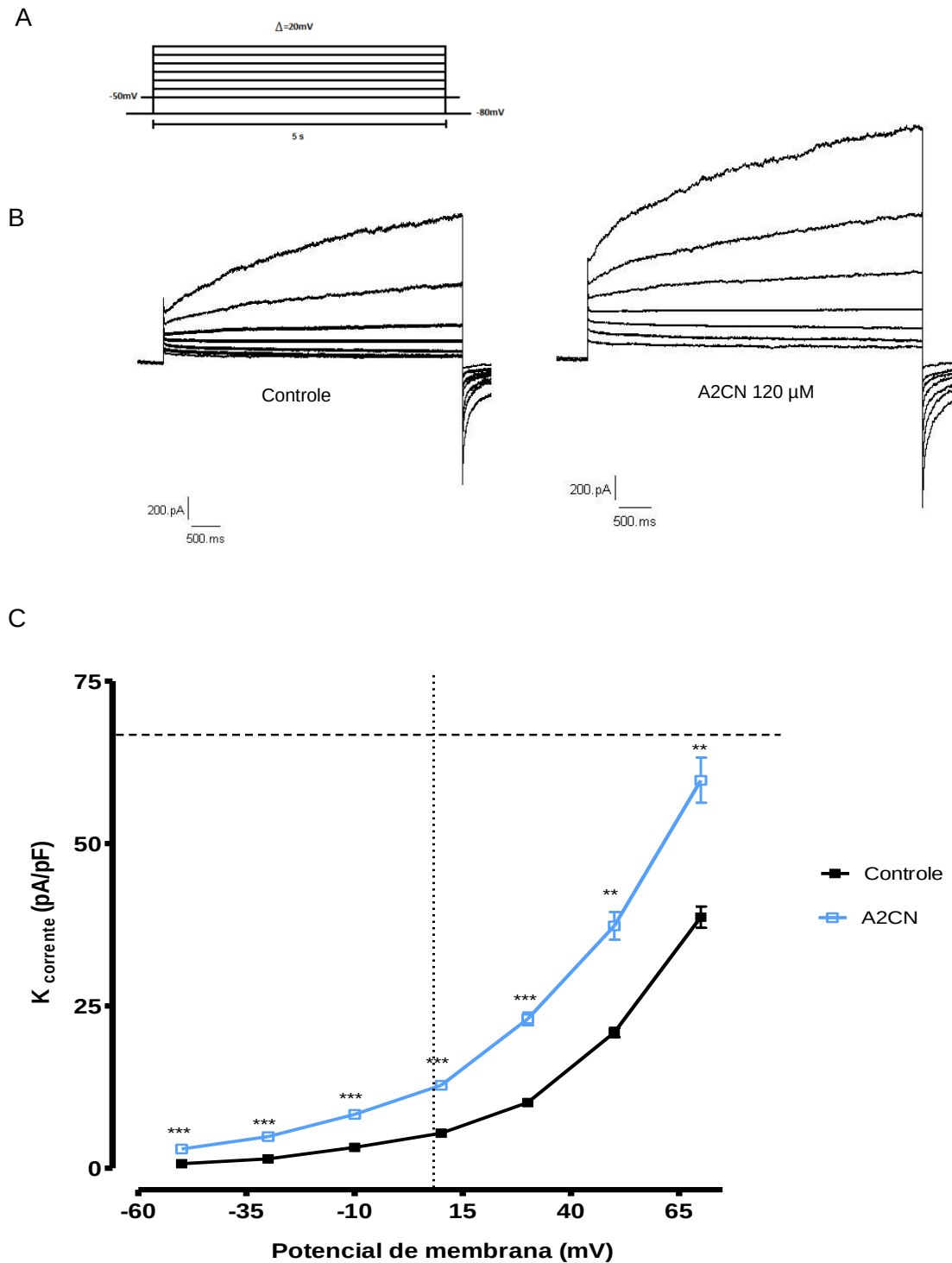


Figura 19: Efeito de A2CN nos canais de potássio voltagem-dependentes (Kv) em células K562. (A) Protocolo de pulso de voltagem, mostrando o potencial de “holding”. (B) Traçados representativos de corrente total de potássio da célula K562 controle (sem incubação de A2CN), registros da esquerda, e células K562 tratadas com A2CN (120 μM), registros da direita (C) Relação I/V, entre a corrente em pA/pF e a voltagem, em mV, sem e com incubação de A2CN (120 μM).

5.2.7.2 Efeito do composto A2CN sobre a cinética de ativação dos canais para potássio sensíveis a voltagem em células K562

O efeito do A2CN sobre a cinética de ativação dos canais para K^+ sensíveis à voltagem foi analisado a partir dos valores de condutância normalizados, em função dos potenciais testes (figura 20). O nível máximo de condutância foi assumido como sendo o valor extrapolado a partir da região linear da curva I/V, a curva de ativação estacionária foi ajustada segundo a equação de Boltzmann, $G / G_{max} = 1 / (1 + \exp [(V_{1/2} - V) / k])$, onde G =condutância, G_{max} = condutância máxima, V =voltagem. O resultado mostra que a curva foi deslocada para a esquerda, na presença de 120 μM de A2CN. Houve alterações significativas nos valores de $V_{1/2}$ (valor de voltagem cuja metade dos canais se encontram abertos). Os valores de $V_{1/2}$ e da inclinação (k) foram, respectivamente, $22,82 \pm 3,31$ mV e $8,3 \pm 5,4$ no controle, e $5,72 \pm 6,14$ mV ($p < 0,05$) e $9,57 \pm 3,45$, na presença de A2CN (120 μM). Os valores da constante k não foram significativos.

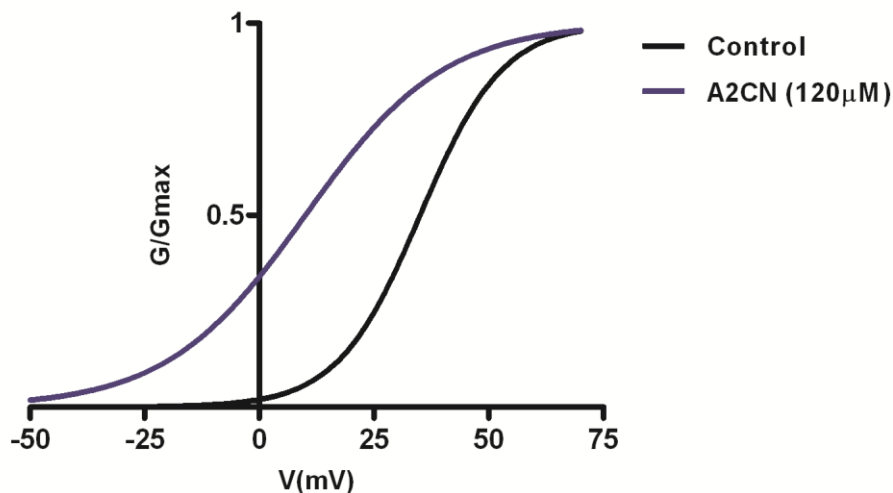


Figura 20: Efeito de A2CN na condutância ao potássio em células K562 tratadas com 120 μM . A curva de ativação estacionária foi ajustada segundo a equação de Boltzmann $G / G_{max} = 1 / (1 + \exp [(V_{1/2} - V) / k])$.

5.2.8 Efeito do inibidor de canais Kv, 4-aminopiridina (4-AP) na proliferação de células K562

Para verificar se a citotoxicidade induzida por A2CN nas células K562 estava relacionada ao aumento na corrente total de potássio, bem como, com o aumento na expressão dos canais KV, foi realizado o ensaio de redução de MTT, utilizando o bloqueador para canais de K^+ dependentes de voltagem, 4-AP. As células foram tratadas com 1 mM de 4-AP juntamente com A2CN (60 μ M).

A figura 21 mostra que 4-AP reduziu a citotoxicidade ($p < 0,05$) induzida por A2CN, quando incubada por 24 horas juntamente com o composto.

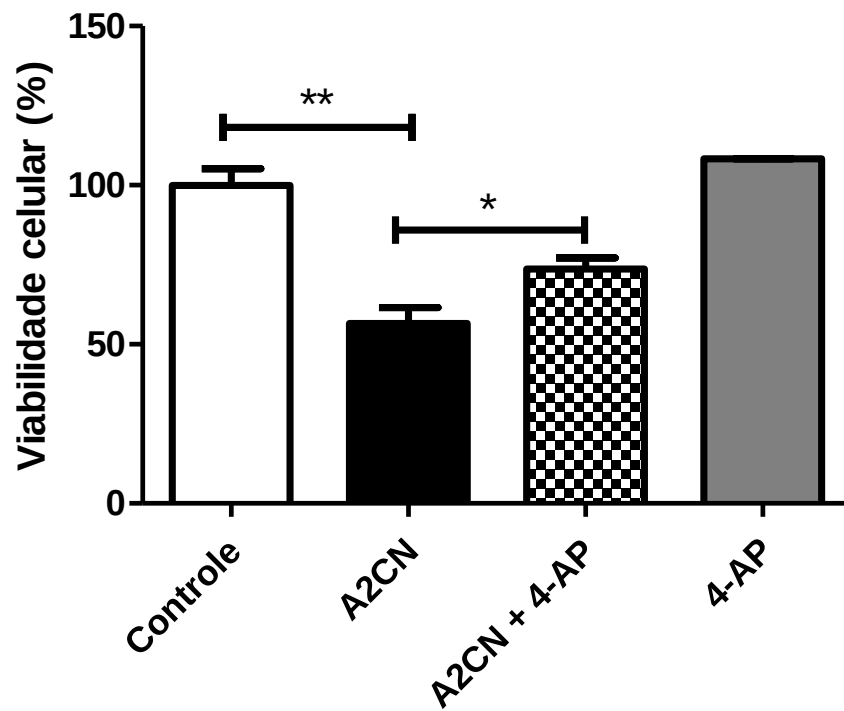


Figura 21: Efeito de 4-AP na viabilidade das células K562 tratadas com A2CN (60 μ M) por 24 h. Os dados foram obtidos de 2 experimentos em triplicata e analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. ** $p < 0,01$ em relação ao controle não tratado, * $p < 0,05$ em relação às células tratadas com A2CN.

5.2.9 Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* em células RAW 264.7

5.2.9.1 Avaliação da produção de NO

Para avaliar os efeitos dos adutos A2CN, A3CN e A4CN na produção de óxido nítrico (NO) foi mensurada a quantidade de nitrito, uma vez que este representa um produto final estável de NO, por meio da utilização do reagente de Griess. As células Raw 264.7 são uma linhagem imortalizada de macrófagos, bem utilizadas como modelo de indução de resposta inflamatória por moléculas como LPS e IFN- γ (interferon- γ). A cultura celular de macrófagos RAW 264.7 apresentou produção basal de NO de aproximadamente 2 μ M. A exposição das células RAW 264.7 ao LPS (1 μ g/mL, 22 h) resultou em aumento dos níveis de nitrito no sobrenadante celular para $7,8 \pm 1,9$ μ M. A incubação dos macrófagos com LPS e A2CN (2,5, 5, 10 e 20 μ M) reduziu de forma significativa a concentração de nitrito para $1,9 \pm 0,9$ μ M, $0,8 \pm 0,4$ μ M, $0,2 \pm 0,3$ μ M e $0,09 \pm 0,1$, respectivamente (figura 22).

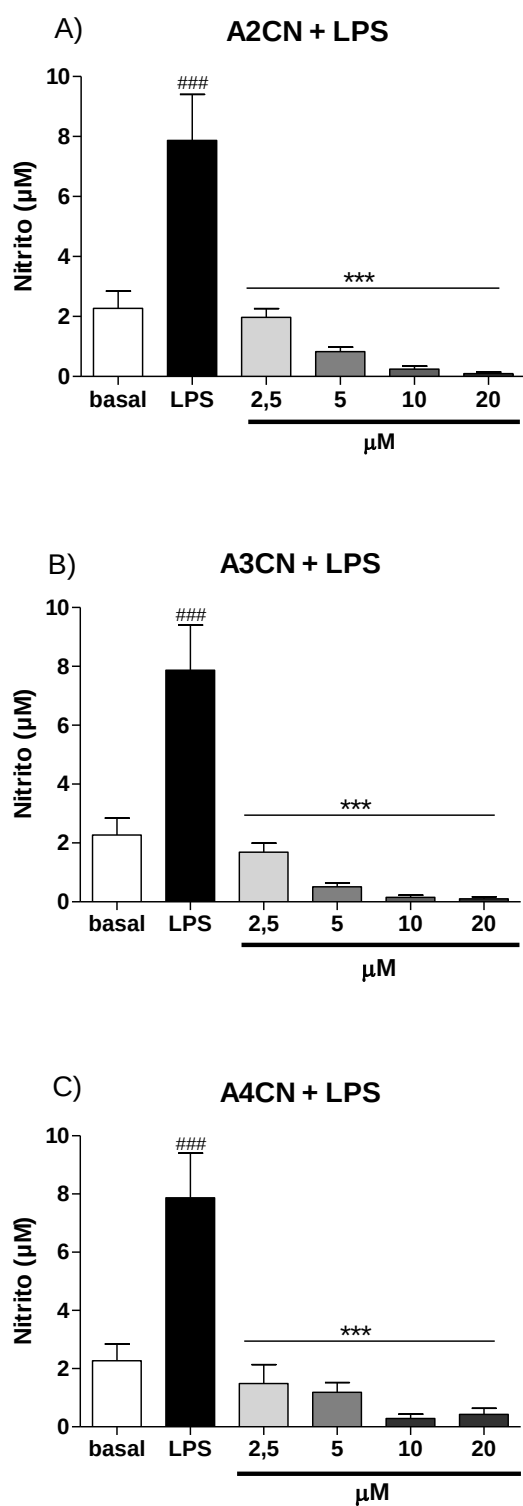


Figura 22: Efeito dos adutos A2CN, A3CN e A4CN sobre o acúmulo de nitrito no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 μg/mL) por 22 h. Os resultados correspondem à média de três experimentos $\pm$ e.p.m.. Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste Newman-Keuls. ### $p < 0,001$ em relação ao controle basal; *** $p < 0,001$ em relação ao LPS.

Em todos os grupos experimentais não houveram alterações na viabilidade celular, avaliadas pelo método de MTT nas concentrações testadas de 2,5, 5, 10 e 20 μ M dos adutos A2CN, A3CN e A4CN (figura 23).

