



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Bioquímica Médica

Indução de Apoptose pela LQB 118, um Novo Composto com
Estrutura Pterocarpanoquinona

Thiago de Sá Bacelar

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica,
Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Orientadora: Vivian Mary Dodd Barral Rumjanek

Rio de Janeiro
Setembro 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Thiago de Sá Bacelar

Indução de Apoptose pela LQB 118, um Novo Composto com Estrutura Pterocarpanoquinona

Aprovada em 17 de setembro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek (IBqM, UFRJ)

Prof. Dr. José Roberto Meyer Fernandes (IBqM, UFRJ)

Prof Dr. Rafael Linden (IBCCF, UFRJ)

Prof Dr Marcelo Einicker Lamas (IBCCF, UFRJ)

Prof. Dr. Julio Alberto Mignaco (IBqM, UFRJ)

Prof^a Dra Ana Lúcia Giannini (IB, UFRJ)

Agradecimentos

Agradeço acima de tudo ao meu Deus, por me guiar e me orientar, por fazer a sua vontade em minha vida, por me acalmar e me tranquilizar nos momentos difíceis. Agradeço a Ele por me ajudar a passar por mais uma etapa em minha vida.

À minha mãe, por fazer de tudo para dar o melhor para mim e para minha irmã. Agradeço por todas as lutas pelo que passou para nos fazer chegar onde estamos agora. Agradeço também por me ensinar a importância do saber, a fim de construir uma boa visão ética e moral na minha vida. Apesar de não falar muito, amo você demais!

Agradeço à minha avó que ajudou a me criar, me dando carinho, atenção e disciplina, estando sempre preocupada com minha saúde e minha segurança.

À minha irmã e amiga Luana, por me dar dicas de roupas quando precisava ir à algumas festas, por me apoiar e estar presente em minha vida e inclusive por arriscar a sua vida pensando que eu estivesse em perigo, obrigado minha irmãzinha "fashion"! Agradeço também ao meu sobrinho pelos momentos de diversão e de "irritação". Sem você a nossa vida seria um pouco menos alegre, te amo!

Agradeço à minha namorada Marina, uma menina especial que tem me acompanhado desde o final da minha graduação, me ajudando e me ensinando a ser melhor como pessoa, sabendo lidar com as minhas emoções. Garota essa que me ensinou a ser também uma pessoa mais flexível tanto de personalidade quanto de gosto, fazendo-me gostar inclusive de arquitetura e outras coisas que jamais pensei em gostar. Agradeço a minha namorada e futura esposa (quando o apartamento ficar pronto hehe) por tudo de bom que me trouxe nesses últimos anos. Você é especial, te amo demais!!!

Agradeço também a família da minha namorada, que me ajudaram muito, me acolheram muitas vezes em sua casa, tendo muita paciência comigo. Agradeço especialmente a Marilene, por ser tão simpática e carinhosa comigo, bom, a genética fala por si.

Agradeço aos meus tios e primos que estiveram presentes em minha vida, me apoiando e torcendo por mim, o que tenho certeza que ajudou a fazer com que eu chegasse até aqui.

Aos meus colegas de laboratório por me ajudarem nos momentos que precisei e aos que me atrapalharam também quando não precisava para falar de festas, bebidas e outros assuntos indiscutíveis no laboratório.

Agradeço aos meus amigos Moraes, Fábio, Mariana e Bruna que me ajudaram sempre em momentos difíceis, me deram grandes puxões de orelhas e fizeram parte de muitas das minhas alegrias.

Agradeço aos professores Paulo Ribeiro Costa e Alcides José Monteiro da Silva e ao doutor Chaquip Daher Netto pela conceção dos compostos e estando sempre prontos a me ajudar.

Agradeço aos membros da minha banca de mestrado por aceitarem dispor de tempo para avaliar a minha dissertação e ao meu revisor Júlio Alberto Mignaco por sua ajuda no último ano de mestrado.

Agradeço a minha chefe e orientadora Vivian Rumjanek, a qual me ensinou muito, mesmo antes de eu entrar para o laboratório, me mostrando que o pesquisador não precisa se restringir ao ambiente do laboratório. Pessoa a qual mesmo divergindo sobre trabalho vez ou outra, é uma pessoa que eu admiro muito.

Agradeço também à Doutora Otília, pelos doces feitos nas festas e pela simpatia e carinho com que trata a todos dentro do laboratório, melhorando muitas vezes o nosso humor, fora a ajuda que nos dá em nosso trabalho quando precisamos.

Resumo

As leucemias são caracterizadas pelo acúmulo de células anormais na medula óssea. O tratamento dessa doença consiste principalmente de ciclos de quimioterapia, os quais podem causar a seleção e expansão de células resistentes. O fenômeno de resistência a múltiplas drogas (MDR) é a principal causa de falhas no tratamento do cancer. Ele compreende fatores como superexpressão de proteínas anti-apoptóticas, mutações em P53, extrusão de quimioterápicos pelos transportadores ABC, entre outros. Novos compostos estão sendo sintetizados a fim de superar o fenótipo MDR e o objetivo desse trabalho foi analisar o efeito de um desses compostos em linhagens leucêmicas, além de entender seu mecanismo morte. Esse composto denominado LQB 118 possui parte da estrutura pterocarpano e parte da estrutura quinona. Pterocarpanos são compostos encontrados em plantas onde atuam na defesa contra patógenos externos e quinonas são largamente encontradas na natureza onde atuam na respiração celular e coagulação. As linhagens utilizadas foram cultivadas em meio RPMI com 10% de soro. Células Mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas de doadores saudáveis, separadas por gradiente de ficoll e ativadas com adição de fitohemaglutinina (PHA). Para o ensaio de viabilidade as células foram incubadas em diferentes concentrações do composto e mensuradas pelo método de MTT em 72h. Para os ensaios de apoptose, de mudança no potencial de membrana mitocondrial (MMP) e de ativação de caspase-12 ou -9 as células foram incubadas com o composto por 24, 48 e 72h. Para os ensaios de cálcio intracelular, as células foram pré-incubadas com Fluo3-AM e depois tratadas com 3 ou 8 μ M de LQB 118. As células também foram incubadas com anti-ABCB1 para detecção dessa proteína MDR. O composto testado mostrou valores de Ce50 em torno de 3 μ M contra leucemias, provocando apoptose, alterações no MMP e ativação de caspase-12 e -9, além de inibir a expressão de ABCB1 em 72h. O composto aumentou cálcio citoplasmático e esse aumento pode ser revertido com o uso de EDTA. De acordo com os dados, esse novo composto mostrou efeito citotóxico em linhagens de leucemia humana, sendo pouco tóxico contra células normais (PBMC). O composto provocou apoptose nas linhagens testadas sendo seu efeito mais precoce em K562. Esse composto também induziu morte celular por vias distintas em cada linhagem celular, induzindo apoptose pela via intrínseca em K562 e por estresse de retículo endoplasmático em Jurkat. Esses dados sugerem que o composto poderia estar ativando canais de cálcio ou inibindo bombas de cálcio na célula e que os efeitos encontrados nessas células seriam pelo aumento de cálcio. Os resultados em leucemia em conjunto com a baixa toxicidade contra PBMC ativados, coloca esse composto como um bom candidato para o tratamento de leucemias.

Abstract

Leukemia are characterized by the accumulation of the abnormal cells in the bone marrow. The treatment of this disease is by cycles of chemotherapy, which may cause the selection and expansion of resistant cells. The phenomenon of multidrug resistance (MDR) is the main cause of the failure in the cancer treatment. It includes factors such as overexpression of antiapoptotic proteins, p53 mutations, extrusion of chemotherapeutics by the ABC transporters, among others. New compounds are being synthesized in order to overcome the MDR phenotype and the objective of this work was to analyze the effect of one of these compounds on leukemic cell lines, and understand this death mechanism. This compound is called LQB 118, a pterocarpan part of the structure and part of the quinone structure. Pterocarpanes are compounds found in plants where they act in defense against external pathogens and quinones are widely found in nature where they act in cellular respiration and coagulation. The cell lines were cultivated at RPMI medium with 10% of serum. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from healthy donors, separated by ficoll gradient and activated with addition of phytohemagglutinin (PHA). For the viability assay, the cells were incubated at different concentrations of the compound and measured by the MTT method at 72h. For assays of apoptosis, changes in mitochondrial membrane potential (MMP) and activation of caspase-12 or -9, cells were incubated with the compound for 24, 48 and 72h. For assays of intracellular calcium, cells were pre-incubated with Fluo3-AM and then treated with 3 or 8 μ M LQB 118. The cells were also incubated with anti-ABCB1 for the detection of MDR protein. The compound tested showed EC₅₀ values around 3 μ M against leukemia, causing apoptosis, changes in MMP and activation of caspase-12 and -9 and inhibits the expression of ABCB1 in 72 hours. The compound increased cytoplasmic calcium and this increase can be reversed by the use of EDTA. According to the data, this new compound showed a cytotoxic effect on human leukemia lines but was less toxic against normal cells (PBMC). The compound caused apoptosis in both cell lines tested, however, its effect was earlier in K562. The compound caused apoptosis in the strains being tested, its effect was earlier in K562. This compound also induced cell death by distinct pathways in each cell line, inducing apoptosis through the intrinsic pathway in K562 and endoplasmic reticulum stress in Jurkat. These data suggest that the compound could be activating calcium channels or inhibiting calcium pumps in the cell and that the effects found in these cells would be increased by calcium. The results in leukemia in conjunction with low toxicity against activated PBMC, place this compound as a good candidate for the treatment of leukemia.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Câncer.....	2
1.2. Leucemia.....	4
1.2.1. Sintomas.....	5
1.2.2. Leucemia Mielóide Aguda.....	6
1.2.3. Leucemia Linfóide Aguda.....	7
1.2.4. Leucemia Mielóide Crônica.....	9
1.2.5. Leucemia Linfóide Crônica de Células B.....	10
1.2.6. Tratamento de Leucemias.....	11
1.3. Morte celular.....	12
1.3.1. Necrose.....	13
1.3.2. Apoptose.....	15
1.4. Resistência a Múltiplas Drogas.....	30
1.5. ABCB1.....	31
1.6. ABCC.....	33
1.7. ABCG2.....	35
1.8. Quimioterapia.....	35
1.9. Pterocarpanos, Quinonas e Naftoquinonas.....	36
1.9.1. Pterocarpanos.....	36
1.9.2. Quinonas e Naftoquinonas.....	37
1.10. O Composto LQB 118.....	39
2. Objetivos.....	41
3. Materiais e Métodos.....	43
3.1. Materiais.....	44
3.2. Métodos.....	49
3.2.1. Linhagens celulares e cultura de células.....	49
3.2.2. Método colorimétrico (MTT).....	49

3.2.3. Separação de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC).....	51
3.2.4. Ativação de Linfócitos Normais por PHA.....	51
3.2.5. Cálculo do CE50 do composto nas diferentes linhagens.....	52
3.2.6. Análise de expressão de ABCB1.....	52
3.2.7. Ensaio de Anexina e Iodeto de Propídeo (PI) por citometria de Fluxo.....	52
3.2.8. Análise de Cálcio Intracelular.....	53
3.2.9. Análise de Potencial de Membrana Mitocondrial.....	53
3.2.10. Análise de Ciclo Celular.....	54
3.2.11. Análise de Ativação de Caspases	
4. Resultados.....	56
4.1. Manifestação do Fenótipo MDR.....	57
4.2. Efeito do Lapachol em Linhagens de Leucemia Mielóide.....	60
4.3. Efeito da LQB 118 na linhagem HL60 sensível a estresse oxidativo.....	63
4.4. Efeito da LQB 118 em linhagens de leucemia linfóide B.....	64
4.5. Efeito da LQB 118 na linhagem de leucemia de linfócito T Jurkat.....	65
4.6. Cálculo do CE ₅₀ para a LQB 118.....	66
4.7. Efeito da LQB 118 em Células Normais.....	67
4.8. Avaliação de apoptose e necrose em células de leucemia mielóide crônica e leucemia T do adulto.....	68
4.9. Análise de ciclo celular nas duas linhagens tratadas com LQB 118.....	71
4.10. Avaliação de Caspase-9 ativa.....	72
4.11. Mudanças no Potencial de Membrana Mitocondrial.....	73

4.12. Avaliação de Caspase-12 ativa.....	75
4.13. Alterações na Concentração Intracelular de Cálcio.....	76
4.14. Influxo de Cálcio Extracelular.....	78
4.15. Despolarização Precoce da Membrana Mitocondrial.....	80
5. Discussão.....	82
6. Conclusão.....	94
7. Perspectivas.....	95
8. Referências.....	97
9. Anexos.....	112

Lista de Figuras

Fig 1 - Estimativa de diferentes tipos de câncer

Fig 2. Microscopia eletrônica de uma célula em processo de necrose

Fig 3. Microscopia eletrônica de uma célula apoptótica

Fig 4. Diferenças entre necrose e apoptose

Fig 5. Atuação das proteínas p53 normal e mutante em danos no DNA

Fig 6. Esquema da via extrínseca de apoptose

Fig 7. Representação da ação de granzima B

Fig 8. Representação da ação de granzima A. (Cullen et al, 2010)

Fig 9. Via intrínseca ou mitocondrial de apoptose, comandada pelas proteínas da família bcl-2

Fig 10. Ação de resposta a proteínas não-enoveladas

Fig 11. Ativação de apoptose pela via de estresse do RE. (Kitamura M, 2008)

Fig 12. Representação esquemática das duas principais vias apoptóticas

Fig 13. Modelo estrutural da ABCB1 (NBD - domínio de ligação do ATP)

Fig 14. Figura esquemática da ABCB1 (TMD - domínio transmembranar)

Fig 15. Estrutura do pterocarpano LQB 79

Fig 16. Estrutura das antraciclinas Daunorrubicina e Doxorubicina.