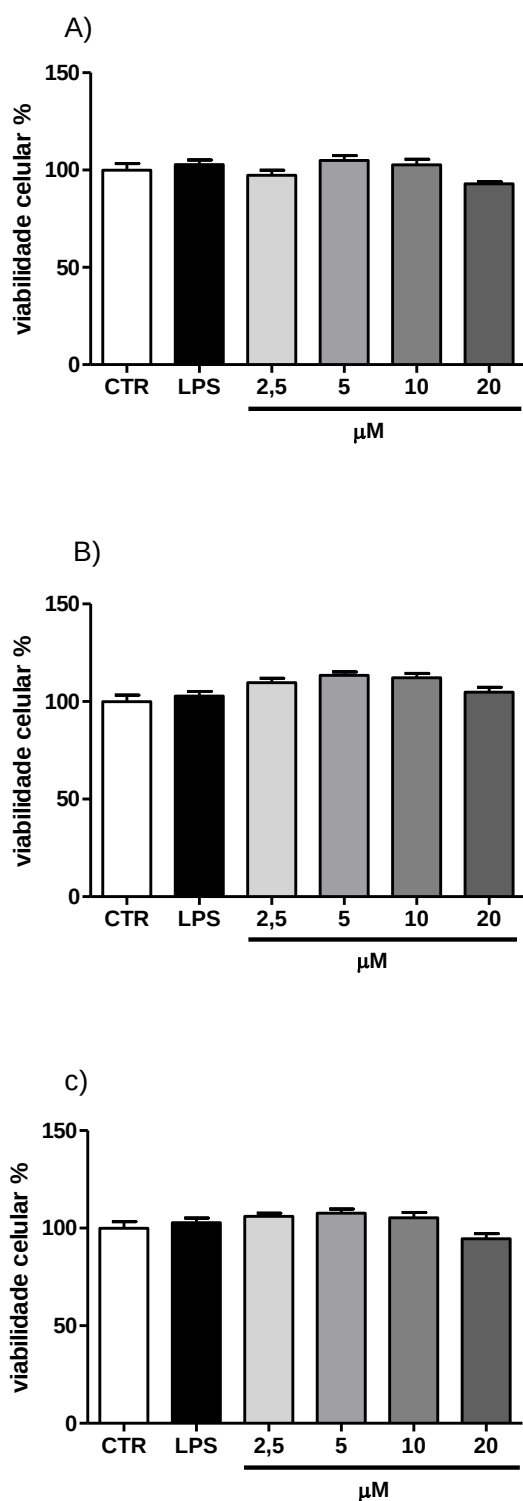


Figura 23: Efeito dos adjuvantes A2CN (A), A3CN (B) e A4CN (C) na viabilidade das células Raw 264.7 tratadas por 22 h. Os dados são expressos como média $\pm$ e.p.m. Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste Newman-Keuls.

5.2.9.2 Avaliação de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por citometria de fluxo em células Raw 264.7

Recentes publicações indicam que o ROS mitocondrial age como moléculas que disparam a produção de citocinas inflamatórias (NAKAHIRA et al., 2011; ZHOU et al., 2011). Estas observações prestam esclarecimentos necessários sobre a origem celular de ROS que impacta na produção de certas citocinas inflamatórias (NAIK & DIXIT, 2011). A produção de IL-6 induzida por LPS em células saudáveis tratadas com inibidores de mtROS (ROS mitocondrial), indicam que a cascata de sinalização é relevante para a indução de uma resposta inflamatória normal (BULUA et al., 2011).

Por isso avaliou-se a participação dos adutos A2CN, A3CN e A4CN na produção de ROS das células Raw 264.7. Como observado na figura 24, os adutos diminuíram a produção de ROS induzido por LPS nas células macrofágicas, a partir de 2,5 μ M, para A2CN e A3CN ($p < 0,01$) e, a partir de 10 μ M, para A4CN ($p < 0,05$).

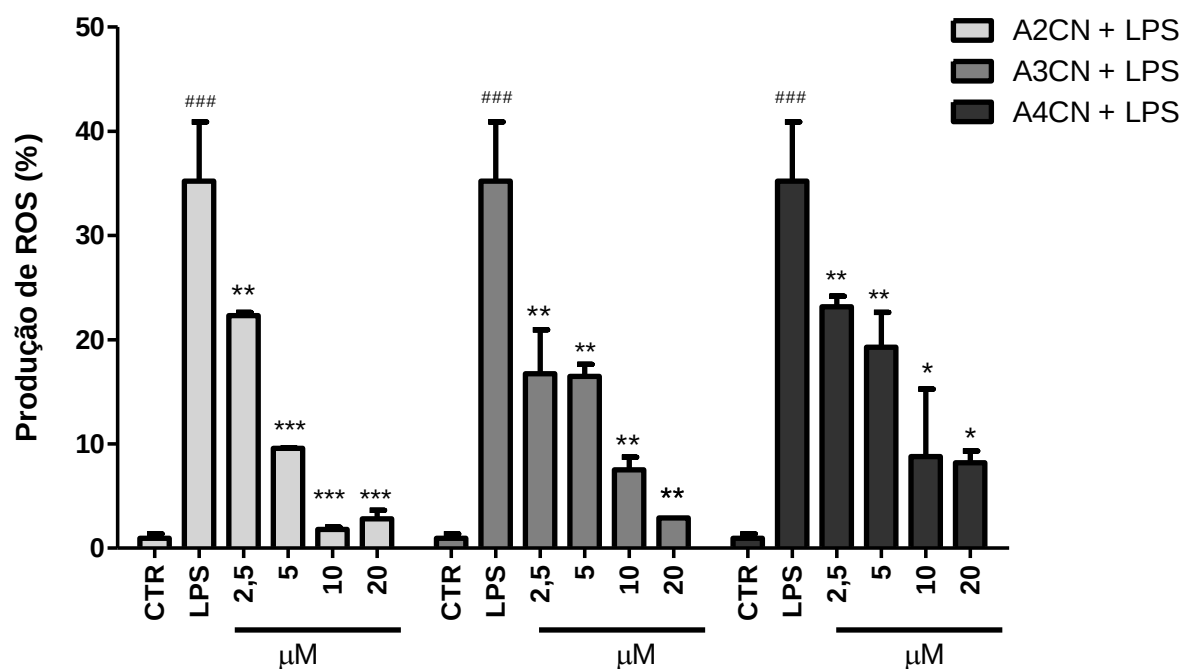


Figura 24: Efeito dos adjuvantes A2CN, A3CN e A4CN sobre a produção de ROS de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 µg/mL) por 22 h. Os resultados correspondem à média de três experimentos $\pm$ e.p.m. Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste Newman-Keuls. ### $p < 0,001$ em relação ao controle basal; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao LPS.

5.2.9.3 Avaliação da expressão dos genes para IL-1, IL-6 e COX-2 em células Raw 264.7

Com o objetivo de confirmar se o mecanismo molecular referente à atividade anti-inflamatória de A2CN, A3CN e A4CN, envolve a participação dos genes referentes às citocinas IL-1 β , IL-6 e COX-2, procedeu-se a análise da expressão destes genes.

As células Raw 264.7 tratadas com LPS sozinho ou incubado juntamente com A2CN, A3CN ou A4CN (10 μ M) por 22 h mostraram uma diminuição significativa na expressão dos genes IL-1 β (figura 25) e IL-6 (figura 26), comparado com o controle tratado com LPS (1 μ g/mL).

Entretanto, a análise da expressão gênica de COX-2, nas células Raw 264.7, tratadas com LPS sozinho ou incubadas juntamente com A2CN, A3CN ou A4CN (10 μ M) por 22 h, mostrou que apenas A2CN foi capaz de reduzir de forma significativa a expressão deste gene (figura 27) ($p < 0,05$).

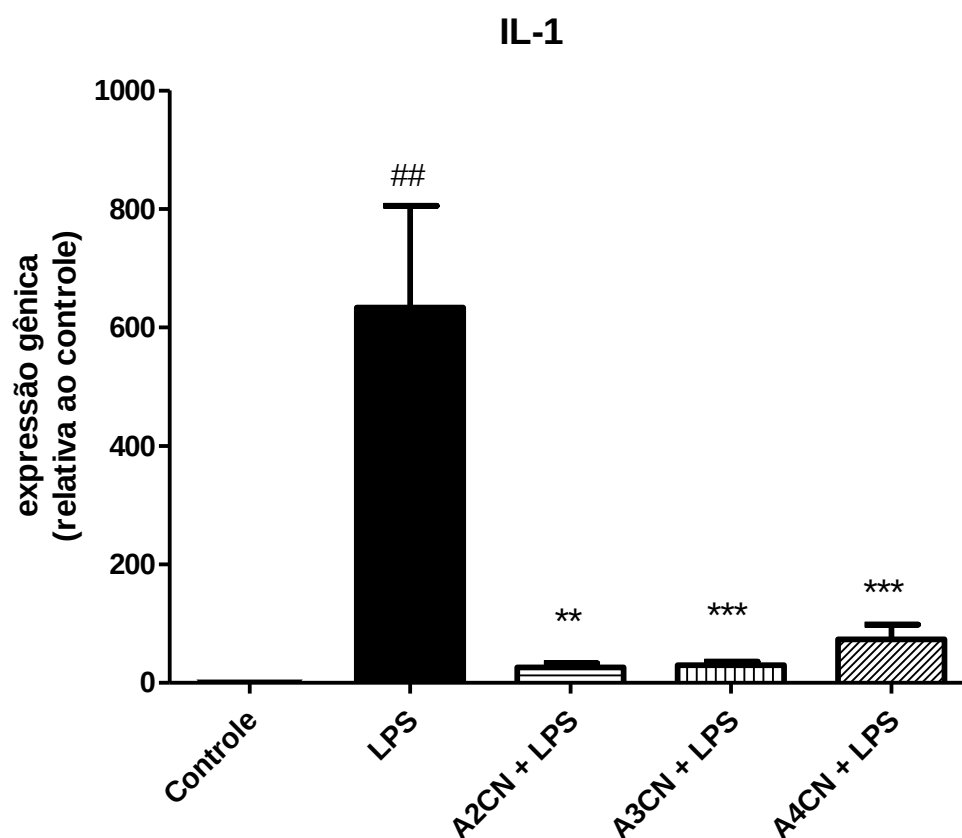


Figura 25: Expressão relativa dos genes para IL-1 β nas células Raw 264.7 tratadas com LPS (1 μ g/mL) ou incubadas juntamente com LPS e A2CN, A3CN ou A4CN (10 μ M) por 24 h em comparação ao grupo controle tratado apenas com LPS. Os dados foram analisados pelo teste t de student. ## $p < 0,01$ em relação ao controle basal; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao LPS.

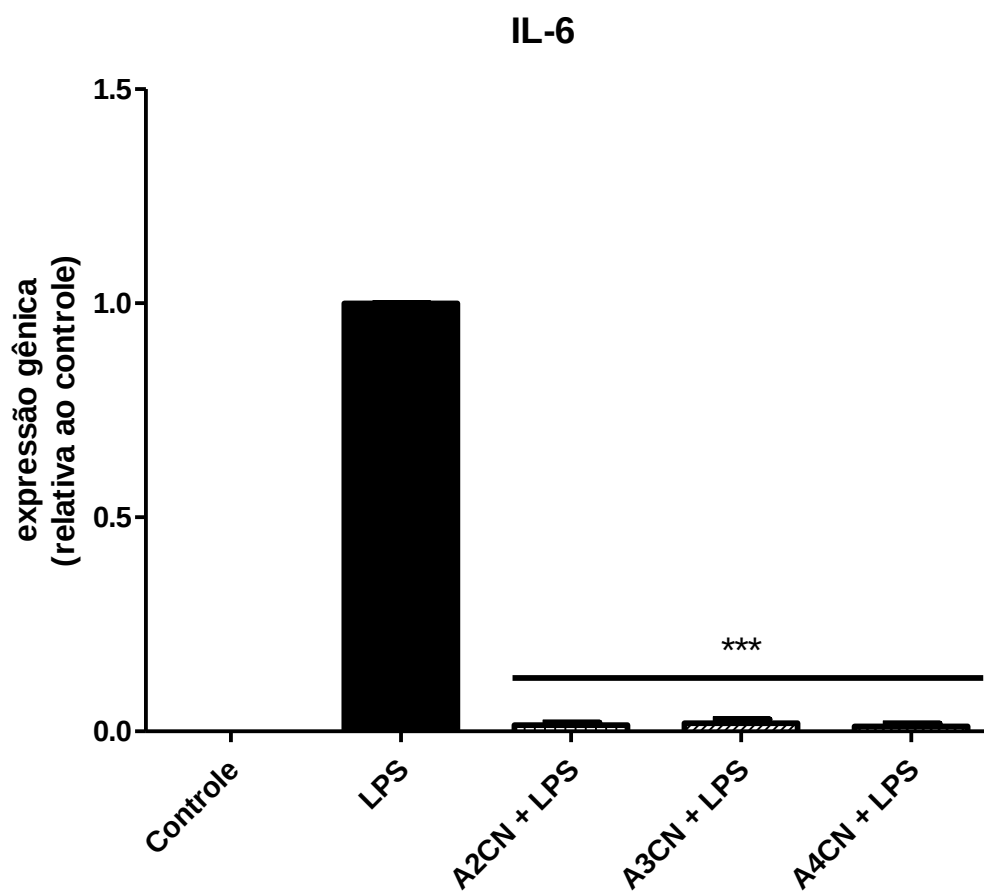


Figura 26: Expressão relativa dos genes para IL-6 nas células Raw 264.7 tratadas com LPS (1 µg/mL) ou incubadas juntamente com LPS e A2CN, A3CN ou A4CN (10 µM) por 24 h em comparação ao grupo controle tratado apenas com LPS. Os dados foram analisados pelo teste t de student. *** $p < 0,01$ em relação ao LPS.

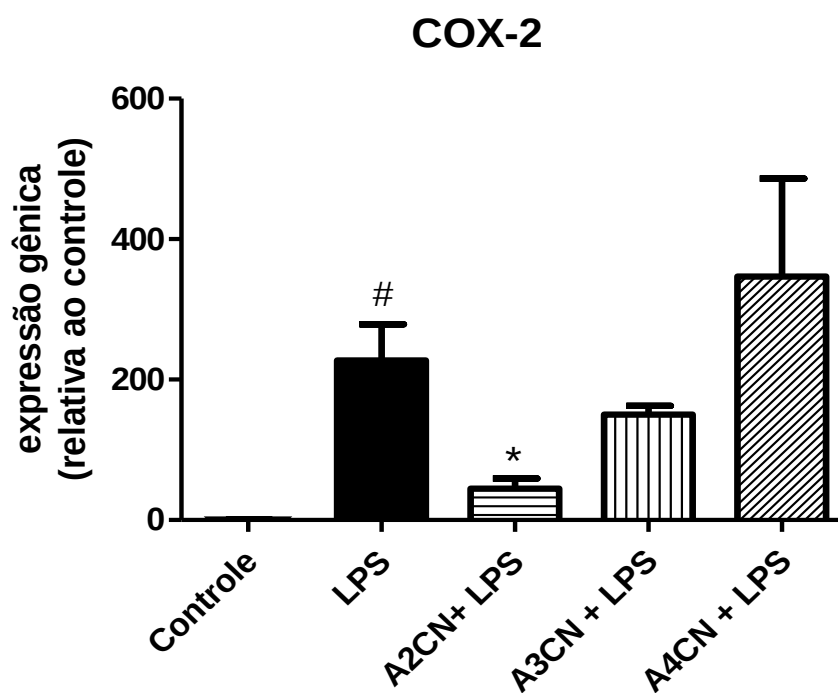


Figura 27: Expressão relativa do gene para COX-2 nas células Raw 264.7 tratadas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) ou incubadas juntamente com LPS e A2CN, A3CN ou A4CN (10 μM) por 24 h em comparação ao grupo controle não tratado. Os dados foram analisados pelo teste t de student. # $p < 0,01$ em relação ao controle basal; * $p < 0,05$ em relação ao tratado com LPS.

5.2.9.4 Avaliação da produção de citocinas

Para avaliar os efeitos dos adutos A2CN, A3CN e A4CN na produção das citocinas, realizou-se a dosagem pelo método ELISA (do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Foram dosadas as citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , a partir do sobrenadante da cultura celular de macrófagos RAW 264.7, exposta apenas ao LPS (1 μ g/mL, 22 h) ou incubado juntamente com os adutos.

A figura 28 mostra a redução dos níveis de IL-1 β ($p < 0,001$), após o tratamento com A2CN, A3CN e A4CN, a partir da menor concentração de 2,5 μ M, chegando aos níveis basais na maior concentração de 20 μ M. Na figura 29 mostrou-se a redução dos níveis de IL-6 após o tratamento com A2CN, A3CN ou A4CN, a partir da menor concentração de 2,5 μ M, chegando aos níveis basais, na maior concentração de 20 μ M. Na figura 30 demonstrou-se que, os adutos A2CN, A3CN e A4CN, não inibiram a liberação de TNF- α pelas células RAW 264.7, em nenhuma das concentrações testadas.

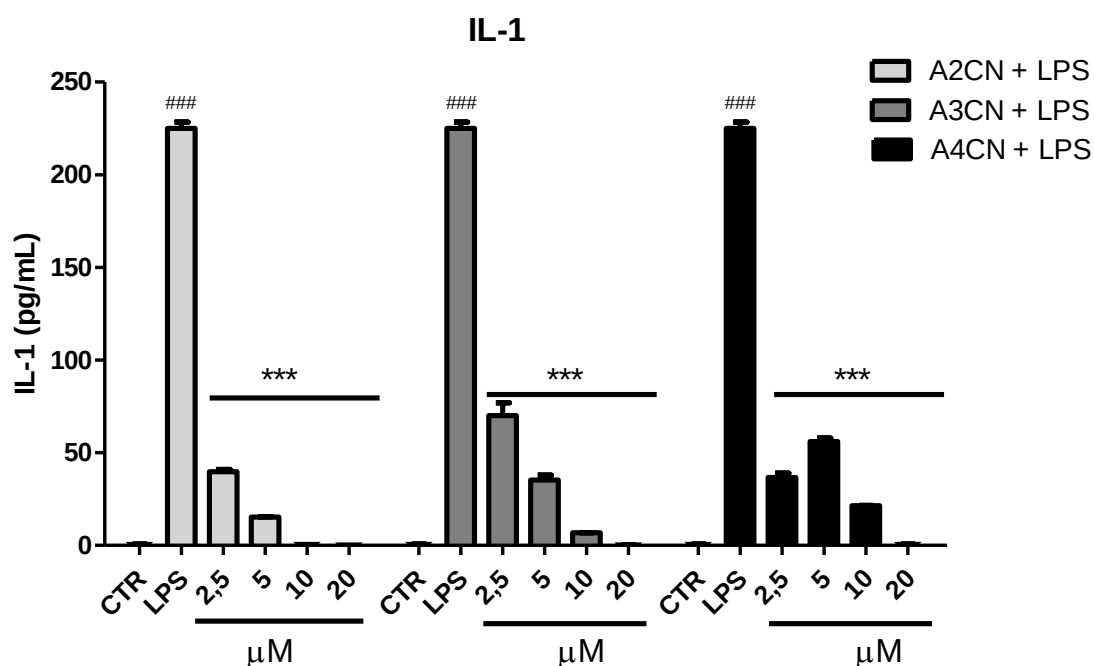


Figura 28: Determinação da citocina pró-inflamatória IL-1 β liberada pelas células Raw 264.7 após estímulo com LPS (1 μ g/mL) por 22 h. Sobrenadante das células controle, CTR, estimuladas somente com LPS, ou incubada juntamente com LPS e os adutos A2CN, A3CN e A4CN, nas concentrações determinadas, que foram avaliadas por ELISA. Os dados foram avaliados por ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. ### $p < 0,001$ em relação ao controle basal. *** $p < 0,001$ em relação às células estimuladas somente com LPS.

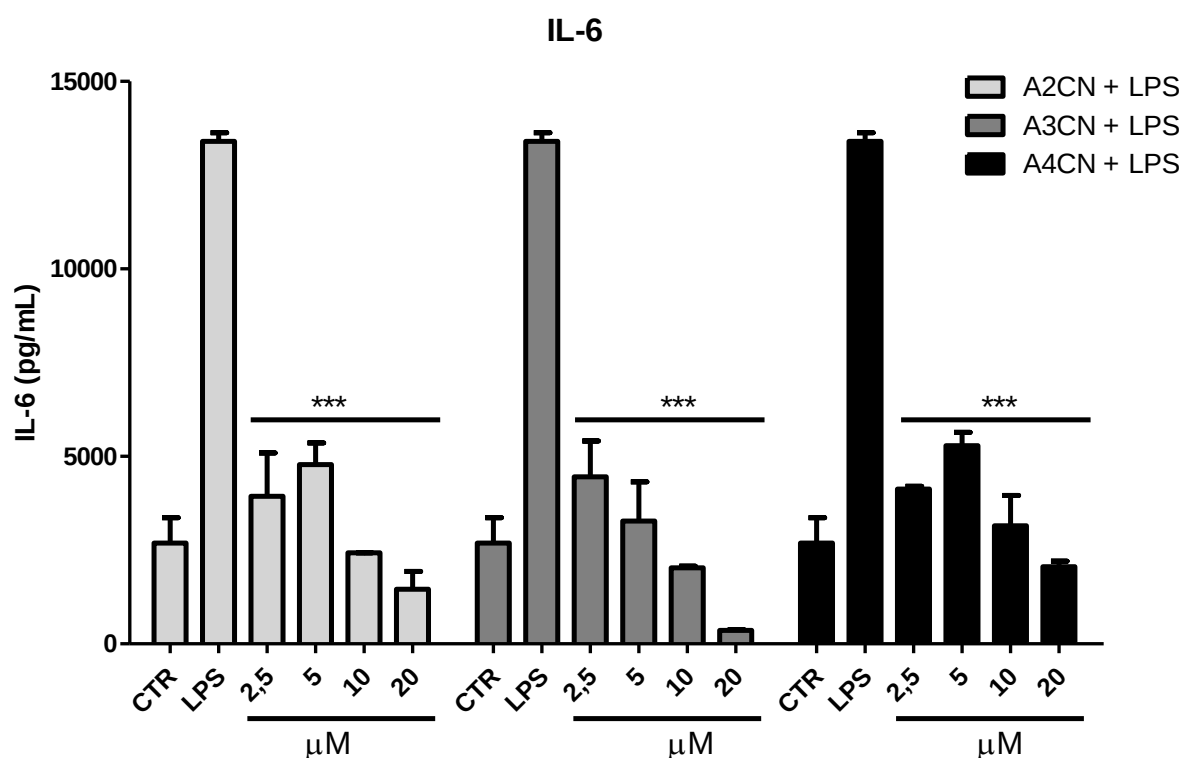


Figura 29: Determinação da citocina pró-inflamatória IL-6 liberada pelas células Raw 264.7 após estímulo com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) por 22 h. Sobrenadante das células controle=CTR, estimuladas somente com LPS, ou incubada juntamente com LPS e os adutos A2CN, A3CN e A4CN, nas concentrações determinadas, que foram avaliadas por ELISA. Os dados foram avaliados por ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. ### $p < 0,001$ em relação ao controle basal. *** $p < 0,001$ em relação às células estimuladas somente com LPS.

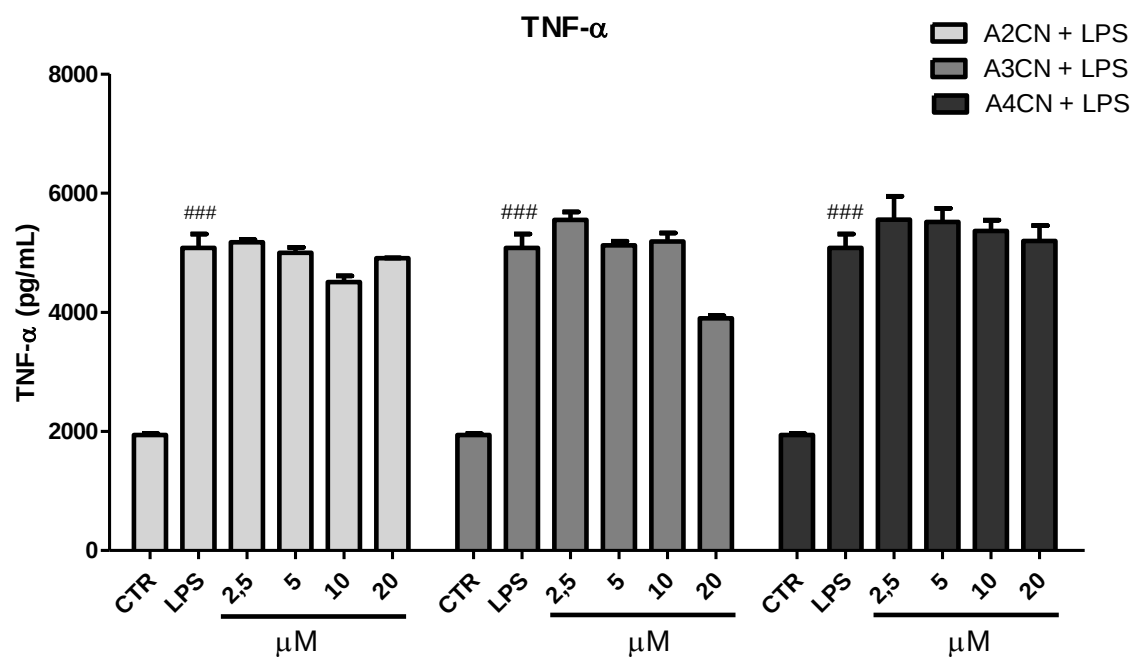


Figura 30: Determinação da citocina pró-inflamatória TNF- α liberada pelas células Raw 264.7 após estímulo com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) por 22 h. Sobrenadante das células controle=CTR, estimuladas somente com LPS, ou incubada juntamente com LPS e os adutos A2CN, A3CN e A4CN, nas concentrações determinadas, que foram avaliadas por ELISA. Os dados foram avaliados por ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

As primeiras atividades biológicas descritas para os AMBH foram contra o protozoário *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária (KUNDU et al., 1999). Em 2006 foi descrito atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* e no mesmo ano Kohn e colaboradores descreveram a atividade antiproliferativa de alguns AMBH contra linhagem de células tumorais. Neste mesmo artigo os autores demonstraram que os compostos aromáticos tiveram maior atividade nas células tumorais, do que os compostos alifáticos. Também foi demonstrada por Leite e colaboradores (2012), que essas moléculas têm potente atividade antimitótica, causando bloqueio no ciclo embrionário de ouriços-do-mar e possivelmente podem afetar a síntese de DNA e proteínas, levando a conclusão que, estas moléculas são potencialmente promissoras como drogas anticancerígenas.

Dados mais recentes obtidos no laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular da UFPB, por Bomfim (2013), após realização de triagem citotóxica de 30 moléculas de AMBH, mostraram que os compostos são potencialmente citotóxicos em células de leucemia mielóide aguda HL-60, sendo a presença de uma nitrila ou do grupo nitro, responsável pelo aumento da citotoxicidade dessas moléculas. Baseado nestes dados foi objetivo deste trabalho estudar o potencial anticâncer *in vitro*, bem como, avaliar a atividade anti-inflamatória de três adutos A2CN, A3CN e A4CN, que são isômeros de posição, apresentando a nitrila e um grupo nitro como radicais.

Neste estudo, os ensaios *in vitro* foram realizados usando várias linhagens celulares, para analisar os efeitos citotóxicos, inflamatórios e eletrofisiológicos dos adutos de Morita Baylis-Hillman.

Para avaliação do potencial citotóxico de uma molécula, a literatura relata que o ensaio de redução do MTT é umas das principais técnicas empregadas para mensurar a viabilidade celular. A citotoxicidade das moléculas A2CN, A3CN e A4CN, foi realizada a partir de um painel de linhagens de células normais, como PBMC, FGH, FN1 e L929, bem como, células tumorais humanas HL-60, MOLT-4, K562, K562-Lucena, HT-29, MCF-7 e murina B16F10.

As moléculas foram moderadamente citotóxicas para todas as linhagens, sendo a escala de toxicidade A2CN>A3CN>A4CN. Diferentemente deste achado, a

literatura reporta que, A4CN é mais citotóxica do que A2CN e A3CN, para formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi* (JÚNIOR et al., 2010).

Dentre os vários problemas apresentados pelos quimioterápicos, estão os efeitos colaterais, oriundos da pouca seletividade destes frente a células normais, como exemplos, as da mucosa do trato gastrointestinal e as do sistema hematopoiético (CHARI, 2008). Buscando demonstrar uma possível seletividade dos AMBH, para as células tumorais, a citotoxicidade destes compostos foi avaliada nas linhagens normais FN1 e sobre as células mononucleares do sangue periférico humano, por meio do ensaio do MTT. Os resultados mostraram certa seletividade dos compostos frente às células tumorais *in vitro*, mas não exclui totalmente a citotoxicidade dos AMBH para células normais.

Após avaliar o efeito citotóxico dos compostos nas células tumorais humanas e murinas, prosseguiram-se os ensaios de avaliação do mecanismo de ação anticâncer, induzido pelo composto A2CN, que foi o mais potente dos adutos testados, na maioria das linhagens tumorais. Para isso, utilizou-se a linhagem K562 (leucemia mielóide crônica), a qual expressa a oncoproteína BCR-ABL, que contribui para inibição da apoptose, desorganização do citoesqueleto e diminuição da adesão celular, conferindo a esta linhagem, pior prognóstico clínico e resistência a vários quimioterápicos (RUMJANEK et al., 2013).