Fig 17. Representação da síntese da LQB 118.

Fig 18. Quimioterápico Vincristina testado nas linhagens K562 e Lucena-1 (MDR)

Fig 19. Quimioterápico Mitomicina C testado nas linhagens K562 e Lucena-1 (MDR)

Fig 20. Quimioterápico Daunorrubicina testado nas linhagem K562 e FEPS

Fig 21. Composto LQB118 testado nas linhagem K562 e Lucena-1

Fig 22. Composto LQB118 testado na linhagem FEPS

Fig 23. Análise de ABCB1 em linhagem Lucena-1 tratada com 1,5mM de LQB 118

Fig 24. Composto LQB118 testado na linhagem HL60

Fig 25. Composto LQB118 testado nas linhagens Raji e Daudi

Fig 26. Composto LQB118 testado na linhagem Jurkat

Fig 27. Composto LQB118 testado em PBMC

Fig 28. Ensaio de anexina/PI nas linhagens K562 e Jurkat

Fig 29. Análise de ciclo celular das linhagens K562 e Jurkat

Fig 30. Ensaio de ativação de caspase-9 nas linhagens K562 e Jurkat

Fig 31. Ensaio de despolarização de membrana mitocondrial em células tratadas com DioC6

Fig 32. Ensaio de ativação de caspase-12 nas linhagens K562 e Jurkat

Fig 33. Ensaio de cálcio intracelular nas linhagens K562 e Jurkat

Fig 34. Ensaio de cálcio intracelular nas linhagens K562 e Jurkat tratadas com de LQB 118 + EDTA.

Fig 35. Ensaio de despolarização de membrana mitocondrial em 30min

Fig 36. Esquema mostrando possível mecanismo de ação da LQB 118

Lista de Tabelas

Tabela 1. Cálculo do CE50 para a LQB 118 em linhagens de leucemia

Tabela 2. Índices de apoptose, apoptose tardia e necrose nas linhagens K562 e Jurkat tratadas com LQB 118

Lista de abreviaturas

ABC – ATP Binding Cassete

APAF1 - Apoptotic peptidase activating factor 1

ATF4 - activating transcription factor 4

ATF6 - activating transcription factor 6

ATP – Adenosina trifosfato

ASK1 - quinase regulada por sinais apoptóticos, MAP2K5

BAK - BCL2-antagonist/killer

BAX - BCL-2-associated X protein

BCL-2 - B-cell leukaemia/lymphoma 2

BCRP – Proteína de Resistência ao Câncer de Mama (Breast Cancer Resistance Protein)

BIK - BCL2-interacting killer

BIM - bcl-2 interacting mediator of cell death

CHOP - C/EBP homologous protein

DNA – Ácido desoxirribonucléico (Desoxirriunucleic acid)

EIF2 α – eukaryotic translation initiation factor 2 α

ERO1 α - ER oxidoreductin 1 α

FADD - Fas (TNFRSF6)-associated via death domain

GRP78 - glucose-regulated protein, 78 kDa

IAP - proteína inibidora de apoptose

ICAD - DNase inibidora de caspase ativada

IRE1 - inositol-requiring kinase 1
JNK - jun n-terminal kinase
LMA – Leucemia Mielóide Aguda
LLA – Leucemia Linfóide Aguda
LMC – Leucemia Mielóide Crônica
LRP – Proteína de Resistência de Pulmão (Lung Resistance Protein)
MDR – Resistência a Múltiplas Drogas (Multidrug Resistance)
mdr1 – Gene que codifica a glicoproteína P
MLL - myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia
MRP – Proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas (Multidrug Resistance-associated Protein)
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
NPM1 - nucleophosmin (fosfoproteína nuclear B23)
PBS – Solução salina tamponada por fósforo (Phosphate-Buffered Saline)
PERK - PRKR-like ER Kinase, ou EIF2AK3 (fator iniciador de tradução eucariótico)
Pgp – Glicoproteína P (P-glycoprotein)
PHA – Fitohematoglutina
SERCA - Sarco/Endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase
SFB – Soro fetal bovino
TNF - fator de necrose tumoral
TRAF2 - fator associado a TNF
TRAIL - TNF-related apoptosis inducing ligand
UPR - unfolded protein response
VCR – Vincristina
XBP1 - X-box-binding protein 1
XIAP - X-linked inhibitor of apoptosis

1. Introdução

1.1. Câncer

A célula cancerosa é definida por duas propriedades hereditárias: ela e sua descendência reproduzem-se desobedecendo aos limites normais de divisão celular e invadem e colonizam regiões normalmente destinadas a outras células (THOMPSON et al., 1992; ZHU et al., 1999). É a combinação dessas duas atividades que faz com que o câncer seja perigoso. Uma célula anormal, com alterações como mutação de genes supressores de tumor e alterações na sobrevivência, pode vir a proliferar demasiadamente, dando origem a um tumor ou neoplasia, uma massa compacta de células anormais continuamente em crescimento.

Esse tumor pode ser maligno ou benigno. Os tumores benignos possuem células semelhantes às células normais do tecido de origem, já os tumores malignos possuem células com maior número de alterações em sua morfologia, e podem invadir outros tecidos.

Geralmente a invasividade implica na capacidade de desagregação, penetração na corrente sanguínea ou nos vasos linfáticos, e formação de tumores secundários em locais diferentes do sítio de origem (tumores metastáticos), com estímulos à geração de novos vasos sanguíneos nesses sítios de origem (angiogênese) (HINTON et al., 2008). Quanto maior o número de metástases, mais difícil se torna o tratamento da doença, passando e afetar o funcionamento de órgãos antes saudáveis.

Os cânceres são classificados de acordo com os tecidos e os tipos celulares dos quais eles derivam. Os cânceres derivados de células epiteliais são denominados de carcinomas, e os de células musculares são denominados sarcomas. Os cânceres que não se enquadram em nenhuma dessas duas grandes categorias incluem as várias leucemias,

derivadas de células hematopoiéticas e os cânceres derivados de células do sistema nervoso (ALMEIDA et al., 2005). As células de uma grande variedade de cânceres mostram, em comum, certas anormalidades nas suas seqüências de DNA que as distinguem das células normais que cercam o tumor (Alberts et al., 2004). Além disso, diversas substâncias que apresentam a capacidade de originar câncer também causam alterações genéticas. Desse modo, a carcinogênese (geração do câncer) parece ter relação com a mutagênese. Isso parece bastante claro no caso de três classes de agentes mutagênicos: carcinógenos químicos, radiação ionizante e vírus (que introduzem DNA exógeno na célula) (ALMEIDA et al., 2005).

Uma única mutação não é suficiente para induzir o aparecimento do câncer. Isso é condizente com o fato do câncer aparecer em pessoas de maior idade ou que tenham maior exposição a um carcinógeno, mostrando que há na verdade um acúmulo de mutações ao longo do tempo.

Quanto maior for o número de clones de células anormais, maior será a possibilidade de que uma mutação adicional faça esses clones progredirem até que o crescimento fique completamente fora de controle e torne-se maligno (ALBERTS et al., 2004).

Uma característica comumente encontrada em células cancerosas é a sua capacidade de escapar aos controles normais de divisão celular e ao processo apoptótico devido ao aumento de proteínas anti-apoptóticas ou à redução nos níveis de proteínas pró-apoptóticas (LI et al 2008; SERMEUS et al., 2008; ZHIVOTOVSKY et al, 2006).

Além disso, essas células têm a capacidade de evitar a senescência celular, que ocorre quando a célula interrompe a proliferação. Tem-se mostrado uma relação entre esse número limitado de divisões e o comprimento do telômero (seqüência de DNA repetitiva

no final de cada cromossomo). Já foi verificado que células tumorais possuem uma maior capacidade de expressar telomerase (enzima responsável pela síntese dos telômeros) (HAHN, 2003; JEYAPALAN et al., 2004; PENDINO et al., 2001). Essa enzima é capaz de aumentar a região final do cromossomo criando bases com repetição, evitando assim que o DNA apresente instabilidade o que está relacionado com a parada do ciclo celular em células diferenciadas.

1.2. Leucemia

A leucemia é uma neoplasia das células progenitoras de leucócitos ou eritrócitos de origem, na maioria das vezes, desconhecida. Ela tem como principal característica o acúmulo de células jovens (blásticas) anormais na medula óssea que substituem as células sanguíneas normais.

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (MS/INCA), o número de casos desse tipo de câncer no Brasil será por volta de dez mil em 2010 (Fig 1).

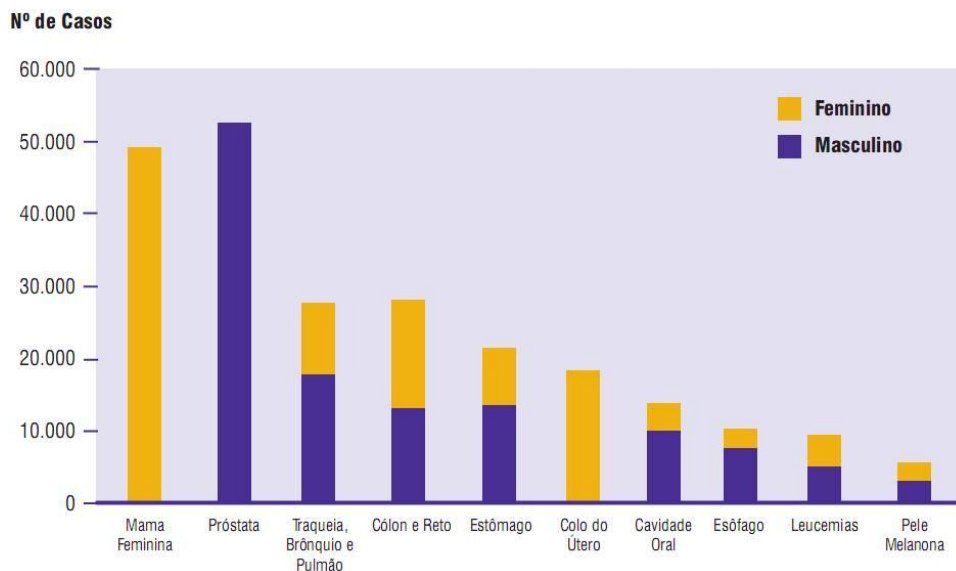


Fig1 - Estimativa de diferentes tipos de câncer. Instituto Nacional do Câncer - MS/INCA

Os principais sintomas de leucemia decorrem do acúmulo dessas células na medula óssea, prejudicando ou impedindo a produção de eritrócitos, causando anemia; dos leucócitos, facilitando o aparecimento de infecções; e das plaquetas, dificultando a coagulação. Em geral, depois de instalada, a doença progride rapidamente, exigindo com isso que o tratamento seja iniciado logo após o diagnóstico e a classificação da leucemia, de acordo com o tipo de célula afetada e o grau de diferenciação.

As leucemias podem se dividir em leucemias mielóides, sendo de precursores de células mielóides como os de monócitos, eritrócitos, megacariócitos e granulócitos ou leucemias linfóides. Podem ser divididas também em leucemias agudas e crônicas, dependendo do grau de diferenciação e de proliferação da célula. Sendo assim as leucemias podem ser divididas principalmente em leucemia mielóide crônica, leucemia mielóide aguda, leucemia linfóide crônica e leucemia linfóide aguda. A leucemia mielóide aguda pode ser dividida também em: mieloblástica (menos e mais diferenciada), promielocítica, monocítica, eritrocítica e megacariocítica (INCA, 2010)..

1.2.1. Leucemia Mielóide Aguda

A leucemia mielóide aguda (LMA) é o tipo mais comum de leucemia em adultos, sendo a maioria dos casos de pacientes com idade em torno de 65 anos e afetando mais indivíduos do sexo masculino do que feminino (ONCOLOGYCHANNEL, 2008). É uma doença clonal do tecido hematopoiético que se caracteriza pela proliferação anárquica e progressiva de células progenitoras da linhagem mielóide, refletindo em alterações no sangue periférico como leucocitose às custas de células blásticas, bem como citopenias, incluindo anemia, trombocitopenia e, mais raramente, leucopenias. A análise da medula óssea revela infiltração dessas células leucêmicas em substituição aos elementos precursores normalmente encontrados no ambiente medular (GOASGUEN, 1996).