As células da linhagem K562 são uma linhagem de leucemia mielóide crônica (LMC) humana derivada de efusão pleural de um paciente que sofria de LMC em crise blástica terminal e esta linhagem é de longe o modelo de LMC mais estudado (LOZZIO; LOZZIO, 1975; RUMJANEK, et al., 2013). K562 foi a primeira linhagem de células LMC que permaneceu com um cromossomo Filadélfia positivo, depois de longos períodos de cultura. Estas células têm sido caracterizadas como células altamente indiferenciadas, são blastos multipotentes e células malignas hematopoiéticas que tem 1,5 vezes o número normal de cromossomos. Estudos de propriedades de superfície de membrana levaram a conclusão que K562 foi uma linhagem eritroleucêmica humana (ANDERSSON, et al., 1979).

Em 1983, foi estabelecida a linhagem resistente K562-Lucena, a partir de células K562, usando doses crescentes de vincristina. Essas células superexpressam o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR), responsável pela falha de muitos quimioterápicos em pacientes com câncer. O mecanismo

melhor estudado envolve a expressão de transportadores ABC, mas o processo de resistência é multifatorial e pode envolver mecanismos de reparo, detoxificação de drogas e resistência a apoptose.

Neste trabalho, os ensaios de citotoxicidade com MTT mostraram que as células de leucemia mielóide crônica, K562 e Lucena, as quais expressam fenótipo MDR, foram menos sensíveis no tratamento por 24 h com A2CN, contudo, após 72 h de tratamento com os adutos A2CN, A3CN e A4CN, estas células tiveram a mesma sensibilidade que as linhagens de leucemia aguda HL-60 e MOLT-4, por isso, sugere-se que essas moléculas não são substrato para os transportadores ABC, que funcionam como bomba de extrusão para muitos quimioterápicos. Esse dado confirma os resultados demonstrados por Leite e colaboradores (2012) com células embrionárias de ouriço-do-mar, tratadas com AMBH, os quais não aumentaram o acúmulo do corante calceína-AM, revelando que as moléculas não são substrato para as proteínas transportadoras ABC, responsáveis por causar um aumento na resistência drogas.

O uso da linhagem K562 como modelo para estudo de drogas anticancerígenas indica que é possível utilizar modelos *in vitro* de células com fenótipo de resistência a múltiplas drogas (CATALANI et al., 2013; SALUSTIANO et al., 2010).

O efeito da maioria dos quimioterápicos e o sucesso dos atuais esquemas de intervenção terapêutica para o tratamento do câncer, como radioterapia e imunoterapia, dependem fortemente da capacidade de induzir a célula tumoral a desencadear sua morte por apoptose (FULDA, 2009). Então, o desenvolvimento de drogas que tenham como alvo induzir morte apoptótica das células tumorais, bem como causem uma parada no ciclo celular impedindo a proliferação das mesmas, constitui uma das estratégias terapêuticas na área da oncologia (CIAVARELLA et al., 2010; MOFFITT et al., 2010; OLA et al., 2011; RUSSO et al., 2006; STRAUB, 2011; FAHEINA-MARTINS, 2012).

O processo apoptótico pode ser induzido por duas vias: a extrínseca, que é mediada por um subgrupo de superfamília de receptores de morte, como o receptor do fator de necrose tumoral (TNFR), que incluem TNFR, Fas e TRAIL, e a via intrínseca, a qual é principalmente centrada e regulada pela mitocôndria (PORTT et

al., 2011). A via de morte celular mitocondrial pode ser ativada por uma variedade de estímulos-independentes de receptor, tais como, radiação, radicais livres, infecções virais e privação de nutrientes e/ou soro. Estes estímulos podem resultar em alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial devido à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. A maior consequência desta alteração da permeabilidade é a diminuição do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\psi_m$), a liberação de proteínas pró-apoptóticas e a parada do funcionamento bioenergético da organela (INDRAN et al., 2011). O composto A2CN promoveu dissipação do potencial transmembrânico mitocondrial após 24 h de tratamento, sendo este efeito observado a partir de 30 μ M. Esses resultados sugerem o envolvimento da via intrínseca da apoptose, pelo composto A2CN. A despolarização também foi observada pelo etoposídeo após 24 h de incubação, na mesma proporção de A2CN.

Recentemente, Sandes e colaboradores (2014) demonstraram que A2CN na concentração de 57 μ M promoveu despolarização da membrana mitocondrial de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi in vitro*, após 72 h de tratamento, corroborando com os achados obtidos neste estudo com células K562.

Espécies reativas de oxigênio (ROS) também representam um grande participante nos processos apoptóticos (POROUVA et al., 2010; ORRENIUS et al., 2007). Os níveis de ROS parecem estimular a cascata apoptótica, por causar danos a muitos componentes celulares, incluindo proteínas, lipídeos e a própria mitocôndria, a qual por sua vez, facilita a liberação de fatores apoptogênicos (ORRENIUS et al., 2007). A geração de ROS também pode ser uma consequência do processo apoptótico, tendo em vista que, a perda do potencial transmembrânico mitocondrial resulta na diminuição da fosforilação oxidativa e no aumento dos níveis de ROS (PRADELLI et al., 2010).

Como a mitocôndria torna-se uma fonte de geração de espécies reativas de oxigênio, durante a apoptose (PAN et al., 2007), sugere-se que, a produção de ROS por A2CN, ocorre após a dissipação do potencial transmembrânico mitocondrial, pois a produção de ROS foi baixa, atingindo $12,5 \pm 5,2$ % na concentração de 60 μ M. De fato, comparando-se os percentuais de células despolarizadas com os percentuais de células produzindo ROS após o tratamento com A2CN, sugerimos

que a geração de ROS não antecede a dissipação do potencial transmembrânico mitocondrial.

No processo de multiplicação celular, tanto células normais como células tumorais podem sofrer uma bateria de danos no seu DNA, de natureza endógena, como erros de replicação e bases danificadas por radicais livres de oxigênio, bem como de natureza exógena, pela radiação UV, toxinas da dieta, hidrocarbonetos aromáticos e uso de drogas. Para prevenir que esses danos e mutações passem para as próximas gerações, as células podem promover o reparo do DNA, ao ativar proteínas que promovam uma parada no ciclo celular, para que ocorra o reparo nestes danos ou a célula inicie o processo de morte por apoptose (POEHLMANN; ROESSNER, 2010, CHEN et al., 2012)

Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem seu efeito sobre células que se encontram no ciclo celular, e são denominados fármacos ciclo-celular específicos. O composto A2CN, induziu parada no ciclo celular na fase G₁, a partir da concentração de 30 µM, correspondente a metade da CI₅₀ no tempo de 24 horas. Com o aumento da concentração para 60 µM, A2CN promoveu um acúmulo de células na fase S do ciclo celular, bem como um aumento de células na fase sub-G₁, com conteúdo subdiploide, que corresponde a corpos apoptóticos com DNA fragmentado ou com cromatina condensada (TORRES et al., 2008). Esse evento demonstra que o composto além de inibir a síntese de DNA, que ocorre na fase S, induz a morte celular por apoptose, provavelmente porque essas células não conseguiram reparar os danos causados pela molécula, confirmando anteriormente os ensaios de despolarização mitocondrial e produção de ROS. Esse resultado corrobora com os dados de Leite e colaboradores (2012), que demonstraram que A2CN apresentou atividade antimitótica pelo bloqueio do desenvolvimento de embriões de ouriço-do-mar, tanto na primeira clivagem, como no estágio de mórula.

O ciclo celular é um processo evolutivamente conservado, cuja progressão, é estritamente regulada por complexos CDK-ciclina (proteínas cinases dependentes de ciclinas), onde a CDK é a subunidade catalítica e a ciclina é a subunidade ativadora. Além da ligação com ciclinas ativadoras, as CDKs são reguladas pela ligação de proteínas inativadoras, denominadas CKIs (proteínas inibidoras de proteínas cinases ciclina-dependentes) (SURYADINATA, et al., 2010). A

superexpressão da ciclina D1 tem sido encontrada em uma variedade de tumores, incluindo mama, carcinoma de célula escamosa oral e orofaríngea e em câncer colorretal (ENGIN et al., 2006; IOACHIM, 2008; PERISANIDIS et al., 2014). Liu e colaboradores (2004) demonstraram que, a superexpressão do gene da ciclina D1 pode ser usado como um marcador de evolução da leucemia mielóide crônica e um mau prognóstico. O composto A2CN promoveu uma redução na expressão do gene para a ciclina D1 (figura 15), em células K562, mas não alterou significativamente o gene para a ciclina E, após o tratamento com 60 μ M. Esse resultado elucidou a parada no ciclo celular na fase G₁, induzida pelo aduto, dado que, a família das ciclinas tipo D (D1, D2, D3) regulam a transição da fase G₁/S, e necessitam estar em níveis elevados para que a célula consiga prosseguir no ciclo celular (MASSAGUE, 2004; PESTELL, 2013).

Como A2CN inibiu a expressão do gene da ciclina D1, é possível que as vias Akt e PI3K estejam sendo inibidas, posto que, seja bem relatado na literatura que a proteína-quinase Ras, induz ativação da sinalização Raf/MEK/MAP cinase, a qual promove a elevação na expressão da ciclina D. (GILLE; DOWNWARD, 1999; FOSTER et al., 2010).

P53 monitora a integridade genômica e impede a passagem da célula de G₁ para S, se o genoma estiver danificado (SANCAR et al., 2004). Além de atuar como um supressor tumoral, na via ciclina-dependente, p53 possui uma função central na regulação do ciclo celular, sendo este mais supervisor. Essa proteína controla um grande número de genes e intermedeia a parada no ciclo celular, nas fases G₁ e G₂/M, o reconhecimento de danos, reparo no DNA, apoptose e senescência (LEVINE; OREN, 2009; PFLAUM et al., 2014). Quando ativado em resposta a um estresse celular, p53 ativa a transcrição de p21^{cip} levando a uma parada no ciclo celular na fase G₁ e S (ABBAS; DUTTA, 2009). Uma vez que o gene p53 é frequentemente mutado ou inativado em muitos diferentes tipos de câncer, ele é um alvo terapêutico extremamente atrativo para tratar esta doença.

As células k562, quando tratadas com 60 μ M de A2CN por 24 h, aumentaram aproximadamente oito vezes a expressão do gene p53 (figura 14) em relação ao controle não tratado. Esse resultado desvendou a parada no ciclo celular induzida pelo composto, bem como, a apoptose induzida nas células K562. Pois, ao mesmo

tempo em que controla o ciclo celular, p53 promove apoptose. Como é bem relatado na literatura, muitos tumores são deficientes em p53, inclusive a linhagem K562, que não expressa esta proteína (CAVALCANTI JÚNIOR et al., 2010). A restauração da expressão deste gene, mostra que é possível reverter a resistência a diferentes terapias quimioterápicas, podendo resultar na regressão tumoral (VENTURA et al., 2007)

Uma importante função de p53 é agir como fator transcricional ao se ligar em regiões consenso específicas do DNA, a qual dever-se-ia esperar um aumento na síntese de p21^{cip}, envolvida no ciclo celular, bem como de *PUMA*, *BAX*, *Bid* e *NOXA* no processo apoptótico (DUFFY et al., 2014). Como esperado, A2CN também promoveu um aumento nos níveis do gene p21, aproximadamente quatro vezes mais em relação ao controle (figura 14), o que resultou na inibição da progressão do ciclo celular da fase G1 para S.

Outra proteína inibidora de cinases é a p27^{kip}, a qual semelhantemente a p21 é reconhecida como inibidora do complexo ciclina E-CDK e ciclina A-CDK, mas podem também, se ligar a complexos ciclina D-CDK. A superexpressão de p27 está relacionada com a inativação de CDK e entrada na fase S do ciclo celular (POLIAK et al., 1994; ABUKHDEIR; PARK, 2009). Como esperado, os níveis de p27 também foram elevados após o tratamento das células K562 com 60 µM de A2CN por 24 h (figura 14).

Muitos canais iônicos de membrana plasmática possuem uma função essencial na proliferação celular. Como é o caso dos canais de potássio voltagem-dependentes (Kvs), cuja função é dependente do ciclo celular. Comumente, estes canais controlam a voltagem de membrana, sinalização de Ca²⁺, concentrações iônicas intracelulares, pH citosólico e volume celular de células em proliferação e com isto, participam da regulação do ciclo celular, que geralmente é alterado em células tumorais. Os canais Kv também tem um impacto na morte celular programada por apoptose (LANG, et al., 2005; STÜHMER et al., 2006; GULBINS et al., 2010).

Kv1.3 é um canal predominantemente expresso em linfócitos e eles estão envolvidos na ativação de células T e na proliferação celular (ARCANGELI et al.,

2009). Recentemente, alguns trabalhos tem demonstrado a participação deste canal na morte celular por apoptose, mediada pela via intrínseca mitocondrial, pois elevados níveis de Kv1.3 facilitam uma resposta apoptótica (BOCK et al., 2002; SZABO et al., 2008; GULBINS et al., 2010). Bielanska e colaboradores (2009) relatam que, a expressão de Kv1.3 é diminuída em muitos tipos de câncer, e possivelmente seria um mecanismo de se evadir da apoptose mediada pela via intrínseca.

Neste trabalho, nós demonstramos que as células K562 expressam alguns canais Kv, como Kv1.3 e Kv3.1, e o tratamento destas células com 60 μ M de A2CN por 24 h, promoveu um aumento significativo na expressão destes canais. Provavelmente o aumento da expressão destes canais Kv, seja na membrana plasmática, seja na membrana mitocondrial, estão contribuindo para a parada no ciclo celular e morte por apoptose, visto que, o aumento destes canais na membrana, podem estar promovendo o efluxo de K^+ da célula. Uma característica comum da apoptose é a diminuição do volume celular e redução da concentração de K^+ intracelular ($[K^+]_i$) (BORTNER et al., 1997). Esta diminuição do volume celular é atribuída ao efluxo de K^+ , que precede eventos apoptóticos marcantes como despolarização mitocondrial, liberação de citocromo c da mitocôndria, formação de apoptossoma e fragmentação celular (LANG et al., 2005; BORTNER; CIDLOWSKI, 2007). A diminuição na $[K^+]_i$, devido a saída de K^+ , durante a diminuição do volume celular, parece promover eventos críticos, incluindo clivagem proteolítica de pró-caspase-3 e aumento da atividade de endonucleases (YU, 2003; SZABO et al., 2010).

Como se observou um aumento na expressão dos canais Kv, nas células K562 tratadas com A2CN, buscou-se identificar a funcionalidade destes canais nestas células, na presença do composto. Foi possível observar que, A2CN (120 μ M, correspondente a 2 x a CI_{50}) aumentou significativamente a corrente total de potássio em células K562, a partir do pulso menos despolarizante de -60 mV, permanecendo aumentada até + 70 mV. Esse resultado comprova que, ocorreu um efluxo maior de potássio na presença da droga, confirmando a relação deste evento inicial com a apoptose observada com 24 h.