As células leucêmicas da LMA apresentam em geral apenas uma diferenciação limitada, presumidamente, por causa de anormalidades na regulação do crescimento e diferenciação, inibindo o processo evolutivo das células até a maturidade, impedindo-as de se tornarem funcionalmente competentes (GROVES et al., 1996; ROHATINER et al, 1996).

O tratamento da LMA do adulto é dividido em duas fases: terapia de indução de remissão e terapia de pós-remissão, ou consolidação. Na fase de indução, é utilizada atualmente a combinação de Daunorrubicina com Citarabina, estabelecida como padrão ouro em 1972 (PULTE et al., 2008; ROWE, 2007) que induz a remissão completa em aproximadamente 70% dos pacientes com LMA, porém acarreta imunossupressão, sendo responsável por muitos casos de infecção durante a quimioterapia (ROWE, 2007). Após a

constatação da remissão completa, é instituída a terapia de consolidação, na qual se emprega mais um ciclo de quimioterapia com doses semelhantes às da fase anterior. A terapia de consolidação tem como objetivo a eliminação da doença residual mínima (GREER et al, 1998).

A quimioterapia em conjunto com ácido trans-retinóico, a fim de induzir diferenciação de células leucêmicas, tem sido utilizado com bons resultados com leucemia promielocítica aguda (BOTTON et al., 2004).

1.2.2. Leucemia Linfóide Aguda

A leucemia linfóide aguda (LLA) é uma doença maligna que se caracteriza pelo acúmulo de linfoblastos em diversos órgãos e tecidos, notadamente na medula óssea e no sangue periférico (WEIR et al., 2001), hiperleucocitose e hepatoesplenomegalia (MARCO et al., 2000) . Embora a LLA seja a neoplasia mais comum na infância, ela é responsável por 20% das leucemias agudas em adultos (HOELZER, 1996; JENNINGS et al., 1997). A etiologia da LLA é caracterizada pela presença de múltiplas alterações genéticas nas células (pré)leucêmicas.

Hiperdiploidia assim como a fusão dos genes TEL/AML1 são encontradas em aproximadamente 25% das crianças que tem ALL de células B, sendo mutuamente excludentes, e essa característica está associada a um prognóstico favorável (HEEREMA et al., 2000; STAMS et al., 2005). Células com hiperdiploidia tem maior tendência a sofrer apoptose, acumulam grandes concentrações de metotrexato e são altamente sensíveis a antimetabólitos e a L-asparaginase (KASPERS et al., 1995).

Já as diversas anormalidades no gene MLL, como o rearranjo MLL/AF4 e a formação do gene BCR-ABL, estão relacionados a maus prognósticos, apresentando superexpressão de proteínas de resistência a múltiplas drogas e má resposta a prednisolona (PUI et al., 2002; DORDELMANN et al., 1999).

Na indução da remissão a meta é o extermínio rápido e máximo das células leucêmicas. A combinação de Vincristina, Prednisona ou Doxorubicina é o esquema mais utilizado, e 70% a 90% dos pacientes atingem remissão completa (LUKENS, 1998)

O papel da quimioterapia de manutenção, apesar de ter a sua eficácia comprovada na LLA de infância, ainda não está definida no adulto.

1.2.3. Leucemia Mielóide Crônica

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa, resultante da proliferação de um clone de célula multipotente, neoplásica. É caracterizada pela produção de granulócitos e seus precursores, com morfologia normal, porém com função alterada.

Esse tipo de leucemia é dividido em três fases: a fase crônica, seguido de fase acelerada e subseqüente fase blástica, a qual é considerada fatal, com uma expectativa de sobrevida em torno de 3 a 6 meses, podendo o paciente encontrar-se em qualquer um desses estágios quando a doença é diagnosticada (SESSIONS, 2007).

O clone celular maligno apresenta um marcador citogenético característico, a formação do cromossomo Philadelphia (Ph) que se caracteriza pela translocação entre o cromossomo 22, contendo o gene bcr, e o cromossomo 9, contendo o gene abl (KURZOCK et al., 1988; MES-MASSON et al., 1984). O gene quimérico resultante dessa fusão

transcreve uma proteína de 210 KDa com atividade tirosinocinase superior à proteína sintetizada pelo gene ABL isoladamente (GOASGUEN et al., 1996; PÉREZ-LOUZADA et al., 1998; YINON et al., 1986). Essa proteína é responsável pela maioria das manifestações clínicas da LMC (CHOPRA et al., 1999; KURZOCK et al., 2003; PÉREZ-LOUZADA et al., 1998).

Essa proteína possui capacidade autônoma de ser ativada, diferente da proteína transcrita pelo gene ABL normal, interferindo na transdução de sinais em processos como proliferação, adesão e apoptose (CHOPRA et al., 1999; KRUZROCK et al., 2003; PÉREZ-LOUZADA et al., 1998). A proteína tirosina-quinase codificada pelo gene ABL regula diversas funções dentro da célula. Essa proteína tem capacidade de se ligar a actina, induzindo remodelamento de acordo com diversos estímulos na célula, é capaz também de regular a adesão e motilidade das células, sua capacidade fagocítica, bem como interage com diversas proteínas transdutoras de sinais. Isso explica o fato de sua alteração encontrada na LMC ser responsável pelas diversas modificações encontradas nessas células. (Colicelli, 2010)

O tratamento baseia-se na redução do número de células circulantes. Para isso, podem ser utilizados agentes citostáticos (Hidroxiuréia, Bussulfam) e alfa-interferon (IFN-alfa). Atualmente, utiliza-se a substância Imatinib, um inibidor da tirosina quinase Bcr-abl, otimizando o prognóstico no tratamento da leucemia mielóide crônica (DEININGER et al., 2003); entretanto, já há casos de resistência a esse quimioterápico, principalmente devido a mutações no gene Bcr-Abl, sendo sintetizadas novas substâncias semelhantes ao Imatinib como Dasatinib e Nilotinib, a fim de vencer esse fenômeno de resistência (SHAH, 2007).

1.2.4. Leucemia Linfóide Crônica de Células B

A leucemia linfóide crônica de células B (LLC-B) é caracterizada pelo acúmulo progressivo de linfócitos maduros funcionalmente incompetentes no sangue, medula óssea, linfonodos, fígado e baço.

Esse acúmulo de células era associado com o acúmulo de células leucêmicas e progressão da doença; entretanto, estudos recentes indicam uma proporção relativamente alta de células em divisão (PALMA et al., 2006).

Essa leucemia é a mais comum encontrada em adultos, englobando 40% de todas as leucemias em adultos maiores de 65 anos (PALMA et al., 2006).

O diagnóstico, de acordo com o National Cancer Institute Working Group (NCI), é de linfocitose maior que 5000/mm³ no sangue periférico, com expressão de antígenos B relacionados e do CD5, menos de 50% de células atípicas no sangue periférico e infiltração na medula óssea igual ou maior que 30% (FOERSTER, 1998).

Os agentes quimioterápicos mais empregados são alquilantes como Clorambucil e Ciclofosfamida, usados isolados ou em combinação com análogos de purina como Flurarabina, Cladribina e Pentastatin (AKSENTIJEVICH et al, 2003; FOERSTER, 1998).

1.2.5. Tratamento de leucemias

O tratamento tem como objetivo destruir as células leucêmicas do organismo para que a medula óssea possa recolonizá-lo com células normais. Em alguns casos é indicado o

transplante de medula óssea, como acontece nas diversas leucemias. O tratamento é feito em várias fases.

A primeira fase tem a finalidade de destruir as células leucêmicas, o que se obtém após a quimioterapia. Entretanto, as pesquisas comprovam que ainda restam no organismo muitas células leucêmicas (doença residual), o que obriga a continuação do tratamento para não haver recaída da doença, com o aparecimento de células com características que as tornam mais resistentes que as células que foram tratadas anteriormente. Nas etapas seguintes o tratamento varia de acordo com o tipo de leucemia, podendo durar mais de dois anos nas linfóides e menos de um nas mielóides (MS/INCA, 2010). Recentemente, além da quimioterapia, estão sendo testados outros tipos de tratamento, como a imunoterapia (WALLER, 2007) e quimioterapia com aporte de células tronco (MARCO et al., 2000). Grande parte dos quimioterápicos induzem morte celular por apoptose em células tumorais.

1.3. Morte celular

Assim como os organismos vivos, as células passam por um ciclo de vida em que exercem todas as reações metabólicas envolvidas no seu crescimento, sobrevivência e manutenção da sua homeostase. A morte celular ocorre devido a fatores como parada no crescimento, perda da capacidade de replicação, danos no DNA que não podem ser reparados pelos mecanismos da célula, fatores externos como privação de nutrientes ou ainda a necessidade de renovação das células de um determinado tecido.

A morte celular pode ocorrer naturalmente (programada) ou acidentalmente. Em 1858 Virchow descreveu as mudanças progressivas ocorridas durante a morte da célula e

foi o primeiro a descrever dois tipos de morte: uma forma na qual a célula “se mantinha em sua forma” e uma outra na qual as células “desapareciam e não mais poderiam ser vistas” (VIRCHOW APUD CONTI et al., 2005).

1.3.1. *Necrose*

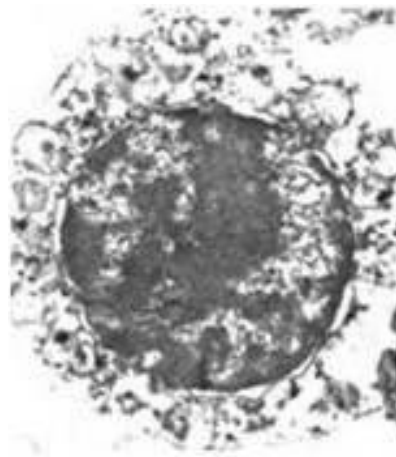


Fig 2. Microscopia eletrônica de uma célula em processo de necrose (reproduzida de SYNTICHAKI e TAVERNARAKIS, 2003).

A necrose foi inicialmente considerada um processo tóxico, não programado pelas células e segue uma forma de morte sem gasto de ATP. É um processo capaz de estender os danos às células adjacentes e geralmente ocorre devido a hipóxia, intenso estresse oxidativo, variações extremas de pH, altas concentrações de toxinas, infecção de vírus líticos ou exposição a agentes que causam danos diretos à membrana celular. Células em processo necrótico perdem a capacidade de manter um equilíbrio iônico, resultando na perda da habilidade de gerar energia (THOMPSON et al., 1992) (Fig 2).

Algumas das principais mudanças morfológicas que ocorrem durante a necrose incluem aumento do volume da célula, formação de vacúolos citoplasmáticos, retículo endoplasmático distendido, mitocôndria condensada, inchada ou rompida; ruptura dos lisossomos e, eventualmente, ruptura da membrana celular (KERR et al., 1972; MAJNO e JORIS, 1995; TRUMPET et al., 1997). Esta perda de integridade da membrana resulta em extravasamento do conteúdo citoplasmático no tecido, enviando sinais quimiotáticos para o recrutamento de células inflamatórias.

Apesar de uma significativa proporção de necrose ocorrer passivamente, cada vez mais evidências mostram formas de necrose que podem ser reguladas. Um subtipo de necrose iniciada pela ativação do receptor de morte e com inibição de caspases pode ser denominado também necroptose. Estudos também vem mostrando que a necrose pode ocorrer em paralelo ou em série com outras formas de morte celular como apoptose. (WHELAN et al., 2010).

1.3.2. Apoptose

O termo apoptose foi usado primeiramente em um artigo por Kerr, Wyllie e Currie em 1972 para descrever uma forma de morte celular morfológicamente distinta embora os componentes do conceito de apoptose só fossem explicitamente descritos muitos anos depois (PAWELETZ, 2001; KERR, 2002) (Fig 3, Fig 4).



Fig 3. Microscopia eletrônica de uma célula apoptótica (ALBERT, 2004).

A apoptose ocorre normalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento e funciona como um mecanismo homeostático para a manutenção de populações celulares dentro de um tecido. Esta também pode ocorrer como um mecanismo de defesa, como em reações imunes ou quando células são alteradas por doenças ou agentes tóxicos (NORTBURY et al, 2001).

Existe uma extensa variedade de estímulos e condições tanto fisiológicas como patológicas que podem levar à apoptose. Irradiação ou fármacos usados para quimioterapia do câncer podem resultar em danos no DNA de algumas células, que podem entrar em apoptose por uma via dependente de p53.

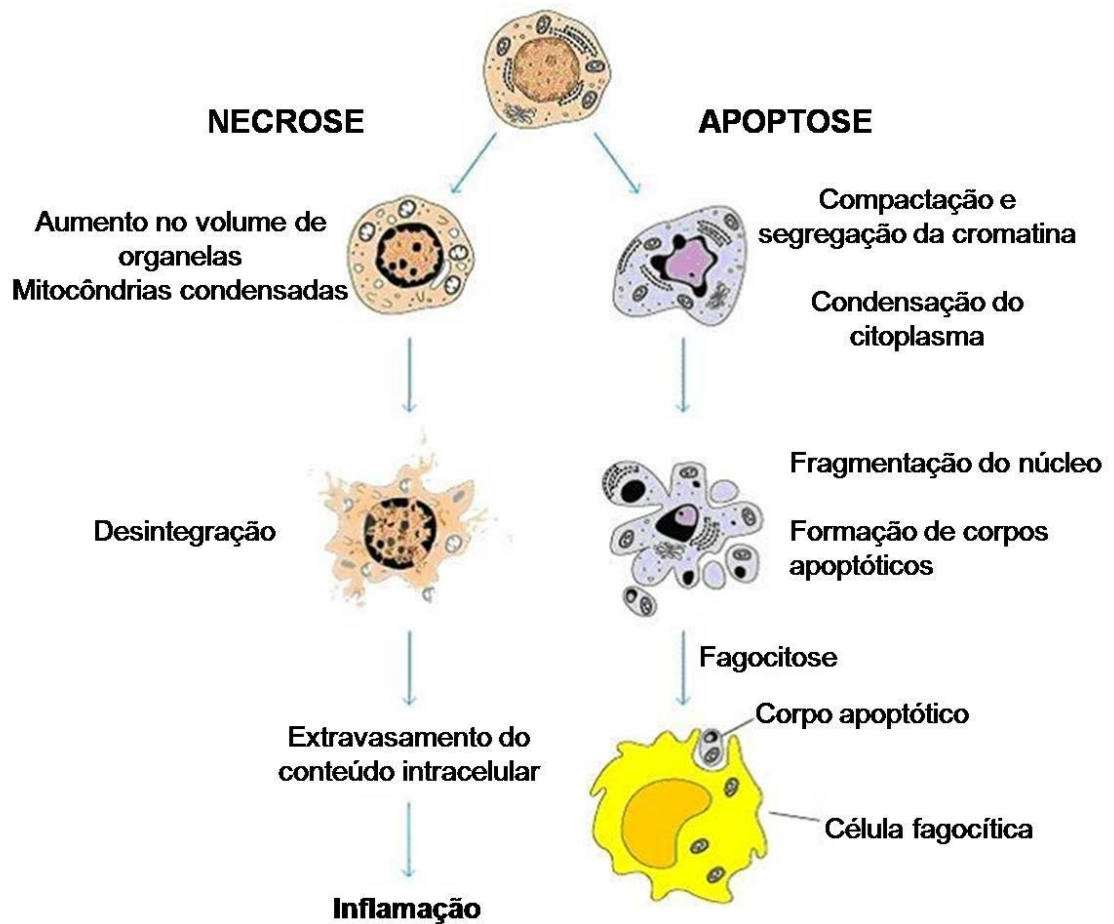


Fig 4. Diferenças entre necrose e apoptose (Figura adaptada de original do American Institutes for Biological and Nutritional Sciences publicada na www.aibnsus.org/AcdamicEmblem.html)

A p53 é uma proteína que controla a integridade do material genético da célula. Quando na presença de danos no DNA, a concentração de p53 aumenta, podendo fazer a célula acionar um mecanismo de reparo de DNA ou levar a célula a morte por apoptose. Alguns trabalhos mostram que p53 pode também reduzir a expressão de proteínas anti-apoptóticas e aumentar a expressão de proteínas pro-apoptóticas (GAO et al, 2000; BORGES et al., 2008) (Fig 5).

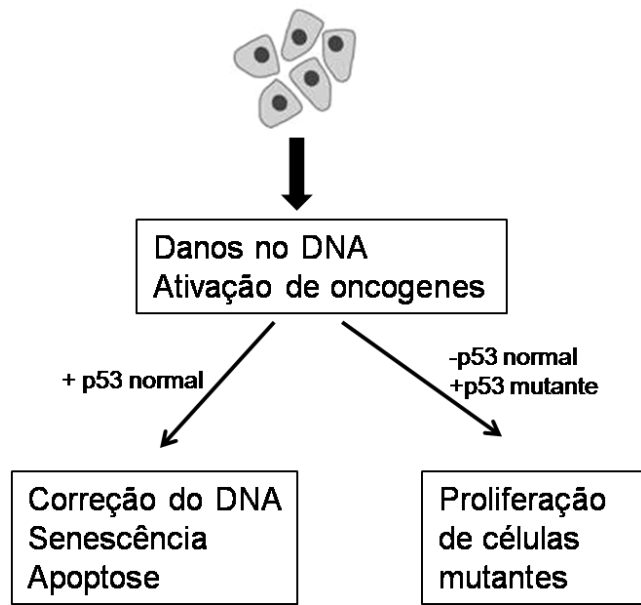


Fig 5. Atuação das proteínas p53 normal e mutante em danos no DNA

Hormônios como corticosteróides podem levar algumas células a esse tipo de morte celular programada por modulação de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas (LAANE et al., 2007). Algumas células expressam receptores para FAS ou TNF, conhecidos como "receptores de morte", que quando ativados, podem levar a apoptose por ligação a essas substâncias. Outras células tem caminhos naturais de morte que são provavelmente bloqueados por fatores de sobrevivência como hormônios ou fatores de crescimento.

Durante o desenvolvimento normal, o processo de apoptose é utilizado, por exemplo, para a eliminação de células nervosas que não conseguem realizar conexões sinápticas, células do sistema imune auto-agressivas durante a maturação nos órgãos linfóides primários e para a remoção de células inflamatórias durante o processo de cicatrização.

Alterações nesse processo de morte estão associadas em diversas patologias como câncer, AIDS, isquemia e doenças neuro-degenerativas, como doença de Parkinson e doença de Alzheimer. Algumas dessas condições estão relacionadas a taxas insuficientes de apoptose e outras ao aumento do processo apoptótico.

O processo apoptótico segue duas vias principais: a extrínseca, ou a via do receptor de morte, e a intrínseca, ou via mitocondrial. Entretanto, atualmente sabe-se que as duas vias estão ligadas e que as moléculas em uma via podem influenciar a outra (IGNEY et al., 2002). Outra via que pode levar à morte da célula é a via de estresse do retículo endoplasmático. Existe ainda um outro caminho que envolve a via de perforina/granzima, mediada por células. Essa via pode induzir apoptose tanto por granzima B como granzima A.

A via extrínseca envolve a interação com receptores transmembrana. Esta via envolve membros da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNF) (LOCKSLEY et al., 2001). Dentre esses membros podemos citar o receptor Fas ou CD95, TNFR1, DR3, DR4 e DR5, os quais apresentam domínios extracelulares ricos em cisteína e um domínio citoplasmático com aproximadamente 80 aminoácidos denominado “domínio de morte” (ASHKENAZI et al., 1998) (Fig 6).

A ligação do ligante com seu receptor resulta na formação de uma proteína adaptadora (ex.: FADD na via do receptor Fas), a qual se associa com a procaspase-8 formando um complexo de morte induzido por sinalização (DISC) e resultando na ativação da procaspase-8 (KISCHKEL et al., 1995).

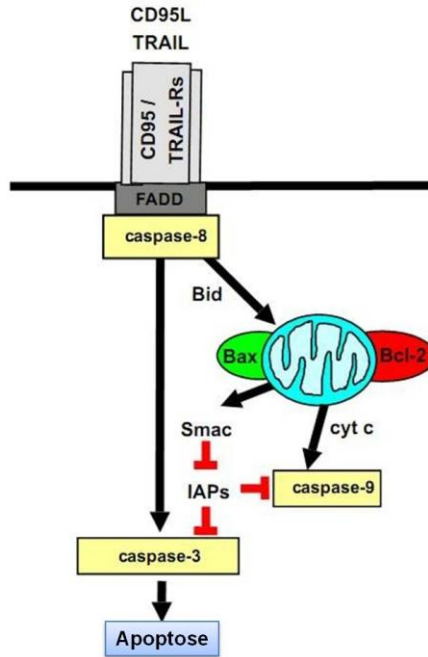


Fig 6. Esquema da via extrínseca de apoptose. O esquema mostra a interação de CD95L/TRAIL (geralmente através de células do sistema imune) com TRAIL-Rs, posterior formação do complexo FADD e ativação de caspase-8. Pode ser observada também, a amplificação do sinal pela via mitocondrial (intrínseca). (Fulda, 2008)

A via de perfurina é mediada por células T citotóxicas (CD8+) ou células NK, que podem também induzir morte de células pela via extrínseca, com a interação FasL/FasR. Porém, essas células também podem induzir morte através de uma outra via, que envolve a secreção de uma molécula formadora de poros na membrana (perfurina) e subsequente liberação de grânulos citoplasmáticos, dentre eles granzimas A e B, através do poro na célula alvo (TRAPANI et al., 2002).

A Granzima B pode clivar proteínas nos resíduos de aspartato, ativar as procaspases-10, -3 e -7 (CULLEN et al., 2010) e clivar fatores como ICAD (DNase inibidora de caspase ativada), o que irá permitir a degradação do DNA. Além disso, essa

molécula pode realizar a clivagem de BID, induzindo a liberação do citocromo C, ou ainda ativar diretamente procaspase-3, entrando diretamente na fase de execução de apoptose (BARRY et al., 2002; RUSSEL et al., 2002) (Fig 7).

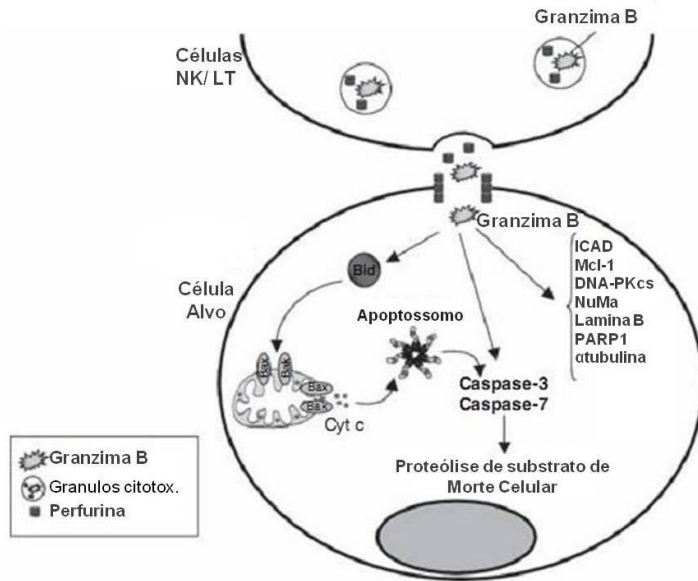


Fig 7. Representação da ação de granzima B. (CULLEN et al., 2010)

A Granzima A ativa uma via de morte independente de caspases, degradando DNA através de uma DNase NM23-H1, produto de um gene supressor de tumor, além de ter uma possível atuação na produção de IL-1 β (FAN et al., 2003) (Fig 8).

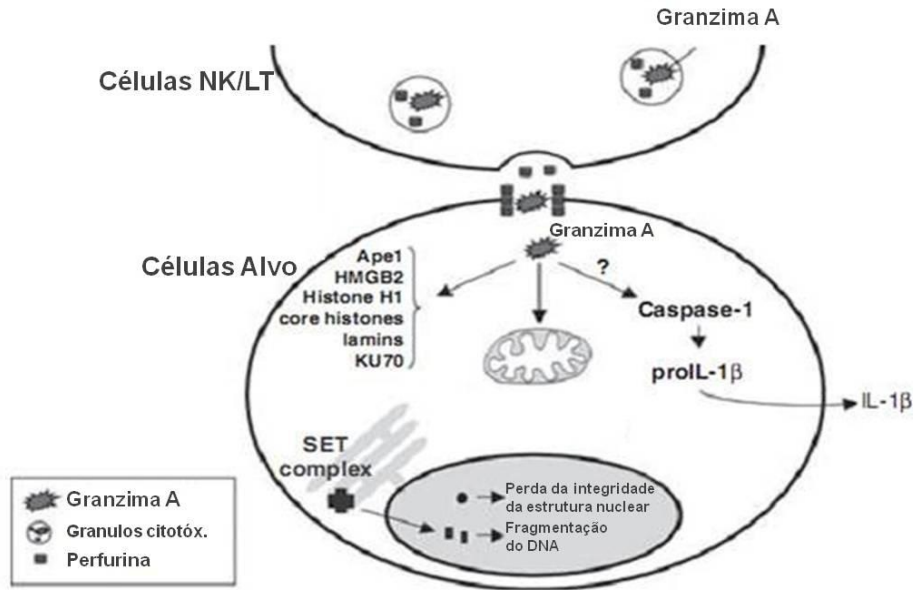


Fig 8. Representação da ação de granzima A. (CULLEN et al., 2010)

A via intrínseca se caracteriza pela ação de diversos estímulos não mediados por receptores e que atuam diretamente em alvos dentro da célula e são iniciados por eventos mitocondriais. Os estímulos que iniciam essa via podem ser negativos, como ausência de fatores de crescimento, hormônios e citocinas, ou positivos, como radiação, toxinas, hipóxia, hipertermia, infecção viral e acúmulo de radicais livres.