Esse resultado corrobora com os dados obtidos por Storey e colaboradores (2003), cujo trabalho demonstrou a ativação do receptor de morte Fas, pelo ligante de Fas, relacionado ao aumento da amplitude das correntes de K^+ em células Jurkat, bem como induziu a apoptose nestas células. O mesmo trabalho mostrou que o aumento da amplitude das correntes de $Kv1.3$ em resposta ao ligante de Fas, requer a mesma cascata de sinalização da apoptose, bem como outros marcadores, como ativação de caspases e encolhimento celular.

Recentemente Lansu e Gentile (2013) demonstraram que um ativador de canal de Kv , hERG1 inibe a proliferação de células de adenocarcinoma de mama SKBR3, após indução de parada no ciclo celular irreversível e ativação da senescência celular.

Neste trabalho, demonstrou-se distintamente que A2CN aumentou a condutância ao K^+ em células K562, pois em potenciais menos despolarizantes, os canais já se apresentavam abertos, quando comparado ao controle, permitindo assim um efluxo maior de K^+ . Observou-se que o $V_{1/2}$ reduziu de + 22,8 mV para + 5,7 mV.

Com a finalidade de perceber, qual o papel dos canais de K^+ na citotoxicidade de A2CN na linhagem celular K562, incubou-se estas células com 60 μM de A2CN juntamente com 4-AP (1 mM), bloqueador inespecífico de canais de K^+ . A figura 21 mostrou que interessantemente, 4-AP reduziu a citotoxicidade de A2CN nas células K562. A viabilidade celular foi alterada de $56,6 \pm 8,6 \%$ nas amostras tratadas com A2CN para $73,7 \pm 6,1\%$ (figura 21), quando incubadas com 60 μM de A2CN, juntamente com 1 mM de 4-AP. Esse resultado corrobora com os dados obtidos por Wang e colaboradores (2003), onde 4-AP preveniu a apoptose em células epiteliais corneais e inibiu a atividade dos canais de K^+ .

O câncer é uma doença extremamente complexa, estima-se que 95 % dos casos de câncer são ligados ao moderno estilo de vida e ambiente associado com a inflamação (ANAND et al., 2008). A inflamação crônica tem sido amplamente relacionada com o aumento da taxa de formação de tumores (BALKWILL; MANTOVANI, 2002; PAL et al., 2014). O mecanismo induzido pela inflamação crônica, para o desenvolvimento do câncer, envolve a continua presença de

citocinas, quimiocinas, ROS, oncogenes, COX-2, 5-lipoxigenase (5-LOX), metaloproteinases (MMPs) e ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B. Há evidências que drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs) têm promissora atividade anticâncer (THUN et al, 2002; RUDER et al, 2011).

Um dos mais proeminentes fenômenos observados na inflamação é o aumento progressivo de NO (FANG et al., 2011). Neste trabalho, os adutos A2CN, A3CN e A4CN inibiram completamente a produção de NO em células RAW 264.7 estimuladas com LPS, mesmo em baixas concentrações (2,5 μ M). Essa inibição, não ocorreu por alteração na viabilidade celular, pois os dados obtidos após 24 h de tratamento com os AMBH até 20 μ M mostraram que as moléculas não reduziram a viabilidade das células (figura 23).

A inflamação crônica é frequentemente acompanhada pelo aumento da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS). A atividade pró-neoplásica de ROS é principalmente a indução de danos ao DNA (MARNETT, 2000). Agentes que previnam a formação de ROS inibem a indução de danos no DNA, mutagênese e transformação. Os adutos A2CN, A3CN e A4CN inibiram completamente a produção de ROS em células RAW 264.7, mesmo em baixas concentrações (2,5 μ M), estimuladas com LPS. Esse resultado, juntamente com o bloqueio na síntese de NO demonstram claramente o potencial antiredox dos AMBH deste estudo.

Para obter um conhecimento mais claro do efeito dos AMBH, A2CN, A3CN e A4CN, avaliou-se a alteração nos níveis de RNAm, para os genes da IL-1 β e IL-6 em células Raw 264.7 estimuladas com LPS e tratadas com 10 μ M dos AMBH em separado. Os adutos induziram uma inibição drástica na expressão do gene da IL-1 β , para níveis basais (sem estimulação com LPS), bem como no gene da IL-6, o qual só foi detectado quando as células eram estimuladas com LPS. Os AMBH inibiram estes genes de forma similar (figuras 25 e 26). Numerosos estudos têm indicado que células tumorais exibem produção constitutiva de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 α , IL-6, GM-CSF (fator de estimulador de colônia para macrófagos/granulócitos) (GRIVENNIKOV et al., 2010; SETHI et al., 2012). A inibição mostrada neste trabalho, dos genes para IL-1 e IL-6 em células inflamatórias, sugere que esse bloqueio pode acontecer também em células

tumorais, as quais produzem estas citocinas como estímulo autócrino, para favorecimento do tumor.

COX-2 é uma enzima induzível e pode ser afetada por mitógenos, fatores de crescimento e hormônios, e é de grande importância na tumorigênese. COX-2 induz a produção de VEGF, contribuindo para a angiogênese, bem como aumenta as metaloproteinases, as quais melhoram a invasão de vasos tumorais e reduz a produção de citocinas anti-angiogênicas, como a IL-12. Também tem sido comprovado que COX-2 aumenta a resistência a apoptose (PANDURANGAN; ESA, 2013). Os inibidores COX-2 seletivos são melhores tolerados em doses terapêuticas, pois eles não inibem a COX-1. Esses inibidores COX-2 seletivos, tem ajudado a suprimir a transformação maligna e crescimento tumoral, por estimular a apoptose e inibir a produção de VEGF, inibindo a angiogênese (TOOMEY et al., 2009; MA et al., 2013). Nesse trabalho, foi possível demonstrar que apenas A2CN na concentração de 10 μM , foi capaz de reduzir a expressão de COX-2, em células RAW 264.7 estimuladas com LPS (figura 27). Neste caso a posição do grupo nitro no isômero influenciou na efetividade da molécula em inibir a expressão do gene da enzima.

Uma vez que se demonstrou recentemente, a ação de ROS mitocondrial (mtROS), como moléculas sinalizadoras para desencadear a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e TNF- α (BULUA et al., 2011), buscou-se demonstrar a ação dos AMBH, na produção destas citocinas inflamatórias em cultura de macrófagos Raw 264.7, estimuladas com LPS. Os dados obtidos pela técnica de ELISA mostraram que a produção de citocinas pelas células Raw 264.7 após estimulação com LPS, foi amplamente alterada. A liberação de IL-1 β e IL-6 foi completamente bloqueada após 22 h da adição de A2CN, A3CN ou A4CN, mesmo na concentração mais baixa de 2,5 μM ($p < 0,001$). Todavia, a citocina TNF- α não foi alterada por nenhuma das moléculas testadas. Esse resultado comprova um potente efeito anti-inflamatório *in vitro*, em concentrações subcitotóxicas. Sugere-se que a inibição da produção de IL-6 seja mediada pela inibição de IL-1 β .

Evidências diretas demonstram que a IL1- β tem importante função em mieloma múltiplo, pois quando liberada, esta citocina induz a produção de IL-6 por células do estroma da medula óssea e funciona como fator de crescimento autócrino para as células de mieloma (LUST et al., 2009; SETHI et al., 2012). IL1- β também

regula a proteína HIF-1 α , envolvendo uma via de sinalização inflamatória com NF- κ B e COX-2, culminando na regulação positiva de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), um potente fator angiogênico, necessário para metástase e crescimento tumoral (JUNG et al., 2003). IL-6 é outra citocina pró-inflamatória que tem sido envolvida na carcinogênese associada à inflamação (HONG et al., 2007; NAUGLER; KARIN, 2008). Esta citocina modula a expressão de genes envolvidos na proliferação, sobrevivência e angiogênese pela via de sinalização Janus-kinase (JAK)-STAT (LIN; KARIN, 2007).

Os dados do presente estudo demonstram pela primeira vez a atividade anti-inflamatória dos AMBH, A2CN, A3CN e A4CN, especialmente com bloqueio na liberação das citocinas IL-1 e IL-6, que contribuem para a progressão e crescimento dos tumores. A2CN mostrou ser a molécula mais eficaz na ação anti-inflamatória dentre os isômeros testados, pois esse aduto foi capaz de inibir também a expressão da enzima COX-2. Essa considerável atividade de A2CN é bastante promissora, pois contribui com a atividade anticâncer, inicialmente demonstrada neste trabalho, bem como corrobora com a potente atividade antiparasitária contra *Leishmania*, *Plasmodium* e *Trypanosoma*, extensamente relacionada na literatura.

A maioria dos nitrocompostos com ação antineoplásica (nitacrina, 1-(1,5-dicloropentano-3-il)-4-nitrobenzeno) e antiparasitária (metronidazol, tinidazol, secnidazol, benzinidazol e nifurtimox), dependem do processo de biorredução enzimática do grupo nitro, forte acceptor de elétrons, como provável mecanismo de ação. A passagem destas moléculas, geralmente ocorre por difusão passiva na membrana e o processo de biorredução gera grande quantidade de radicais livres de vida curta, que resultam na peroxidação de membranas biológicas e proteínas, além de causarem danos ao DNA (PAULA et al., 2009). O nimesulida é um exemplo de nitrocomposto, da classe dos derivados nitrobenzênicos, bem empregado na terapia anti-inflamatória e de ampla aplicação clínica. Sendo assim, a presença do grupo nitro nas moléculas testadas e sua posição na molécula contribuem para sua atividade citotóxica em células tumorais, bem como para sua atividade anti-inflamatória.

O emprego de ferramentas de modulação da estrutura dos nitrocompostos, como o bioisoterismo, entre outras, se apresenta extremamente promissor e possibilita o planejamento de moléculas com melhor perfil farmacológico.

Acerca da discussão das amplas atividades dos AMBH, A2CN, A3CN e A4CN, provou-se nossa hipótese de que estas moléculas foram potencialmente citotóxicas, para várias linhagens tumorais humanas e murinas. E que o isômero A2CN afirma sua atividade anticâncer, em células tumorais K562, pela desregulação do ciclo celular: a) dependente de ciclina; b) dependente de p53; c) dependente de canais Kv (figura 31). Essa molécula apresenta-se extremamente promissora no combate a uma doença potencialmente mortal como o câncer, podendo ser testada para o uso como uma droga antitumoral clássica ou para melhorar a capacidade imune do paciente, devido a seu potente efeito imunomodulador, com inibição de citocinas IL-1 e IL-6, bem como a enzima COX-2 (figura 32).

Mecanismo de ação proposto para A2CN em células K562

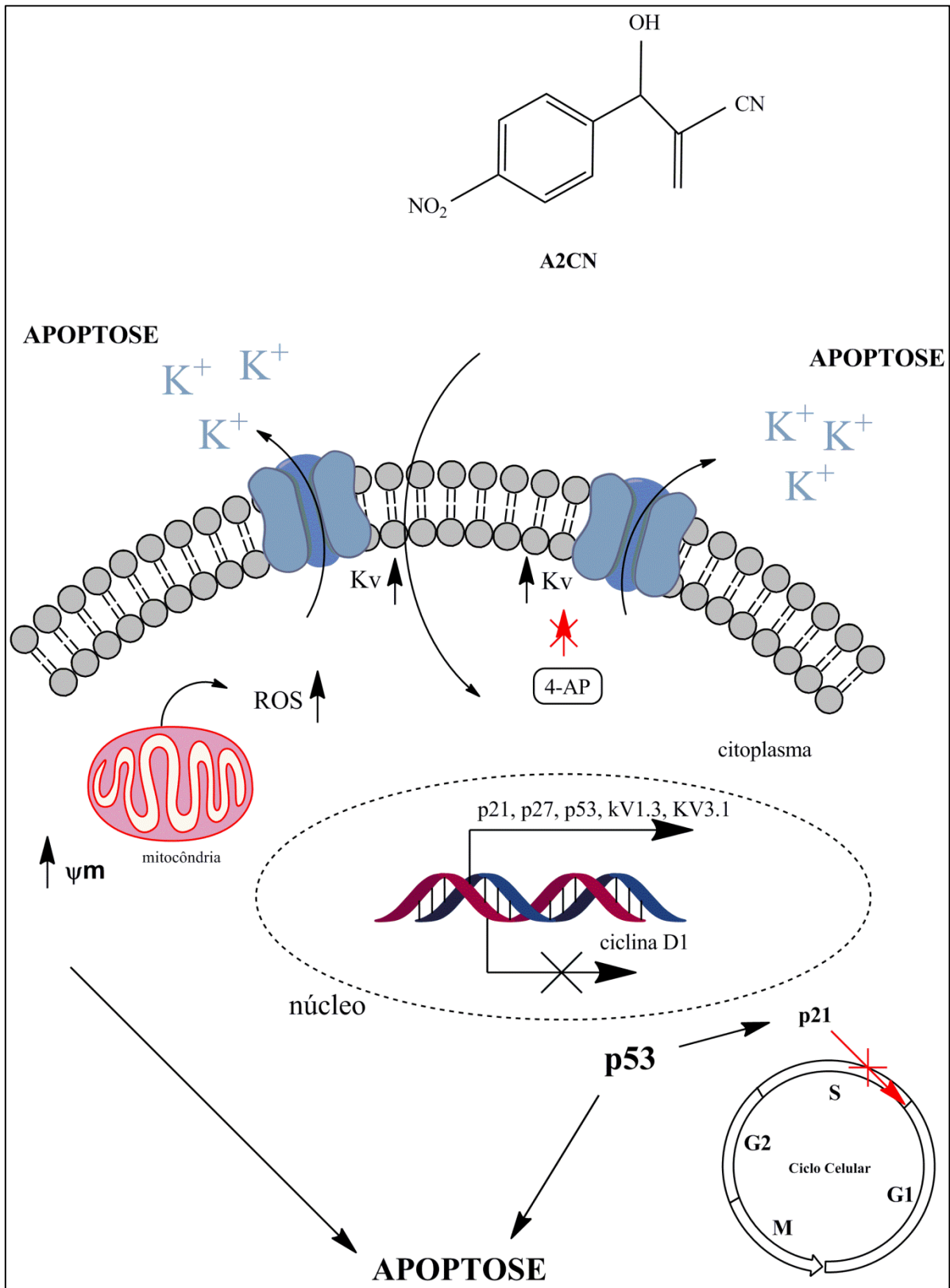


Figura 31: Mecanismo de ação de A2CN, na linhagem de leucemia mielóide crônica K562.