Esses estímulos causam mudanças na membrana interna da mitocôndria, alterando sua permeabilidade e acarretando em perda de potencial da membrana, o que libera dois principais grupos de proteínas do espaço intermembranar para o citosol. Um grupo é composto pelo citocromo c, o qual se liga a Apaf-1 e a procaspase-9 formando o apoptossomo. Este é formado também pela Smac/DIABLO e HtrA2/OMI, que atuam inibindo IAPs, um grupo de proteínas anti-apoptóticas (CAI et al., 1998; DU et al., 2000; LOO et al., 2002; GARRIDO et al., 2005; VAN LOO et al., 2002; SCHIMMER, 2004).

O outro grupo é composto de proteínas pro-apoptóticas, como AIF, endonuclease G e CAD que são liberados da mitocôndria durante a apoptose, num momento posterior, realizando fragmentação do DNA. Essa via de apoptose é controlada por membros da família de proteínas Bcl-2 (CORY et al., 2002). A família das proteínas Bcl-2 é composta por proteínas anti-apoptóticas como a Bcl-2, a Bcl-x e Bcl-w, e proteínas pro-apoptóticas como Bcl-10, Bax, Bak, Bad e Bid. Bcl-2 pode se ligar a Bax ou Bak, impedindo a sua atuação na abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP) e consequente liberação do citocromo c; entretanto, a Bcl-2 pode ser inibida por um grupo de proteínas BH3-only como Bad, NOXA e PUMA, mantendo proteínas como Bax e Bak livres. Quando livre, Bak/Bax se oligomeriza, criando um poro na membrana mitocondrial externa e permitindo a liberação do citocromo c pela mitocôndria (ADAM et al., 2007) (Fig 9).

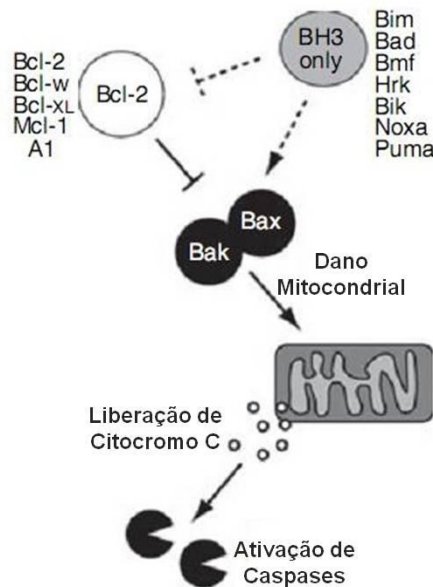


Fig 9. Via intrínseca ou mitocondrial de apoptose, comandada pelas proteínas da família bcl-2 (KILE, 2009).

A via de estresse de retículo endoplasmático (RE) está relacionada ao acúmulo de proteínas mal enoveladas dentro do retículo e seus mecanismos ainda não estão totalmente entendidos.

Diversos distúrbios podem acarretar o acúmulo de proteínas mal enoveladas no retículo, como a desregulação dos mecanismos redox causados por hipóxia, agentes oxidantes ou redutores (FRAND et al., 2000), falta de glicose afetando a glicosilação de proteínas e alterações na homeostase do cálcio (MA et al., 2004). O acúmulo de proteínas mal enoveladas ativam um sinal chamado de UPR (Unfolded Protein Response), devido à liberação de IRE-1, PERK e ATF6 pela proteína GRP78 (Glucose-regulated protein). Esse sinal leva a célula a adaptação, alarme e apoptose e é mediado por IRE-1, PERK, ATF6 e CHOP (Fig 10, Fig 11).

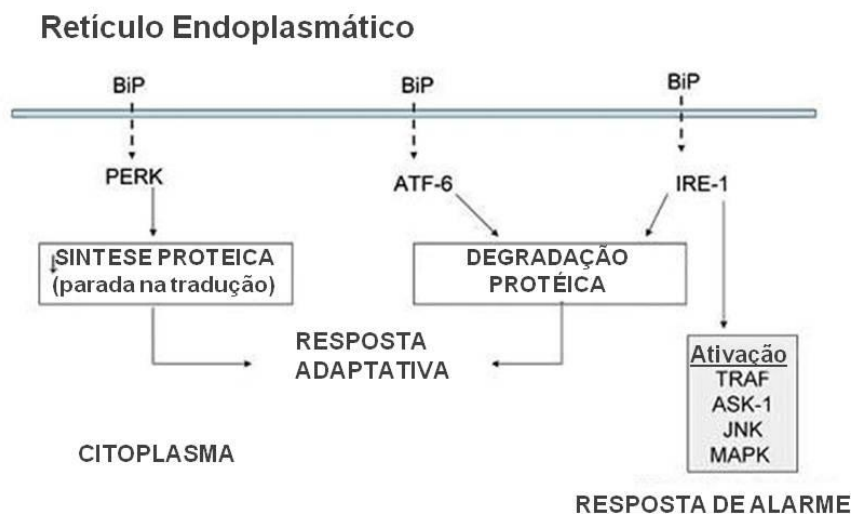


Fig 10. Ação de resposta a proteínas mal-enoveladas

Dentre essas proteínas, algumas auxiliam na degradação de proteínas mal enoveladas e na produção de chaperonas para o enovelamento correto de proteínas como PERK.

PERK é uma proteína cinase que pode inativar o fator EIF α , inibindo a tradução do mRNA e conseqüentemente, reduzindo o carregamento de proteínas no RE. Apesar da inibição de EIF α em alguns casos conferir um aumento na sobrevivência, sua inibição de forma prolongada e conseqüente inibição da síntese protéica, é incompatível com a vida e pode induzir autofagia. Apesar da autofagia ser um mecanismo de sobrevivência, em muitos casos pode ser considerada um tipo de morte não apoptótica. PERK também pode ativar o fator de transcrição ATF4, que está envolvido na transcrição de mRNA de proteínas chaperonas que podem auxiliar tanto na degradação de proteínas como no enovelamento correto de proteínas, auxiliando na retirada do estresse no RE. Outras proteínas podem, além de reduzir a síntese protéica, induzir a morte na célula quando o nível do estresse no RE for muito alto.

IRE1 α é uma proteína transmembrana localizada no retículo e que possui um domínio serina/treonina quinase e um domínio endoribonuclease. Essa proteína é requerida para a clivagem e degradação de mRNA que codifica proteínas secretadas, reduzindo o acúmulo no ER. IRE1 α também atua como proteína cinase, ligando-se a TRAF2 (fator associado a TNF). Essas duas proteínas podem atuar na ativação de proteínas envolvidas em imunidade, inflamação e apoptose, como ASK1 (quinase regulada por sinais apoptóticos, MAP3K5) que ativa JNK (TOURNIER et al., 2000). IRE1 α pode ser também ativado pelas proteínas Bcl-2 pró-apoptóticas BAX e BAK, modulando a sinalização UPR. IRE1 α também pode ativar a proteína pró-apoptótica BIM e inibir a proteína anti-apoptótica Bcl-2. Paradoxalmente, Bcl-2 e Bcl-xL podem inibir ativação de JNK e reduzir a apoptose induzida por estresse do retículo no tratamento com taspigargina (inibidor da SERCA).

Outra proteína importante na indução de apoptose por estresse do RE é a CHOP. CHOP (C/EBP homologous protein) é uma proteína de 29 kDa, membro da família C/EBP de fatores de transcrição que são induzidos por estresse do RE (OYADOMARI et al., 2004). O promotor do seu gene possui sítio de ligação para os principais indutores de UPR, incluindo ATF4, ATF6 e XBP1 (HARDING et al., 2003; SCHEUNER et al., 2001). CHOP também pode ser induzida em nível pós-transcricional pela via de IRE1-ASK1-p38 (WANG e RON, 1996).

A superexpressão de CHOP pode levar a célula à morte pela inibição de Bcl-2 (MCCULLOUGH et al., 2001). CHOP pode ainda aumentar o estresse de RE pela indução da expressão de genes (aumentando o carregamento protéico) e por tornar o RE mais oxidativo por induzir a expressão de ERO1 α (MARCINIAK et al., 2004; SONG et al., 2008). CHOP também pode se ligar ao promotor do gene da proteína pró-apoptótica BIM e pode também inibir a expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2 (PUTHALAKATH et al., 2007; MCCULLOUGH et al., 2001).

Por fim, IRE1 α parece ser necessário para ativar caspase-12 (YONEDA et al., 2001). Essa proteína parece mediar a apoptose via estresse do retículo por ativar caspase-9 (LAMKANFI et al., 2002).

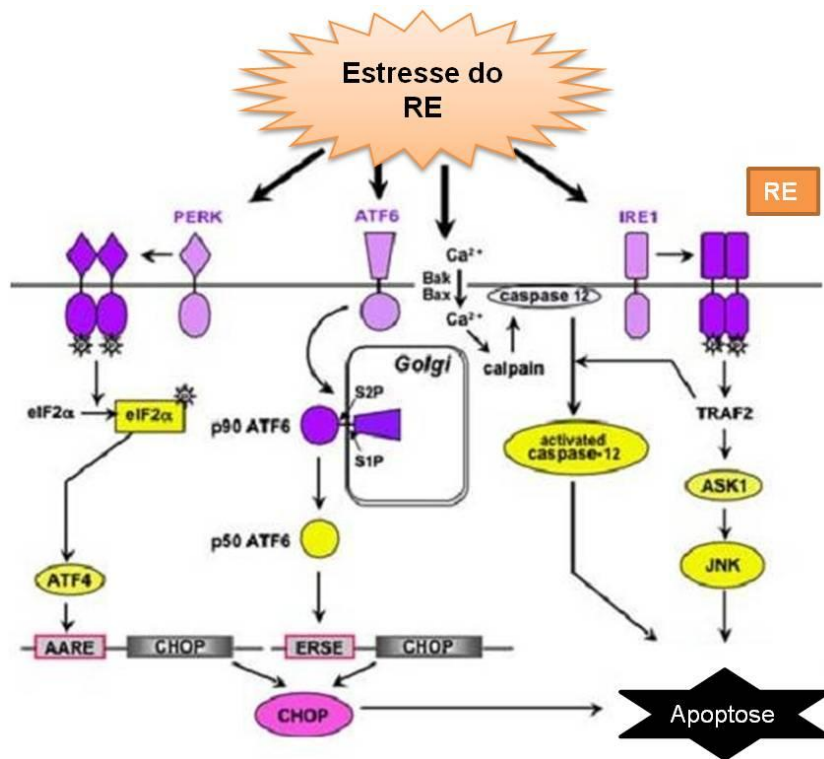


Fig 11. Ativação de apoptose pela via de estresse do RE. (adaptado de KITAMURA, 2008)

Apesar de muitos humanos não possuírem caspase-12 devido a presença de um polimorfismo que cria uma mutação *nonsense* na região codificante (FISCHER et al., 2002), diversos trabalhos vem mostrando a importância dessa via de estresse do RE em seres humanos. Por isso acredita-se que outras caspases podem ter o mesmo mecanismo de ação da caspase-12, como a caspase-4 (HITOMI et al., 2004), incluída no grupo de caspases pró-inflamatórias, como caspase-5 e caspase-1.

Um trabalho utilizando RNAi para caspase-4 em células de neuroblastoma humano mostrou que essas células apresentavam redução na apoptose via estresse do RE com o uso de taspigargina, mas não na via mitocondrial (EGGER et al., 2003).

Outro mecanismo proposto para ativação de caspase-12 e indução de apoptose seria através da proteína BH3-only BIK. Apesar de ser a primeira proteína dessa família descrita,

pouco se sabe sobre a sua importância real na célula, porém Zhao demonstrou que a apoptose induzida por BIK, decaiu através de RNAi para caspase-12 (ZHAO et al., 2007). Uma hipótese seria que BIK mediaría a liberação de cálcio pelo retículo endoplasmático através da interação com as proteínas Bax/Bak presentes no retículo (ZHAO et al., 2007).

Alterações na homeostase do cálcio parecem ter importância tanto na via de apoptose por estresse do retículo endoplasmático como pela via intrínseca. Alterações na homeostase de cálcio no retículo pode ativar o sistema de resposta a proteínas mal enoveladas e ativar calpaína, que por sua vez irá ativar caspase-12. Já um aumento na concentração intracelular de cálcio e posterior captação pela mitocôndria pode levar a abertura do PTP, liberação de citocromo c e ativação de caspase 9. Esse mecanismo não é bem entendido, porém estudos sugerem o envolvimento de proteínas da família Bcl-2 como Bax/ Bak e Bcl-2/Bcl-xL na regulação desse evento. Há também estudos que demonstram a importância de calpaínas mitocondriais nesse evento pela clivagem do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e possivelmente pela clivagem de proteínas de membrana do poro (KAR et al., 2009). Todas as três vias convergem para o mesmo terminal, ou via de execução (Fig 12).

Esta via se inicia pela clivagem de caspase-3 e resulta em fragmentação do DNA, degradação de proteínas do citoesqueleto e do núcleo, formação de corpos apoptóticos e expressão de ligantes para células fagocíticas. A via por granzima A ativa uma via paralela, independente de caspases, por danos à cadeia simples de DNA (MARTINVALET et al., 2005).

As caspases são largamente expressas em forma de proenzimas nas células e, quando ativada, uma caspase pode ativar outras caspases, iniciando uma cascata de proteases. Esta cascata proteolítica amplifica a sinalização da via apoptótica, acelerando o processo de morte celular.

Essas proteínas apresentam atividade proteolítica e podem clivar proteínas nos resíduos de ácido aspártico, possuindo diferentes especificidades envolvendo reconhecimento de aminoácidos próximos. Após a ativação das caspases, o processo de apoptose torna-se praticamente irreversível.

Dentre todas as caspases, dez são descritas e classificadas como iniciadoras (caspases -2, -8, -9, -10), efetoras ou executoras (caspases-3, -6, -7) e inflamatórias (caspases-1, -4, -5) (COHEN, 1997; RAI et al., 2005).

As caspases podem ser inibidas por um grupo de proteínas anti-apoptóticas denominadas IAPs. Dentre as IAPs, podem ser encontradas em humanos c-IAP-1, c-IAP-2, XIAP, NAIP, survivin e livin-alfa (D'ALESSANDRO et al., 2007). A survivin, uma IAP bem descrita, possui efeito não só na inibição de apoptose, mas também na indução de proliferação (WHEATLEY et al., 2005). Essa proteína é encontrada mais frequentemente em tecidos de origem fetal e neoplásica, sendo menos detectada em tecidos comuns (D'ALESSANDRO et al., 2007).

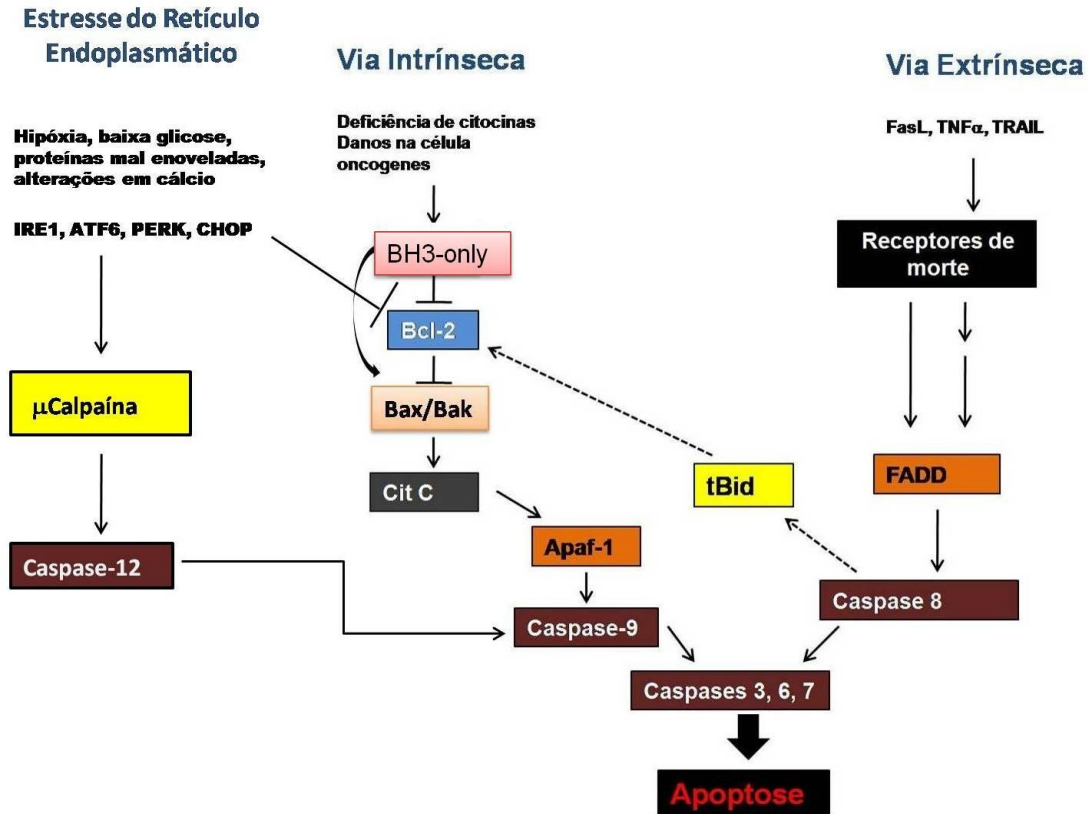


Fig 12. Representação esquemática das principais vias apoptóticas. Adaptado de ADAMS e CORY, 2007.

1.4. Resistência a Múltiplas Drogas (MDR)

Como dito anteriormente, os quimioterápicos induzem morte celular, no entanto, o fenômeno de resistência a múltiplas drogas (MDR) é uma das causas de fracasso no tratamento com quimioterápicos.

Esse fenômeno é um conjunto de diversos fatores, dentre eles a superexpressão de proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-2 e as IAPs, e subexpressão de proteínas proapoptóticas, como Bax e Bak. Outros fatores são o aumento do conteúdo intracelular de

proteínas anti-oxidantes como catalase, glutationa-S-transferase (GSH) e superóxido dismutase (SOD), e mutação em genes que codificam proteínas supressoras de tumor.

Outras alterações protéicas foram relatadas como indutores do fenótipo MDR. Em 2007, Yang e colaboradores identificaram a superexpressão da proteína NPM1 (nucleofosmina ou fosfoproteína nucleolar B23) (YANG et al., 2007), também conhecida como B23, em células de carcinoma gástrico de pulmão com fenótipo MDR. O bloqueio da expressão dessa proteína com RNA de interferência conseguiu contornar a resistência dessas células ao quimioterápico adriamicina.

O mecanismo clássico de resistência a múltiplas drogas é a superexpressão de proteínas que funcionam como bombas, extruindo substâncias para fora das células, ou capturando essas substâncias e impedindo-as de atuar em seu sítio de ação e reduzindo sua concentração a níveis pouco tóxicos. Essas proteínas de extrusão são conhecidas como sendo da superfamília dos transportadores ABC (ATP-Binding Cassete), as quais utilizam a energia do ATP para realizar a extrusão dessas substâncias.

Essa superfamília é composta de diversas proteínas, mas dentre todas, podemos destacar a glicoproteína P (Pgp), hoje denominada ABCB1, codificada pelo gene *mdr1*; a proteína associada à resistência a múltiplas drogas (MRP, do inglês Multidrug Resistance Protein), conhecida hoje como ABCC; a proteína associada à resistência a câncer de mama, BCRP (do inglês Breast Cancer Resistance Protein), denominada também ABCG2, membro da superfamília de proteínas ABCG.

Além disso, outra proteína associada ao fenômeno MDR é a proteína associada à resistência a câncer de pulmão (LRP, do inglês Lung Resistance Protein), uma proteína com 110 kDa que não atua na membrana plasmática, mas sim dentro do citoplasma da

célula, impedindo que certos quimioterápicos cheguem ao núcleo (SCHEPPER et al., 1993).

1.5. ABCB1 (Pgp)

A ABCB1 ou glicoproteína P (Pgp) é uma proteína de 170 KDa com aproximadamente 1280 aminoácidos e é codificada pelo gene *mdr-1* (JULIANO e LING, 1976; JURANKA et al., 1989). Possui duas partes homólogas, formadas por 12 domínios transmembrana, sendo sua porção citoplasmática, responsável pela ligação a molécula de ATP, na qual será utilizada a energia necessária para a extrusão de diversas substâncias (Fig 13). Essa proteína foi o primeiro transportador do tipo ABC identificado em células eucarióticas, devido a sua função em conferir resistência a múltiplas drogas em células cancerosas (SAUNA e AMBUDKAR, 2007). Estudos mostram que o teor de oxigênio no microambiente do tumor pode regular a expressão da ABCB1, aumentando sua expressão em condições de hipóxia e reduzindo em condições normais (LIU et al., 2007).

Sua superexpressão confere às células, uma alta resistência a uma grande variedade de substâncias citotóxicas, não relacionadas quimicamente, dentre as quais, agentes antitumorais, tornando a quimioterapia inefetiva. Diversos quimioterápicos são substratos para ABCB1, dentre eles, Actinomicina D, Doxorubicina, Etoposídeo, Taxol, Vimblastina, Vincristina e antraciclinas. Atualmente existem compostos que podem modular essa proteína, sendo que o primeiro descoberto foi o Verapamil, originalmente descrito como um bloqueador de canais de cálcio (TSURUO et al., 1981).

Apesar de descrita inicialmente em células tumorais, a ABCB1 possui funções fisiológicas e é encontrada em diversas células de tecidos normais como na barreira hemato-encefálica, protegendo contra xenobióticos potencialmente tóxicos e até como agente depurador de proteínas, como a amilóide β conhecida como uma das causadoras da Doença de Alzheimer (CIRRITO et al., 2005). Nos rins, localizada principalmente no túbulo proximal, ABCB1 auxilia na secreção de substâncias endógenas e exógenas potencialmente tóxicas para o organismo (TRAMONTI et al., 2006).

Ela Possui funções secretórias também em outros órgãos, como no fígado e no intestino, onde atua na excreção de substâncias para a luz do intestino (IIDA et al., 2006; HAYASHI et al., 2007), além de possuir função protetora em áreas como a barreira hemato-testicular.

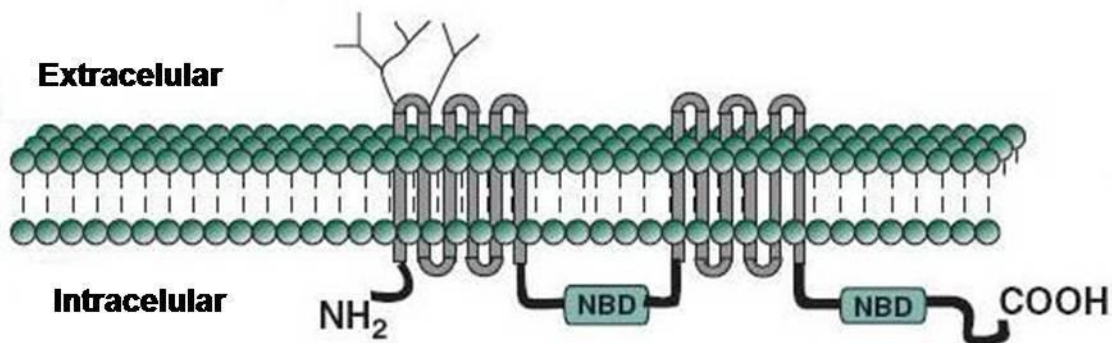


Fig 13. Modelo estrutural da ABCB1 (NBD - domínio de ligação do ATP), adaptado de Vautier et al., 2006.

1.6. ABCC (MRP)

A ABCC (MRP) é uma família de transportadores que consiste atualmente de 9 membros, destes membros, o mais bem caracterizado é a proteína ABCC1 (Fig 14), também conhecida como MRP1, identificada pela primeira vez em 1992 em células de pulmão H69AR resistentes a antraciclinas (COLE et al., 1992). É uma proteína de 190 kDa, também encontrada frequentemente em diversos tecidos normais, além de células tumorais.

Os membros da família ABCC são estruturalmente e funcionalmente similares à Pgp, entretanto eles diferem nos tipos de substratos utilizados.

O espectro de substâncias transportadas por essas proteínas é similar aos transportados pela ABCB1, entretanto, as proteínas ABCC transportam anions orgânicos, mediando o efluxo dessas substâncias principalmente após a ligação desses a glutathione, glucuronato ou sulfato mediante a ação das suas transferases apropriadas. Os mais bem estudados são os S-conjugados com glutathione, podendo a ABCC realizar o cotransporte dessas substâncias junto com a glutathione (COLE et al., 1992; MULLER et al., 1994; JEDLITSCHKY et al., 1996). Existem também diversos inibidores para a proteína ABCC1, como é o caso do probenecide, que também é um inibidor de transporte iônico (POTSCHKA et al., 2003).