MECANISMO DE AÇÃO DE AMBH EM CÉLULAS RAW 264.7

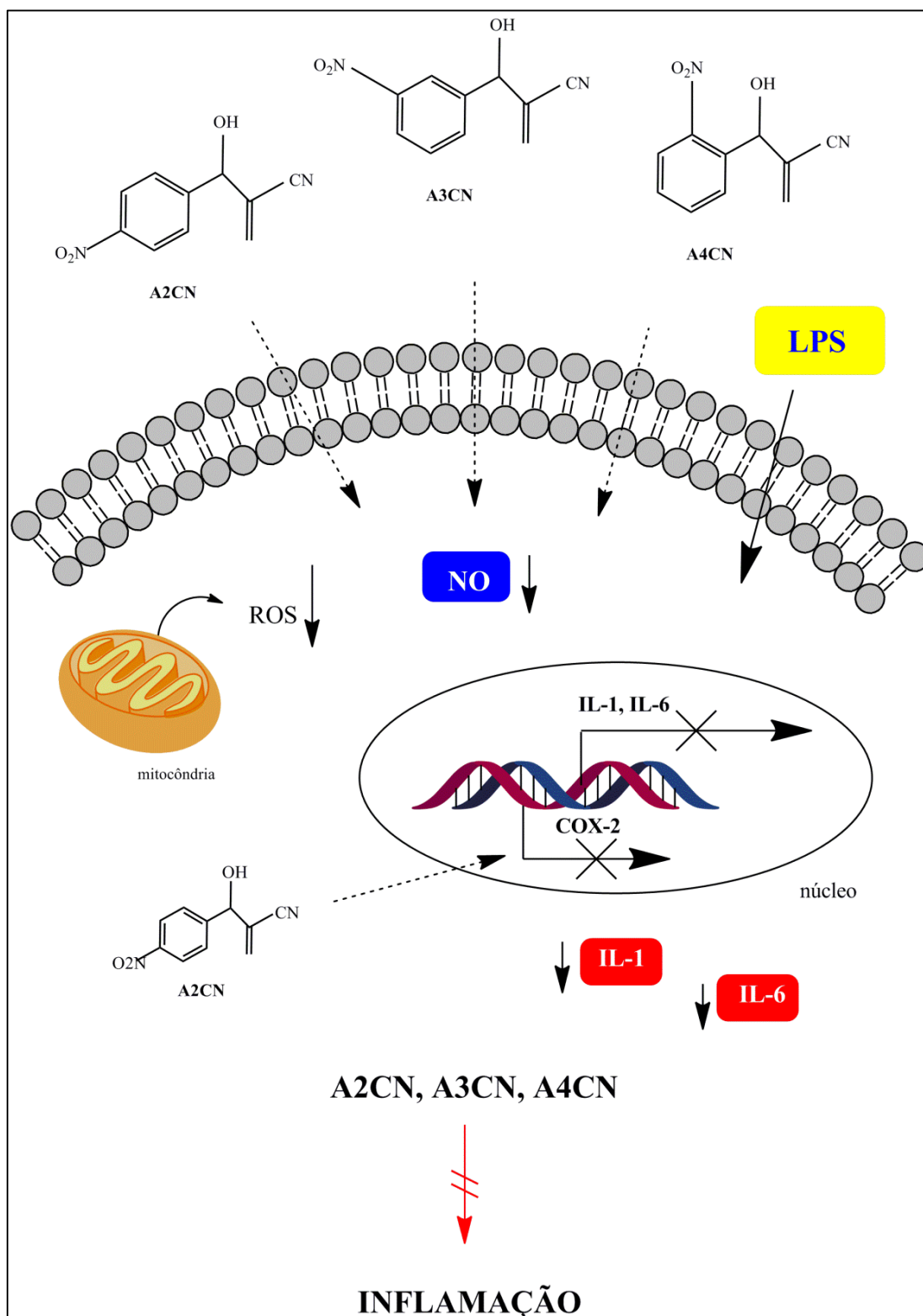


Figura 32: Mecanismo de ação proposto para A2CN, A3CN e A4CN nas células Raw 264.7 estimuladas com LPS.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- ❖ Os AMBH apresentaram citotoxicidade sobre as células tumorais humanas e murinas.
- ❖ Na linhagem K562, o aduto A2CN induziu parada no ciclo celular, nas fases G1 e S, com aumento na expressão do gene p53, p21 e p27 e redução na expressão do gene da ciclina D1;
- ❖ A2CN causou apoptose nas células K562 envolvendo a via intrínseca, promovendo a dissipação do potencial transmembrânico mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio.
- ❖ O aumento da morte celular por apoptose induzido por A2CN está relacionado com o aumento na expressão dos canais Kv1.3 e Kv3.1 nas células K562, bem como ativação das correntes para K⁺ e consequente efluxo de K⁺.
- ❖ Os AMBH, A2CN, A3CN e A4CN exibiram potente atividade anti-inflamatória em células Raw 264.7 estimuladas com LPS, com redução dos níveis de NO, ROS, inibição da expressão dos genes para IL-1 β e IL-6, bem como inibiram as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6.
- ❖ Apenas A2CN foi capaz de bloquear a expressão do gene para COX-2.
- ❖ A2CN pode ser considerado um possível protótipo de molécula anticâncer e anti-inflamatória.

v

PERSPECTIVAS

8. Perspectivas

- ❖ Investigar em quais receptores A2CN, A3CN e A4CN se ligam;
- ❖ Estudar a atividade antitumoral utilizando modelos *in vivo*;
- ❖ Pesquisar a atividade anti-inflamatória em modelos *in vivo*;
- ❖ Determinar a toxicidade aguda e crônica *in vivo*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABBAS, T., DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nat Rev Cancer**, v.9, p.400–14, 2009.

AGGARWAL, B. B., SHISHODIA, S., SANDUR, S. K., PANDEY, M. K. and SETHI, G. Inflammation and cancer: how hot is the link? **Biochem Pharmacol**, 72, 1605–1621, 2006.

AGGARWAL, B. B., VIJAYALEKSHMI, R. V. AND SUNG, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. **Clin. Cancer Res**, v.15, p. 425–430, 2009.

AGGARWAL, B. B.; DANDA, D.; GUPTA, S.; GEHLOT, P. Models for prevention and treatment of cancer: problems vs promises. **Biochem Pharmacol**, v. 78, n. 9, p.1083-1094, 2009.

ABUKHDEIR, A.M., PARK, B.H. p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. **Expert Rev Mol Med**, v.10, p.1-18, 2009.

ALLEM, E., ARCECI, R.J. targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. **Front. Cell dev. Biol.**, v. 3, p.16-22, 2015.

ANAND, P., KUNNUMAKKARA, A.B., SUNDARAM, C., HARIKUMAR, K.B., THARAKAN, S.T., LAI, O.S., SUNG, B., AGGARWAL, B.B. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes, **Pharm Res**, v.25, p. 2097-2116, 2008.

ANDERSSON, L.C., NILSSON, K. GAHMBERG, C.G. K562—a human erythroleukemic cell line. **Int J Can**, v.23, p.143–147, 1979.

ARCANGELI, A., PILLOZZI, S., BECCHETTI, A. Targeting ion channels in leukemias: a new challenge for treatment. **Curr Med Chem**, v. 19, p.683-693, 2009.

ASHKENAZI, A., DIXIT, V.M. Death receptors: signaling and modulation, **Science**, v.281, p.1305–1308, 1998.

BAGULEY, B. C. Multiple drug resistance mechanisms in cancer. **Mol Biotechnol.**, v. 46, n. 3, p. 308 - 316, 2010.

BALKWILL, F., MANTOVANI, A. "Inflammation and cancer: back to Virchow?" **The Lancet**, v.357,p. 539–545, 2001.

BALKWILL, F.R., MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation: Common themes and therapeutic opportunities. **Sem Cancer Bio**, v. 22, p.33-40, 2012.

BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 9, p.361–371, 2009.

BARBOSA, T.P., JUNIOR, C.G.L., SILVA, F.P.L., LOPES, H.M., FIGUEIREDO, L.R.F., SOUZA, S.C.O., BATISTA, G.N., SILVA, T.G., SILVA, T.M.S., OLIVEIRA, M.R., VASCONCELLOS, M.L.A.A. Improved synthesis of seven aromatic Baylis-Hillman adducts (BHA): Evaluation against *Artemia salina* Leach. and *Leishmania chagasi*, **Eur J Med Chem**, v. 44, p. 1726-17-30, 2009.

BASAVAIAH, D., REDDY, B. S., BADSARA, S. S. Recent contributions from the Baylis-Hillman reaction to organic chemistry. **Chem Rev**, v.110, p. 5447-5674, 2010.

BAYLIS, A.B., HILLMAN, M.E.D. Patente alemã 2155113, **Chem Abstracts**, v.77, p.34174, 1972.

BECKERMANR, P. Transcriptional regulation by p53. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v.2, A000935, 2010.

BERNARDI, P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition, **Physiol Rev**, v.79, p.1127–1155, 1999.

BIELANSKA, J., HERNANDEZ-LOSA, J., PEREZ VERDAGUER, M., MOLINE, T., SOMOZA, R., RAMON,Y.C.S., et al. Voltage-dependent potassium channels kv1.3 and Kv1.5 in human cancer. **Curr Cancer D Targ**, v.9, p.904–914, 2009.

BOCK, J., SZABÒ, I., JEKLE, A., GULBINS, E. Actinomycin D-induced apoptosis involves the potassium channel Kv1.3. **Biochem Biophys Res Commun**, v.295, p.526-531, 2002.

BOMFIM, Caio César Barbosa. **Avaliação do Potencial Antileucêmico de Adutos Aromáticos de Morita-Baylis-Hillman**. 2013. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2013.

BONNET, S., ARCHER, S.L., ALLALUNIS-TURNER, J., HAROMY, A., BEAILIEU, C., THOMPSON, R., LEE, C.T., LOPASCHUK, G.D., PUTTAAGUNTA, L., BONNET, S., HARRY, G., HASHIMOTO, K., PORTER, C.J., ANDRADE, M.A. THEBAUD, B., MICHELAKIS, E.D. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. **Canc Cell**, v.11, p.37-51, 2007.

BORTNER, C.D., CIDLOWSKI, J.A. Cell Shrinkage and monovalent cation fluxes. **Arch Biochem Biophys**, v. 46, p.176-188, 2007.

BORTNER CD, HUGHES FM JR. CIDLOWSKI JA. A Primary Role for K⁺ and Na⁺ Efflux in the Activation of Apoptosis. **J Biol Chem**, v.272, p.32436–32442, 1997.

BULUA, A.C., SIMON, A., MADDIPATI, R., PELLETIER, M., PARK, H., KIM, K.-Y., SACK, M.N., KASTNER, D.L., SIEGEL, R.M. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). **J Exp Med**, v.208, p.519–533. 2011.

CATALANI, S., CARBONARO, V., PALMA, F., ARSHAKYAN, M., GALATI, R., NUVOLO, B., BATTISTELLI, S., CANESTRARI, F., BENEDETTI, S. Metabolism modifications and apoptosis induction after Cellfood™ administration to leukemia cell lines. **J Exp Clin Canc Res**, v.32, p.63-71, 2013.

CAVALCANTI, JR., G.B., SCHEINER, M.A.M., MAGLUTA, E.P.S., VASCONCELOS, F.C., KLUMB, C.E., MAIA, R.C. p53 Flow Cytometry Evaluation in leukemias: Correlation to Factors Affecting Clinical Outcome. **Cytometry Part B (Clinical Cytometry)**, v.78B, p.253–259, 2010.

CAVALLO, F.; DE GIOVANNI, C.; NANNI, P.; FORNI, G.; LOLLINI, P. L. 2011: the immune hallmarks of cancer. **Cancer Immunol Immunother**, v. 60, n. 3, p. 319 - 326, 2011.

CHARI, R.V. Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. **Acc Chem Res**, v. 41, n. 1, p. 98 -107, 2008.

CHEN, T., STEPHENS, P.A., MIDDLETON, F.K., CURTIN, N. Targeting the S and G2 ponto de checagem to treat cancer. **Drug Discov Today**, v. 17, p.194-202, 2012.

CHEN, L., GILKES, D.M., PAN, Y., LANE, W.S., CHEN, J. ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage, **EMBO J.** v.24, p.3411–3422, 2005.

CHEN, T., STEPHENS, P.A., MIDDLETON, F.K., CURTIN, N.J. Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. **Drug Discov Today**, v.17, p.194-202, 2012

CIAVARELLA, S., MILANO, A., DAMMACCO, F., SILVESTRIS, F. Targeted therapies in cancer. **BioDrugs**, v. 24, n. 2, p. 77 - 88, 2010.

COLOTTA, F., ALLAVENA, P., SICA, A., GARLANDA, C., MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v.30, p.1073–1081, 2009.

COSSARIZZA, A.; FERRARESI, R.; TROIANO, L.; ROAT, E.; GIBELLINI, L.; BERTONCELLI, L.; NASI, M.; PINTI, M. Simultaneous analysis of reactive oxygen species and reduced glutathione content in living cells by polychromatic flow cytometry. **Nat Protoc.**, v. 4, n. 12, p. 1790 - 1797, 2009.

COWARD, J., KULBE, H., CHAKRAVARTY, P. et al., Interleukin-6 as a therapeutic target in human ovarian cancer, **Clin Cancer Res**, v. 17, pp. 6083–6096, 2011.

CRAIG, A. et al. Allosteric effects mediate CHK2 phosphorylation of the p53 transactivation domain. **EMBO Rep.**, v. 4, p. 787-792, 2003.

CZYZ, A., SZEWCZYK, A., NALECZ, M.J., WOJTCZAK, L. The role of mitochondrial potassium fluxes in controlling the protonmotive force in energized mitochondria, **Biochem Biophys Res Commun**, v. 210, p.98–104, 1995.

DADWAL, M.; MOHAN, R.; PANDA, D.; MOBIN, S. N.; NAMBOOTHIRI, I. N. N. The Morita–Baylis–Hillman adducts of *p*-aryl nitroethylenes with other activated alkenes: synthesis and anticancer activity studies, *CHEMICAL COMMUNICATION*, 3, 338-340, 2006. DE SOUZA, R.O.M.A., VASCONCELLOS, M.L.A.A. **Syn Commun**, v.33, p.1383-1399, 2003.

DUFFY, M.J., SYNNOTT, N.C., MCGOWAN, P.M., CROWN, J., O'CONNOR, D., GALLAGHER, W.M. p53 as a target for the treatment of cancer. **Cancer Treat Rev.**, v.40, p.1153-1160, 2014.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathologic**, v. 35, p.495-516, 2007.

ENGİN, H., BALTALI, E., GÜLER, N., et al: Expression of PTEN, cyclin D1, P27/KIP1 in invasive ductal carcinomas of the breast and correlation with clinicopathological parameters. **Bull Cancer**, v.93, p.E21-E26, 2006.