Além de conferir resistência em alguns tumores, a ABCC1 está expressa em uma grande variedade de tecidos normais e linhagens celulares. A ABCC1 foi detectada em células normais de pulmão (COLE et al., 1992), testículos (AUGUSTINE et al., 2005), células mononucleares de sangue periférico (ECHEVARRIA-LIMA et al., 2007), células mononucleares da medula óssea (LEGRAND et al., 1996; KYLE-CEZAR et al., 2007),

timócitos (LEITE et al., 2006) e macrófagos (LEITE et al., 2007), além de ser encontrada com expressões mais baixas em células de placenta, células renais, útero, fígado, glândula salivar e baço (NOOTER et al., 1995)

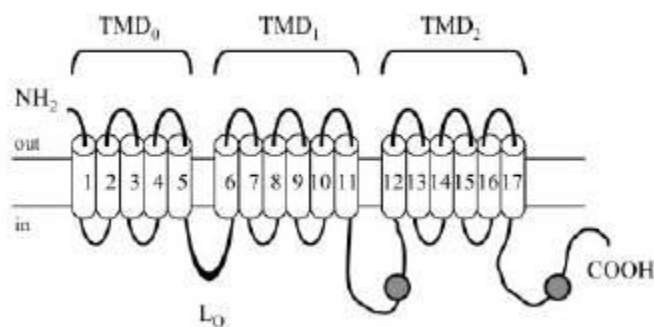


Fig 14. Figura esquemática da ABCG2 (TMD - domínio transmembranar) (reproduzida de DALLAS et al., 2006).

1.7. ABCG2

A proteína ABCG2, também conhecida como *ABCC1*, é uma proteína de 95 kDa e diferente das outras proteínas ABC associadas ao fenômeno MDR, essa proteína possui apenas um domínio transmembrana e um domínio de ligação ao ATP.

Além de encontrada em diversos tipos de câncer, também é encontrada em tecidos normais, como na barreira hemato-encefálica e a barreira hemato-testicular e é uma proteína característica de células tronco (ENOKIZONO et al., 2008). Pode ser bloqueada pelo inibidor GF120918 (VOLK et al., 2002).

1.8. Quimioterapia

A quimioterapia consiste do uso de compostos químicos no tratamento de doenças causadas por agente biológicos. A quimioterapia no câncer explora as diferenças entre as células cancerosas e as células normais, como alterações nos padrões de divisão celular e controle do ciclo, diferenças na sinalização celular e no metabolismo dessas células e diferenças na expressão de proteínas presentes em células normais e células tumorais.

Os quimioterápicos podem ser classificados conforme sua atuação no ciclo celular como Ciclo-inespecíficos, quando atuam nas células que estão ou não no ciclo proliferativo; Ciclo-específicos, quando atuam em células que se encontram em proliferação, ou Fase-específicos, quando atuam em determinada fase do ciclo celular (INCA, 2008).

A quimioterapia enfrenta duas grandes dificuldades. Apesar de se focar nas diferenças adaptativas apresentadas pelas células tumorais, ela também se mostra muito tóxica em células normais, causando graves danos ao paciente. Um outro grande problema ocorre porque, após um tempo de exposição das células aos quimioterápicos, parte dessas células são selecionadas, adquirindo o fenótipo de resistência a múltiplas drogas, já abordado anteriormente. Desta forma, tem-se buscado novos compostos, que sejam menos tóxicos e que possam contornar o fenômeno de resistência, sendo este o foco deste trabalho.

1.9. Pterocarpanos, Quinonas e Naftoquinonas

1.9.1. Pterocarpanos

Os pterocarpanos são produtos naturais pertencentes ao grupo dos flavonóides, mais especificamente ao sub-grupo dos isoflavonóides (DONNELLY et al., 1995; HARBORNE et al., 1975; INGHAM, 1983). Essas substâncias são encontradas principalmente nas Papilonoideae, uma subfamília das Leguminosae. Sua estrutura é composta por quatro anéis aromáticos, sendo as diferentes estruturas associadas aos anéis A e D, responsáveis pela diversidade de atividades farmacológicas apresentadas. Em plantas, esses pterocarpanos são metabólitos secundários, atuando na resposta a patógenos (LIU et al., 2006). Possuem ações antibacterianas (MITSCHER, 1987), antiprotozoóticas e antitumorais (NETTO, 2007).

Dentre os pterocarpanos com efeito antitumoral podemos citar um composto natural extraído da planta *Petalostemon purpureus*, a qual apresenta atividade antitumoral em células KB (WALL et al., 1995). Essa substância já foi sintetizada pelo Laboratório de Química Bioorgânica, sendo denominada LQB 79 (Fig 15) e apresentando efeitos antitumorais em diversas linhagens leucêmicas (NETTO, 2007; SALUSTIANO, 2006).

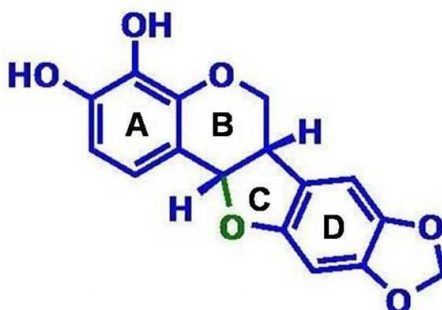


Fig 15. Estrutura do pterocarpano LQB 79

1.9.2. Quinonas e naftoquinonas

Quinonas são substâncias encontradas em diversos organismos na natureza, desde bactérias até plantas e animais. Algumas possuem função fisiológica, atuando na cadeia respiratória ou na fotossíntese como carreadores de elétrons, como as ubiquinonas (O'BRIEN, 1991), ou ainda possuem importante função na coagulação sanguínea, como é o caso da vitamina K (DA SILVA et al., 2003). Muitas quinonas possuem atividade antiproliferativa, podendo ser usadas como quimioterápicos no tratamento de infecções virais e bacterianas, e atualmente são utilizadas como substratos para a síntese novos compostos.

Dentre as quinonas com conhecidos efeitos antitumorais podemos citar as antraciclina Daunorrubicina e Doxorubicina (Fig 16) (ZHANG et al., 2006), as mitomicinas, como a Mitomicina C (NA et al., 2002) e as naftoquinonas, como o Lapachol, a α -Lapachona e a β -Lapachona (DUVOIX et al., 2004; LINARD et al., 1975; MI et al., 2002)

Essas naftoquinonas são encontrados em plantas das famílias Bignoniaceae, particularmente do gênero *Tabebuia* abundantes em florestas tropicais e parecem possuir, como mecanismo principal, a indução de estresse oxidativo; além disso, já foram descritas como inibidores de topoisomerase (LI et al., 1993) e da telomerase (LEE et al., 2005). O Lapachol é uma naftoquinona que foi utilizado como quimioterápico, mas seu uso foi descontinuado.

Novos compostos derivados dessas naftoquinonas que possuam efeitos antiproliferativos e citotóxicos tem sido estudados, com efeitos colaterais menores ou nulos

tendo, além disso, a possibilidade de não serem substratos de ABCB1 ou ABCC, tornando-se eficazes em linhagens MDR.

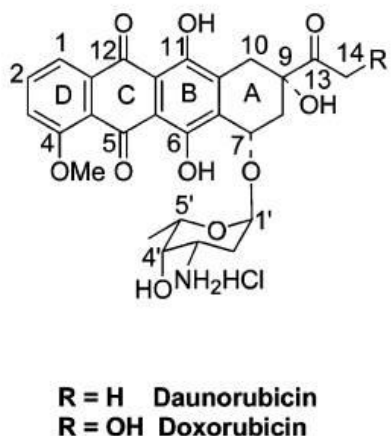


Fig 16. Estrutura das antraciclina Daunorrubicina e Doxorubicina.

1.10. O composto LQB 118.

O composto LQB 118 faz parte de um grupo de compostos produzidos no Laboratório de Química Biorgânica do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN). Esse composto foi idealizado possuindo características estruturais do Lapachol e do pterocarpano LQB79, mantendo em sua estrutura a função quinona presente no Lapachol e os anéis B, C e D presentes no composto LQB 79 (Fig 17). Outros compostos com essa estrutura pterocarpano-quinona já tiveram sua síntese publicada e apresentaram efeito antitumoral em linhagens de câncer de mama e leucemia, tendo o composto LQB 32, reduzido a viabilidade de células da linhagem MCF-7 em 50% na concentração de 5.3 μM (SALUSTIANO et al., 2009). Nesse trabalho também foi demonstrado um efeito

anestésico, como agonista de receptores benzodiazepínicos. O composto LQB 118 não possuía, até o início do nosso trabalho, publicações sobre seu efeito em células tumorais.

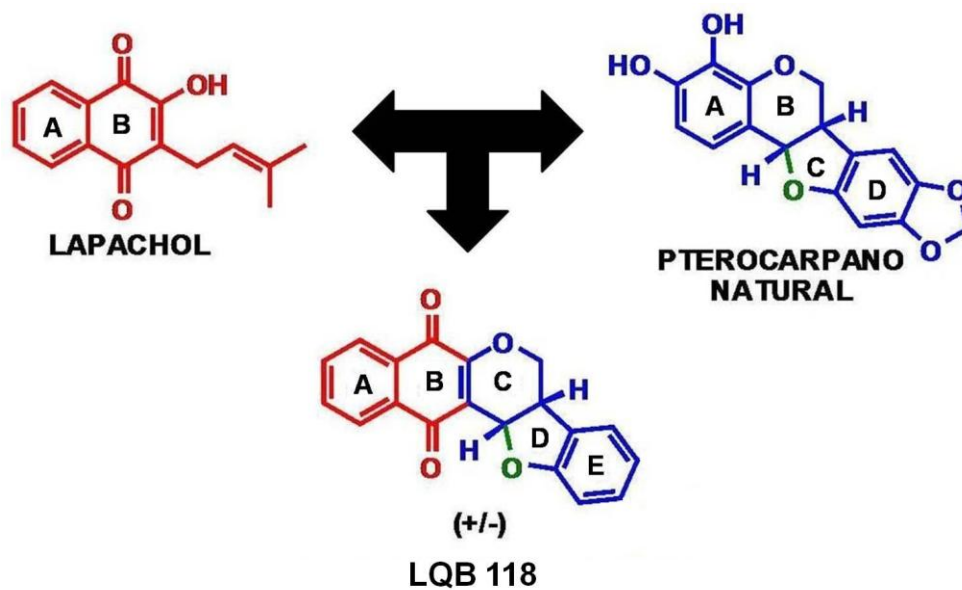


Fig 17. Representação da estrutura do LQB 118.

2. Objetivos

Objetivo Geral

Nosso objetivo, foi verificar se o composto LQB 118 era eficaz contra células leucêmicas e se isso se estendia a células apresentando fenótipo de resistência. Por fim, este trabalho também visava identificar os mecanismos de morte celular envolvidos na ação desse composto.

Objetivos Específicos

- Identificar o CE50 do LQB 118 em diferentes linhagens e comparar seu efeito ao do Lapachol
- Verificar se o composto apresenta efeito tóxico em células normais
- Analisar se o composto é capaz de induzir apoptose em células com fenótipos diferentes
- Analisar possíveis vias envolvidas na morte celular envolvidas no composto em células com fenótipos diferentes

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais:

Reagentes

Anexina V-FITC - 1 µg/µl em Tampão de ligação - Amarante-Mendes

Anticorpo Monoclonal Anti-human PgP (ABCB1) - BD Pharmigen

CaspGLOW Green Caspase-12 Staining Kit - Biovision

CaspGLOW Green Caspase-9 Staining Kit - USBiologicals - Biovision

Daunorrubicina (DNR) – UNITED MED – Concentração estoque de 2mg/ml diluído em meio RPMI na concentração 0,2mg/ml e mantida em alíquotas a -20°C, até o momento do uso.

DioC6 - Invitrogen - Molecular Probes

Ficoll-Hypaque – SIGMA - Histopaque

Fluo-3 AM - Invitrogen

Lapachol e o LQB 118 – O Lapachol e o LQB 118 foram fornecidos pelos doutores Paulo Ribeiro Costa, Alcides José Monteiro da Silva e Chaquip Daher Netto, do Laboratório de Química Biorgânica, no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

O estoque dessas substâncias foi dissolvido em DMSO estéril para a concentração de 25 mM e mantido na geladeira.

Mitomicina C - SIGMA

MTT (Brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazol) – SIGMA – solução estoque 5mg/ml diluída em salina e mantida na geladeira a 4°C.

PHA (Fitohemaglutinina) - SIGMA

PI (Iodeto de Propídio) (1 mg/ml) - SIGMA

Probenecide - SIGMA

Vincristina (VCR) – SIGMA – Concentração estoque de 6 μ M em meio RPMI.

Soluções

HBSS (Salina balanceada de Hank) - SIGMA

Meio RPMI 1640 – SIGMA

Salina Tamponada por Fosfato (PBS) – SIGMA

Solução de Ciclo - Iodeto de Propídio 50µg/mL, RNase 1 mg/mL, Triton X-100 1%

Solução salina – 9g/L de NaCl, dissolvidos em água destilada.

Soro Fetal Bovino (SFB) – Gibco BRL – distribuído em alíquotas e mantido congelado a -20°C.