FAHEINA-MARTINS, G.V.; SILVEIRA, A.L.; CAVALCANTI, B.C.; RAMOS, M.V.; MORAES, O.M.; PESSOA, C.; ARAÚJO, D.A.M. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxicol in Vitro**, v.26, p.1161-1169, 2012.

FANG, M., LEE, S.Y., PARK, S.M., CHOI, K.C., LEE, Y.J., CHO, H.K., CHO, S.W., WHANG, W.K., LEE, J.C. Anti-inflammatory potential of *Phaseolus calcaratus* Roxburgh, an oriental medicine, on LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **J Pharm Pharmacol**, v.63, p.120–128, 2011.

FERRAJOLI, A., KEATING, M. J., MANSHOURI, T., GILES, F. J., DEY, A., ESTROV, Z., KOLLER, C. A., KURZROCK, R., THOMAS, D. A., FADERL, S. et al. The clinical significance of tumor necrosis factor- α plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 100, p.1215–1219, 2002.

FOSTER, I. Cancer: a cell cycle defect. **Radiography**, v.14, p.144-149, 2008.

FOSTER, D.A., YELLEN, P., XU, L., SAQCENA, M. Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Ponto de checagem(s). **Monographs**, v.1, p.1124-1131, 2011.

FRASER, S.P., OZERLAT-GUNDUZ, I., BRACKENBURY, W.J., FITZGERALD, E.M., CAMPBELL, T.M., COOMBES, R.C., DJAMGOZ, M.B.A. Regulation of voltage-gated sodium channel expression in cancer: hormones, growth factors and auto-regulation. **Phil Trans R Soc B**, v.369, 2014.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Modulation of apoptosis signaling for cancer therapy. **Arch. Immunol Ther Exp**, v. 54, p. 173 – 175, 2006.

FULDA, S. Tumor resistance to apoptosis. **Int J Cancer**, v. 124, p. 511 - 515, 2009.

FULDA, S., GORMAN, A.M., HORI, O., SAMALI, A. Cellular stress responses: cell survival and cell death, **Int J Cell Biol**, 2010.

GARLID, K.D., PAUCEK, P. Mitochondrial potassium transport: the K⁺ cycle, **Biochim Biophys Acta**, v.1606, p. 23–41, 2003.

GARLID, K.D., PAUCEK, P., YAROV-YAROVOY, V., SUN, X., SCHINDLER, P.A. The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers, **J Biol Chem**, v.271, p.8796–8799, 1996.

GARRETT, M.D., COLLINS, I. Anticancer therapy with protein tyrosine kinase inhibitors: what, where and when? **Trends Pharmacol Sci**, v. 32, p.308-316, 2011.

GILLE, H., DOWNWARD, J. Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression. **J Biol Chem**, v. 274, p.22033-40,1999.

GRIVENNIKOV, S.I., GRETEN, F.R., KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v.140, p.883-899, 2010.

GULBINS, E., SASSI, N., GRASSMÈ, H., ZORATTI, M., SZABÒ, I. Role of Kv1.3 mitochondrial potassium channel in apoptotic signaling in lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 1251-1259, 2010.

GULTMAN, G.A. et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. **Pharmacol Rev**, v. 57, p.473-508, 2005.

GYRD-HANSEN, M.; MEIER, P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. **Nat Rev Cancer**, v.10, n. 8, 561 - 574, 2010.

HAMILL, O. P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B., SIGWORTH, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. **Pflügers Archiv**, v. 391, p. 85-100, 1981.

HAN, X.; XI, L.; WANG, H., HUANG, X.; MA, X., HAN, Z., WU, P., MA, X., LU, Y., WANG, G., ZHOU, J., MA, D. The potassium ion channel NS1619 inhibits proliferation and induces apoptosis in A2780 ovarian cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 375, p. 205-209, 2008.

HANAHAN, D., WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v.144, p.646-674, 2011.

HAO, Q., CHO, W.C. Battle Against Cancer: An Everlasting Saga of p53. **Int J Mol Sci**, v.15, p. 22109-22127, 2014.

HARRIS, T. J.; MCCORMICK, F. The molecular pathology of cancer. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 7, n. 5, p. 251 - 265, 2010.

HARTWELL, L.H., CULOTTI, J., PRINGLE, J.R., REID, B.J. Genetic control of the cell division cycle in yeast. **Science**. v. 183, p.46-51, 1974;

HEINRICH, E.L.; WELTY, L.A.Y.; BANNER, L.R. OPPENHEIMER, S.B. Direct targeting of cancer cells: A multiparameter approach. **Acta Histochemica**, v.107, p.335-344, 2005.

HOLMUHAMEDOV, E., LEWIS, L. , BIENENGRAEBER, M., HOLMUHAMEDOVA, M., JAHANGIR, A., TERZIC, A. Suppression of human tumor cell proliferation through mitochondrial targeting, **FASEB J**, v.16, p.1010–1016, 2002.

HONG, D. S., ANGELO, L. S. AND KURZROCK, R. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. **Cancer**, v.110, p. 1911–1928, 2007.

HUSSAIN, S.P., HOFSETH, L.J., HARRIS, C.C. Radical causes of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.3, p.276-285, 2003.

HUANG, S., HEIKAL, A.A., WEBB, W.W. Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein. **Biophys J**, v.82, p.2811-2825, 2002.

INDRAN, I.R., TUFO, G., PERVAIZ, S., BRENNER, C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1807, p.735–745, 2011.

Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas 2012: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

IOACHIM, E. Expression patterns of cyclins D1, E and cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf1/cip1, p27kip1 in colorectal carcinoma: correlation with other cell cycle regulators (pRb, p53 and Ki-67 and PCNA) and clinicopathological features. **Int J Clin Pract**, v.62, p.1736-1743, 2008.

JAYAT, C., RATINAUD, M.H. Cell cycle analysis by flow cytometry: principles and applications. **Biol Cell**, v.78, p.15-25, 1993.

JONAS, E.A. Molecular participants in mitochondrial cell death channel formation during neuronal ischemia. **Exp Neurol**, v. 218, p.203-212, 2009.

JOZA, N., SUSIN, S.A., DAUGAS, E., STANFORD, W.L., CHO, S.K., LI, C.Y., SASAKI, T., ELIA, A.J., CHENG, H.Y., RAVAGNAN, L., FERRI, K.F., ZAMZAMI, N., WAKEHAM, A., HAKEM, R., YOSHIDA, H., KONG, Y.Y., MAK, T.W., ZUNIGA-PFLUCKER, J.C., KROEMER, G., PENNINGER, J.M. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death, **Nature**, v.410, p.549–554, 2001.

JUNG, Y. J., ISAACS, J. S., LEE, S., TREPEL, J. AND NECKERS, L. IL-1 β -mediated up-regulation of HIF-1 α via an NF κ B/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. **FASEB J**, v.17, p.2115–2117, 2003.

JUNIOR, C. G. L.; DE ASSIS, P. A. C.; SILVA, F. P. L.; SOUSA, S. C. O.; DE ANDRADE, N. G.; BARBOSA, T. P.; NERÍS, P. L. N.; SEGUNDO, L. V. G.; ANJOS, I. C.; CARVALHO, G. A. U.; ROCHA, G. B.; OLIVEIRA, M. R.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Efficient synthesis of 16 aromatic Morita–Baylis– Hillman adducts: Biological evaluation on *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*, **Bioorg Chem**, v.38, p. 279-284, 2010.

KASTAN, M.B.; LIM, D.-S. The many substrates and functions of ATM. **Mol. Cell Biol.**, v.1, p.179-186, 2000.

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

KERR, J.F., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer** v.26, p.239–57, 1972.

KIM, H.; YONN, S.C.; LEE, T.Y.; JEONG, D. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. **Toxicology Letters**, v. 184, p.13-17, 2009.

KOFF, J.L., RAMACHANDIRAN, S., BERNAL-MIZRACHI, L. A Time to Kill: Targeting Apoptosis in Cancer. **Int. J. Mol. Sci.**, v.16, p.2942-2955, 2015.

KOHN, L.K., PAVAM, C.H., VERONENSE, D., COELHO, F., DE CARVALHO, J.E., ALMEIDA W.P. Antiproliferative effect of Baylis— Hillman adducts and a new phthalide derivative on human tumor cell lines. **Eur. J. Med. Chem.**, v.41, p.738-744, 2006.

KRAUSE, M.S., BITTENCOURT, A., BITTENCOURT, P.I.H. et al. Physiological concentrations of interleukin-6 directly promote insulin secretion, signal transduction, nitric oxide release, and redox status in a clonal pancreatic B-cell line and mouse islets. **J Endocrinol**, v.214, p. 301-311, 2012.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; EL-DEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D.R.; et al. Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death **Cell Death Differ** 2009. v.16, p.3–11, 2008.

KUNDU, M.K., SUNDAR, N., KUMAR, S.K., BHAT, S.V., BISWAS, S., VALECHA, N. Antimalarial activity of 3-hydroxyalkyl-2-methylene-propionic acid derivatives. **Bioorg Med Chem Lett**, v.9, p.731-736, 1999.

KURZROCK, R., VOORHEES, P.M., CASPER, C. et al., A phase I, open-label study of siltuximab, an anti-IL-6 monoclonal antibody, in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma, multiple myeloma, or Castleman disease, **Clin Canc Res**, vol. 19, p. 3659–3670, 2013.

LAI, D., VISSER-GRIEVE, S., YANG, X. Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response. **Biosci Rep**, v.32, p.361–74, 2012.

LANDSKRON, G., FUENTE, M.D.L., THUWAJIT, P., THUWAJIT, C., HERMOSO, M.A. Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. **J Immunol Res**. ID 149185, 19 pages, 2014.

LANE, D.P. p53, guardian of the genome. **Nature** v.358, p.15–16, 1992.

LANG, F., FÖLLER, M., LANG, K.S., LANG, P.A., RITTER, M., GULBINS, E., VERENINO, A., HUBER, S.M. Ion Channel in Cell Proliferation and Apoptosis Cell Death. **J Memb Biol**. v. 205, p.147-157, 2005.

LANG, F., STOURNARAS, C. Ion channels in cancer: future and clinical potential. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**, v. 369, p.1-7, 2014.

LANSU, K., GENTILE, S. Potassium channel activation inhibits proliferation of breast cancer cells by activating a senescence program. **Cell Death and Disease**, v.4, p.1-9, 2013.

LEE, Y.S., SAYEED, M.M., WURSTER, R.D. In vitro antitumor activity of cromakalim in human brain tumor cells, **Pharmacol**, v.49, p.69–74, 1994.

LEE, E. Y.; MULLER, W. J. Oncogenes and tumor suppressor genes. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 2, n. 10, p. 1 - 19, 2010.

LEITE, J.C.A., JUNIOR C.G.L., SILVA, F.P.L., SOUSA, S.C.O., VASCONCELLOS, M.L.A.A., MARQUES-SANTOS, L.F. Antimitotic Activity on Sea Urchin Embryonic Cells of Seven Antiparasitic Morita-Baylis-Hillman Adducts: A Potential New Class of Anticancer Drugs. **Med Chem**, v.8, p.1003-1011, 2012.

LEVINE A.J., OREN, M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. **Nat Rev Cancer**, v. 9, p.749–58, 2009.

LI, Q., FU, G.-B., ZHENG, J.-T., et al. NADPH oxidase subunit p22(phox)-mediated reactive oxygen species contribute to angiogenesis and tumor growth through AKT and ERK1/2 signaling pathways in prostate cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1833, p.3375-3385, 2013.

LIMA-JÚNIOR, CLAUDIO GABRIEL. **Investigação da reação de Morita Baylis-Hillman em reator de micro-ondas usando aldeídos aromáticos e isatina como eletrófilos: avaliação da atividade citotóxica em linhagem de células de leucemia promielocítica humanas (HL-60)**. 245 fl. (doutorado em Química) - UFPB/CCEN- João Pessoa, 2012.

LIMA-JUN IOR, C.G., VASCONCELLOS, M.L.A.A. Morita–Baylis–Hillman adducts: Biological activities and potentialities to the discovery of new cheaper drugs. **Bioorg Med Chem**, v.20, p.3954–3971, 2012.

LIN, W. W., KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **J Clin Invest**, v. 117, p.1175–1183, 2007.

LIU, Y., PETERSON, D.A., KIMURA, H., SCHUVERT, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-Dimethylazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, p 581-592, 1997.

LIU, J.H, YEN CC, LIN YC, GAU JP, YANG MH, CHAO TC, HSIAO LT, WANG WS, TSAI YC, CHEN PM. Overexpression of cyclin D1 in accelerated-phase chronic myeloid leukemia. **Leuk Lymphoma**, v.45, p.2419-25, 2011.

LOZZIO, C.B., LOZZIO, B.B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. **Blood**, v.45, p.321–334, 1975.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J.Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. **Cell**,v. 136, n. 5, p. 823 - 837, 2009.

LUST, J.A., LACY, M.Q., ZELDENRUST, S.R., DISPENZIERI, A., GERTZ, M.A., WITZIG, T.E., KUMAR, S., HAYMAN, S.R., RUSSEL, S.J., BUADI, F.K. et al. Induction of a chronic disease state in patients with smoldering or indolent multiple myeloma by targeting interleukin1 β -induced interleukin 6 production and the myeloma proliferative component. **Mayo Clin Proc**, v.84, p.114-122, 2009.

MA, J.X., SUN, Y.L., WANG, Y.Q., et al. Trptolide induces apoptosis and inhibits the growth and angiogenesis of human pancreatic cancer cells by downregulating COX-2 and VEGF. **Oncol Res**, v.20, p.359-68, 2013.

MANTOVANI, A., ALLAVENA, P., SICA, A. AND BALKWILL, F.. Cancer-related inflammation. **Nature**, v.454, p.436–444, 2008.

MARNETT, L. J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, v.21, p.361–370, 2000.

MASSAGUE, J. G1 cell-cycle control and cancer. **Nature**. v.432, p. 298-306, 2004.

MOFFITT, K.L., MARTIN, S.L., WALKER, B. From sentencing to execution - the processes of apoptosis. **J Pharm Pharmacol**, v. 62, p. 547 - 562, 2010.

MOHAN, R., RASTOGI, N., NAMBOOTHIRI, I. N. N., MOBIN, S. N., PANDA, D. Synthesis and evaluation of α -hydroxymethylated conjugated nitroalkenes for their anticancer activity: Inhibition of cell proliferation by targeting microtubules. **Bioorg Med Chem**, v.14, p. 8073-8085, 2006.

MOLL, U.M., WOLFF, S., SPEIDEL, D., DEPPERT, W. Transcription-independent proapoptotic functions of p53, **Curr Opin Cell Biol**, v.17, p.631–636, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Meth**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAIK, E., DIXIT, V.M. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. **J Exp Med**, v. 208, p.417-420, 2011.

NAUGLER, W. E., KARIN, M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. **Trends Mol Med**, v.14, p.109–119, 2008.

NAKAHIRA, K., HASPEL, J.A., RATHINAM, V.A.K., LEE, S.-J., DOLINAY, T., LAM, H.C., ENGLERT, J.A., RABINOVITCH, M., CERNADAS, M., KIM, H.P., FITZGERALD, K.A., RYTER, S.W., CHOI, A.M. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. **Nat Immunol**, v.12, p.222–230, 2011.

NEGRINI, S.; GORGOULIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. Genomic instability - an evolving hallmark of cancer. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 3, p. 220 - 228, 2010.

NORBURY, C., NURSE, P. Animal cell cycles and their control. **Annu. Rev. Biochem.** v.61, p.441–470, 1992.

OLA, M. S.; NAWAZ, M.; AHSAN, H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. **Mol Cell Biochem.**, v.351, p. 41-58, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Cancer**, ficha, nº 297, Fevereiro de 2015.

O'ROURKE, B. Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. **Circ Res** V.94, p.420-432, 2004.

ORRENIUS, S., GOGVADZE, V., ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.47, p.143–183, 2007.

PAL, S., BHATTACHARJEE, A., ALI, A., MANDAL, N.C., MANDAL, S., PAL, M. Chronic inflammation and cancer: potential chemoprevention through nuclear factor kappa B and p53 mutual antagonism. **J Inflamm**, v.11, p.3-28, 2014.

PALME, D., MISOIC, M., SCHMID, E., KLUMPP, D., SALIH, H., RUDNER, J., HUBER, S.M. Kv3.4 potassium channel-mediated electrosignaling controls cell cycle and survival of irradiated leukemia cells. **Signaling and Cell Physiology**, v. 465, p.1209-1221, 2013.

PAN, M. H.; CHIOU, Y. S.; CHENG, A. C.; BAI, N.; LO, C. Y.; TAN, D.; HO, C. T. Involvement of MAPK, Bcl-2 family, cytochrome c, and caspases in induction

of apoptosis by 1,6-O,O-diacetylbritannilactone in human leukemia cells. **Mol Nutr Food Res.**, v. 51, p. 229 - 238, 2007.

PANDURANGAN, A.K, ESA, N.M. Dietary Non-nutritive Factors in Targeting of Regulatory Molecules in Colorectal Cancer: An Update. **Asia Pac J Canc Prev**, v.14, p.5543-5552, 2013.

PARDO, L.A., STÜHMER, W. the roles of K⁺ channels in cancer. **Nat Rev Canc**, 14, p.39-48, 2014.

PARDEE, A.B. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.71, p.1286-90, 1974.

PARIHAR, A.S., COGHLAN, M.J., GOPALAKRISHNAN, M., SHIEH, C.C., Effects of intermediate-conductance Ca²⁺-activated k⁺ channel modulators on human prostate cancer cell proliferation. **Eur J Pharmacol**, v.471, p.157-164, 2003.

PATHANIA, D., MILLARD, M., NE'AMATI, N. Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cancer cell metabolism, **Adv Drug Deliv Rev**, v.61, p.1250–1275, 2009.

PAULA, F.R., SERRANO, S.H.P., TAVARES, L.C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Quim Nova**, v.32, p.1013-1020, 2009.

PERISANIDIS C, PERISANIDIS B, WRBA F, et al: Evaluation of immunohistochemical expression of p53, p21, p27, cyclin D1, and Ki67 in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v.41, p.40-46, 2012.

PESTELL, R.G. New Roles of Cyclin D1. **Am J Pathol**, v. 183, p.2-9, 2013

PFLAUM, J., SCHLOSSER, S., MÜLLER, M. p53 family and cellular stress responses in cancer. **Front Onc**, v. 4, p.1-15, 2014.

PLATI, J.; BUCUR, O.; KHOSRAVI-FAR, R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. **Integr Biol (Camb)**, v. 3, n. 4, p. 279- 296, 2011.

POLYAK, K., ET AL. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. **Cell**, v.78, P.59–66, 1994.

PORTT, L., NORMAN, G.; CLAPP, C.; GREENWOOD, M.; GREENWOOD, M. T. Anti-apoptosis and cell survival: a review. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 1, p. 238-59, 2011.

POUROVA, J., KOTTOVA, M., VOPRSALOVA, M., POUR, M. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. **Acta Physiol.**, v.198 p.15–35, 2010.

PRADELLI, L. A., BÉNÉTEAU, M., RICCI, J. E. Mitochondrial control of caspase-dependent and independent cell death. **Cell Mol Life Sci.**, v. 67, p. 1589 - 1597, 2010.

RAO, C.V., INDRAINE, C., SIMI, B., MANNING, P.T., CONNOR, J.R., REDDY, B.S. Chemopreventive properties of a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in colon carcinogenesis, administered alone or in combination with celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. **Canc Res**, v.62, p.165-170, 2002.

REMILLARD, C.V., YUAN, J.X. Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.286, p.L49-67, 2004.

RENAUDO, A., WATRY, V., CHASSOT, A.A., PONZIO, G., EHRENFELD, J., SORIANI, O. Inhibition of tumor cell proliferation by sigma ligands is associated with K⁺ Channel inhibition and p27kip1 accumulation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 31, p.1105-1114, 2004.

RUDER, E.H., LAIYEMO, A.O., GRAUBARD, B.I., et al. Nosteroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer risk in a large prospective cohort. **Am j Gastroenterol**, v. 106, p.1340-1350, 2011.

RUMJANEK, V.M., VIDAL, R.S., MAIA, R.C. Multidrug resistance in chronic myeloid leukaemia: how much can we learn from MDR–CML cell lines? **Biosci Rep**, v.33, p.875-888, 2013

RUSSO, A.; TERRASI, M.; AGNESE, V.; SANTINI, D.; BAZAN, V. Apoptosis: a relevant tool for anticancer therapy. **Ann Oncol.**, v. 17, n. 7, p. 115 - 123, 2006.

SAKAMOTO, S., KYPRIANOU, N. Targeting anoikis resistance in prostate cancer metastasis, **Mol Aspects Med**, v.31, P.205–214, 2010.

SALUSTIANO, E.J.S., NETTO, C.D., FERNANDES, R.F., DA SILVA, A.J.M., BACELAR, T.S., CASTRO, C.P., BUARQUE, C.D., MAIA, R.C., RUMJANEK, V.M., COSTA, P.R.R. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, α -lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. **Invest New Drugs**, v.28, p.139–144, 2010.

SANCAR, A., LINDSEY-BOLTZ, L.A., ÜNSAL-KAÇMAZ, K., LINN, S. MOLECULAR MECHANISMS OF MAMMALIAN DNA REPAIR AND THE DNA DAMAGE PUNTO DE CHECAGEMS. **Annu Rev Biochem**, v.73, p.39–85, 2004.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, C., GELBERT, L. M., LALLENA, M.J., DIOS, A. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 25, p. 3420–3435, 2015.

SANDES, J.M., BORGES, A.R., LIMA-JUNIOR, C.G., SILVA, F.P.L., CARVALHO, G.A.U., ROCHA, G.B., VASCONCELLOS, M.L.A.A., FIGUEIREDO, R.C.B.Q. 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanonitrile): A new highly active against epimastigote and trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorg chem**, v. 38, 190-195, 2010.

SANDES, J.M., FONTES, A., REGIS-DA-SILVA, C.G., BRELAZ DE CASTRO, M.C.A., LIMA-JUNIOR, C.G., SILVA, F.P.L., VASCONCELLOS, M.L.A.A., FIGUEIREDO, R.C.B.Q. Trypanosoma cruzi Cell Death Induced by the Morita-Baylis-Hillman Adduct 3-Hydroxy-2-Methylene-3-(4-Nitrophenylpropanenitrile). **PlosOne**, v. 9, p.1-9, 2014.

SANTARIUS, T.; SHIPLEY, J.; BREWER, D.; STRATTON, M. R.; COOPER, C. S.A census of amplified and overexpressed human cancer genes. **Nat Rev Canc**, v. 10, n. 1, p. 59 - 64, 2010.

SETHI, G., SHANMUGAM, M.K., RAMACHANDRAN, L., KUMAR, A.L., TERGAONKAR, V. Multifaceted link between cancer and inflammation. **Biosc Rep**, V.32, p.1-15, 2012.

SHERR, C.J. Cell cycle control and cancer. **Harvey Lect**, v.96, p.73-92. 2000-2001.

SHOSHAN-BARMATZ, V., ISRAELSON, A., BRDICZKA, D., SHEU, S.S. The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signaling, cell life and cell death. **Curr Pharm Des**, v.12, p.2249-2270, 2006.

SILVA, F.P.L., ASSIS, P.A.C., JUNIOR, C.G.L., ANDRADE, N.G., CUNHA, S.M.D., OLIVEIRA, M.R., VASCONCELLOS, M.L.A.A. Synthesis, evaluation against *Leishmania amazonensis* and cytotoxicity assays in macrophages of sixteen new congeners Morita-Baylis-Hillman adducts. **Eur J Med Chem**, v.46, p.4295-4301, 2011.

STOREY, N.M., GÓMEZ-ANGELATS, M., BORTNER, C.D., ARMSTRONG, D.L., CIDLOWSKI, J.A. Stimulation of Kv1.3 Potassium channels by Death Receptors during Apoptosis in Jurkat T Lymphocytes. **J Biologic Chem**, v. 278, p. 33319-33326, 2003.

STRAUB, C. S. Targeting IAPs as an approach to anti-cancer therapy. **Curr Top Med Chem**, v. 11, n. 3, p. 291 - 316, 2011.

STÜHMER, W., ALVES, F., HARTUNG, F., ZIENTKOWSKA, M., PARDO, L.A. Potassium channels as tumour markers. **FEBS Lett**, v. 580, p.2850-2, 2006.

SURYADINATA, R., SADOWSKI, M., SARCEVIC, B. Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. **Biosci Rep** v.30, p.243–255, 2010.

SZABÓ, I., BOCK, J., GRASSMÉ, H., SODDEMANN, M., WILKER, B., LANG, F., ZORATTI, G., GULBINS, E. Mitochondrial potassium channel Kv1.3 mediates Bax-induced apoptosis in lymphocytes. **PNAS**, v. 105, p. 14861-14866, 2008.

SZABÓ, I., ZORATTI, M., GULBINS, E. Contribution of voltage-gated potassium channels to the regulation of apoptosis. **FEBS Letters**, v.584, p.2049–2056, 2010.

TAKAHASHI, M., KITAHASHI, T., ISHIGAMORI, R. et al. "Increased expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in N-nitrosobis (2-oxopropyl)amine-induced hamster pancreatic carcinogenesis and prevention of cancer development by ONO-1714, an iNOS inhibitor", **Carcinogenesis**, v. 29, p.1608-1613, 2008.

THUN, M.J., HENLEY, S.J., PATRONO, C. Nonsteroidal antiinflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic pharmacologic, and clinical issues. **J Natl Cancer Instn**, v. 94, p.252-66, 2002.

TOOMEY, D.P., MURPHY, J.F., CONLON, K.C. Cox-2, VEGF and tumour angiogenesis. **Surgeon**, v.7, p.174-80, 2009.

TORRES, F., QUINTANA, J., DÍAZ, J. G., CARMONA, A. J., ESTÉVEZ, F. Trifolin acetate-induced cell death in human leukemia cells is dependent on caspase-6 and activates the MAPK pathway. **Apoptosis**, v. 13, n. 5, p. 716 - 728, 2008.

TURNER, K.L., SONTHEIMER, H. Cl⁻ and K⁺ channels and their role in primary brain tumour biology. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 369, p. 1-9, 2014.

VASCONCELLOS, M.L.A.A., SILVA, T.M.S., CAMARA, C.A., MARTINS, R.M., LACERDA, K.M., LOPES, H. M., PEREIRA, V. L. P., DE SOUZA, R.O.M.A., CRESPO, L.T.C. Baylis–Hillman adducts with molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata*. **Pest Manag Sci**, v.62, p.288-292, 2006.

VASCONCELLOS, M.L.A.A., DE SOUZA, R.O.M.A., PEREIRA, V.L.P., ROSSI-BERGMANN, B., MUZITANO, M.F. **Eur J Med Chem**, v. 42, p.99-102, 2007.

VENTURA, A., KIRSCH, D.G., MCLAUGHLIN, M.E., TUVESON, D.A., GRIMM, J., LINTAULT, L., NEWMAN, J., RECZEK, E.E., WEISSLEDER, R., JACKS, T. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. **Nature**, v.245, p. 661-665, 2007.

WAHL, G.M., CARR, A.M. The evolution of diverse biological responses to DNA damages: insights from yeast and p53. **Nature Cell Biol.**, v. 3, p. E277-E286, 2001.

WANG, Z. Roles of K⁺ channels in regulating tumor cell proliferation and apoptosis. **Pflugers Arch**, v. 448, p. 274-286, 2004.

WANG, L., LI, T., LU, L. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v.44, p.50095–5101, 2003.

WEINBERG, R.A. **pRb and control of the cell cycle clock**. In: The biology of cancer. New York: Garland Science, p.255-307, 2007.

WINTERBOURN, C.C., HAMPTON, M.B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling, **Free Radic Biol Med**, v.45, p.549–561, 2008.

WOLF, J. S., CHEN, Z., DONG, G., SUNWOO, J. B., BANCROFT, C. C., CAPO, D. E., YEH, N. T., MUKAIDA, N., VAN WAES, C. IL (interleukin)-1 α promotes nuclear factor- κ B and AP-1-induced IL-8 expression, cell survival, and proliferation in head and neck squamous cell carcinomas. **Clin Cancer Res**, v.7, p.1812–1820, 2001.

XAVIER, F.J.S., NETO, J.S.S., NÉRIS, P.L.N., OLIVEIRA, M.R., VALE, J.A., VASCONCELLOS, M.L.A.A. Kinetic resolution of leishmanicidal *meta* and *para* ($\pm$)-2-[Hydroxy(nitrophenyl)methyl]acrylonitrile catalyzed by CALB: *in vitro* evaluations of separated *meta* (R), (S) and (R/S) adducts. **J 7-12, Molec Cat B: Enzym**, v.108, p.7-12, 2014.

YANG, D., ELNER, S.G., BIAN, Z.-M., TILL, G.O., PETTY, H.R., ELNER, V.M. Pro-inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE cells. **Expl Eye Res**, v.85, p.462-472, 2007.

YU, S.P. Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. **Prog. Neurobiol.** v.70, 363–386, 2003.

ZAMARRON, B.F., CHEN, W. “Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression”. **Int J B Scie**, v.7, p.651-658, 2011.

ZHOU, R., YAZDI, A.S., MENU, P., TSCHOPP, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature**. v.469, p.221–225, 2011.