Tampão de ligação para Anexina-V - BD Bioscience

Solvente

Dimetilsufóxido (DMSO) – SIGMA

Linhagens Celulares

K562 - A linhagem K562 foi originalmente obtida de uma paciente com leucemia mielóide crônica em fase blástica. É derivada de precursores multipotentes hematopoiéticos e possui o cromossomo Philadelphia (Ph) característico de leucemias mielóides (Lozzio e Lozzio, 1975).

Lucena-1 - A linhagem K562-Lucena-1 é derivada da K562 e foi produzida no nosso laboratório com a exposição à substância Vincristina, começando com a concentração de 3 nanomolar e aumentando progressivamente até a concentração de sessenta nanomolar, selecionando as células resistentes. A linhagem Lucena-1 apresenta uma alta expressão do gene *mdr1* responsável pela transcrição da ABCB1, apresentando um fenótipo MDR, o qual é revertido pelos quimiosensibilizantes Verapamil e Ciclosporina A, D e G. Possui também alta resistência a stress oxidativo, sendo resistente à presença de peróxido e a exposição à radiação UVA. Levando em consideração que esta não possui a mesma resistência a UVB ou UVC, acredita-se que essa resistência se deva justamente ao UVA produzir peróxidos, tendo a linhagem Lucena-1, alta atividade de catalase. Há também uma alteração no citoesqueleto em relação a K-562. Foram mostrados maiores níveis de mRNA de actina e tubulina quando comparados a sua antecessora. Essas alterações na linhagem Lucena-1, a tornam mais resistente a quimioterápicos que a K562, podendo-se realizar um estudo comparativo de substâncias em relação a essas linhagens (RUMJANEK et al., 2001).

FEPS - A linhagem FEPS foi selecionada a partir da parental K562, por exposições crescentes ao fármaco daunorrubicina (DNR), a partir de de 9,4 nM com aumento

gradativo, resistindo a concentrações de até 466 nM e sendo mantidas em meio contendo essa concentração. Essa linhagem possui níveis de Bcl-2 e p53 semelhantes à parental, porém superexpressa ABCB1 e ABCC. Essa linhagem também possui um crescimento mais lento em relação à parental (DA SILVA et al., 2007).

Raji - A linhagem Raji foi originalmente obtida de um linfoma maxilar de Burkitt. É uma linhagem de linfócito B, parcialmente resistente ao vírus Epstein-Barr e frequentemente contendo o vírus e apresenta mutação na proteína p53, responsável por reparos de DNA, tornando-a não funcional (EPSTEIN E BARR, 1965; OHSUGI et al., 1980; PULVERTAFT, 1964; KROGER et al 2001). Essa linhagem expressa Bcl-2, Bcl-xL e Bax (KAUFMANN et al., 1998).

Daudi - A linhagem Daudi foi originalmente obtida de um paciente com linfoma de Burkitt. A linhagem é negativa para beta-2-microglobulina (sIg+) e Bcl-2 (ESPOSTI et al., 1999; SANGFELT et al., 1997) e carrega o vírus Epstein-Barr (NILSSON et al., 1977). Essa linhagem também possui perda de função da proteína p53 devido a mutação (MARCHES et al., 1999).

HL60 - A linhagem HL-60 foi originalmente obtida de uma paciente com leucemia promielocítica aguda. É sensível a estresse oxidativo, contendo níveis reduzidos de glutathione (COLLINS et al., 1977; COLLINS et al., 1978; GALLAGHER et al., 1979). A linhagem HL-60 expressa Bcl-2, porém parece expressar Bcl-xL em níveis baixos (Dewson et al., 1999; Kaufmann et al., 1998).

Jurkat - A linhagem Jurkat foi originalmente obtida de um paciente com leucemia linfóide aguda (SCHNEIDER et al., 1977). Possui expressão alta de Bcl-2 e Bcl-xL, e não expressa Bax (BRIMMELL et al., 1998; KAUFMANN et al., 1998; SINGHAL et al., 1999).

3.2. Métodos:

3.2.1. Linhagens celulares e cultura de células:

Foram utilizadas as linhagens de leucemia mielóide K562, HL60 e duas linhagens MDR derivadas de K562, Lucena-1 e FEPS. Utilizou-se também as linhagens de leucemia linfóide B Daudi e Raji e a linhagem Jurkat de linfócito T.

As células K562, FEPS, Lucena-1, HL60 e Raji foram mantidas em cultura, na concentração de 2×10^4 células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), em estufa a 37°C com 5% de CO₂, com passagens regulares 2 vezes por semana.

A célula Daudi, diferente das outras linhagens, foi mantida em 20% de SFB.

A célula Jurkat foi mantida na concentração de 1×10^5 células/mL.

No caso da célula Lucena-1, o meio foi suplementado com a concentração de 60 nM de sulfato de vincristina. E no caso da célula FEPS, o meio foi suplementado com o fármaco daunorrubicina (DNR), na concentração de 466 nM.

3.2.2. Método colorimétrico MTT:

A fim de se medir a viabilidade celular após incubação com as diversas substâncias, as células leucêmicas foram testadas utilizando-se o ensaio colorimétrico com MTT (brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2-5-difeniltetrazol) (Mossmann, 1983; Denizot e Lang,

1986; Barile, 1994). As células foram colocadas em cultura (200 μ L por poço) em uma placa de 96 poços com fundo chato em meio RPMI com 10% de SFB (20% no caso da Daudi), a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, na concentração final de 2x10⁴ células/mL (em triplicatas), na presença das substâncias testadas ou na presença de meio RPMI. A linhagem Jurkat foi incubada na concentração de 2x10⁵ células/mL, e as células mononucleares de sangue periférico a 10⁶ células/mL.

Depois de 3 dias de cultura, foram adicionados 20 μ L de MTT (5mg/mL) às células e estas foram incubadas por 3 h. Após isso, as placas foram centrifugadas por 7 min a 1500 rpm, e o sobrenadante foi removido, mantendo os cristais de formazan azul-arroxeados formados pela reação do MTT com as desidrogenases mitocondriais. Esses cristais foram diluídos em 200 μ L de DMSO, formando uma solução heterogênea.

Após este procedimento a intensidade da coloração formada pôde ser medida em leitor de ELISA (Tecan Sunrise ELISA reader) a um comprimento de onda de 490 nm. Como branco, descontado dos valores obtidos, foi utilizado apenas meio e 10% SFB, e como controles, somente células na ausência dos compostos. As leituras foram feitas em triplicatas.

3.2.3. *Separação de células mononucleares de sangue periférico:*

A fim de avaliar o efeito da substância LQB 118 em células normais, utilizou-se células mononucleares de sangue periférico.

O sangue periférico foi obtido de doadores saudáveis, com uso de seringa heparinizada, a fim de se impedir a coagulação, e colocado cuidadosamente em tubos de 15mL contendo Histopaque, substância capaz de formar um gradiente de densidade que possibilita a separação dos diferentes tipos celulares do sangue. A proporção usada foi de 3 de histopaque para 1 de sangue. O sangue com o histopaque foi centrifugado por 30 minutos a 1500 rpm. No precipitado são encontradas as hemácias e células polimorfonucleares em sua maioria, enquanto que o sobrenadante é composto basicamente pelo plasma e uma camada de histopaque. Entre essas duas camadas formam-se uma interface da qual pode-se extrair as células mononucleares. Estas foram lavadas 3 vezes em PBS ou salina e posteriormente ressuspensas em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino.

3.2.4. *Ativação de Linfócitos Normais por PHA:*

As células mononucleares (80% linfócitos) foram ajustadas para uma concentração de 1×10^6 /mL, correspondente à concentração dessas células circulantes no sangue. A incubação com os compostos se deu na presença de $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ de fitohemaglutinina (PHA), um conhecido agente mitógeno, já que células em divisão são normalmente mais sensíveis a quimioterápicos em geral.

3.2.5. *Cálculo do CE50 do composto nas diferentes linhagens:*

O cálculo da Concentração Eficaz Média (CE50) foi feito utilizando os dados dos experimentos realizados com as substâncias em cada linhagem.

O valor do CE50 foi mensurado a partir da análise de regressão linear ou não-linear realizada utilizando GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

3.2.6. *Análise de expressão de ABCB1:*

As células Lucena-1 foram tratadas com 1,5 μ M de LQB 118 por 24h, 48h ou 72h. As células então foram lavadas com PBS + 5% de SFB. Essas células foram colocadas em uma placa em "U" de 96 poços e incubadas com 5mL de FITC conjugado a um anticorpo monoclonal de ABCC1. As células então foram lavadas em PBS + 5% de SFB e analisadas em citometria de fluxo usando o filtro FL1 (FACScan - Beckton-Dickson).

3.2.7. *Ensaio de Anexina e Iodeto de Propídeo (PI) por citometria de Fluxo:*

A Anexina é uma lectina que se liga a fosfatidil serina (expostos por células apoptóticas) e o PI tem a capacidade de intercalar ao DNA, desde que a célula apresente sua membrana permeável (característica necrótica). As células K562 e Jurkat foram mantidas na concentração de 2×10^4 (K562) e 1×10^5 (Jurkat) células por mL na presença da

substâncias LQB 118 em 3 μM (K562) e 8 μM (Jurkat) por 24h, 48 e 72 h em uma placa de 12 poços. Posteriormente as células foram lavadas e incubadas com 100 μL da solução contendo Anexina V-FITC em tampão de ligação (1:500) por 20 minutos. Após isso foram acrescentados 200 μL de tampão de ligação e 1 μL de iodeto de propídeo (PI). As amostras foram então analisadas em Citômetro de Fluxo FACScan. Os dados foram analisados com a utilização do programa Summit.

3.2.8. Análise de Cálcio Intracelular

Para observar as mudanças na concentração de cálcio intracelular, foi usado o fluorocromo Fluo-3 AM. As células foram pre-incubadas com 5 μM de Fluo-3 AM e 2,5 mM de Probenecide por 1h em uma placa em fundo "u" (96 poços) em meio RPMI. Após esse tempo, as células foram lavadas com PBS e incubadas em meio com 3 μM ou 8 μM de LQB 118 e 2,5 mM de Probenecide por 10min, 30min ou 1h ou tratadas com 3 ou 8 μM de LQB 118 e 5 mM de EDTA por 30 min. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (FACScan), utilizando o filtro FL1.

3.2.9. Análise de Potencial de Membrana Mitocondrial

As células K562 e Jurkat foram mantidas na concentração de 2×10^4 (K562) e 1×10^5 (Jurkat) células por mL na presença das substâncias LQB 118 em 3 μM (K562) e 8 μM (Jurkat) por 24h, 48 e 72h em uma placa de 12 poços. Posteriormente as células foram lavadas e incubadas com 199 μL de meio RPMI e SFB e 1 μL de DioC6 por 30 min. Para

os ensaios de 30 min, as células foram incubadas com DioC6 e com 3 ou 8 μM de LQB 118 na presença ou ausência de 5 μM de BAPTA-AM. As amostras foram então analisadas em Citômetro de Fluxo FACScan. Como controle positivo foi utilizado o desacoplador FCCP.

3.2.10. Análise de Ciclo Celular

Utilizando iodeto de propídio (PI), que se liga ao DNA, é possível analisar por citometria o percentual de células em cada fase do ciclo celular das populações analisadas. As células das linhagens K562 (2×10^4 células/mL) e Jurkat (1×10^5 células/mL) foram incubadas com a substância LQB 118 com 3 μM e 8 μM respectivamente. Paralelamente, células foram crescidas na ausência dessas substâncias para análise de controle negativo. Após 24h, 48h e 72h do período de incubação, células de cada amostra foram lavadas em salina balanceada de Hanks (HBSS) e ressuspensas em solução de ciclo (ver materiais). O Triton é um detergente utilizado para lisar a membrana plasmática das células e permeabilizar a membrana nuclear favorecendo a incorporação do PI ao DNA. A solução é diluída 5X em HBSS previamente à incubação. São adicionados 300 μL em cada amostra. Após 10 minutos na temperatura ambiente, as amostras são analisadas por citometria de fluxo (FACScan), utilizando-se o filtro FL2-area.

3.2.11. *Análise de Ativação de Caspases*

O ensaio de caspase-12 foi realizado utilizando o kit CaspGLOW Green Caspase-12 Staining Kit. K562 ou Jurkat foram cultivadas em 2×10^4 células/mL ou 1×10^5 células/mL respectivamente com $3 \mu\text{M}$ (K562) ou $8 \mu\text{M}$ (Jurkat) de LQB por 24h, 48h e 72h. Após esse tempo, as células foram lavadas e incubadas com FITC-ATAD-FMK (inibidor específico de Caspase-12) por 40 min. Após a incubação, as células foram lavadas 3 vezes a $3000\text{g}/5$ min.

O ensaio de Caspase-9 foi realizado utilizando o kit CaspGLOW Green Caspase-9 staining Kit. K562 ou Jurkat foram cultivadas em 2×10^4 cels/mL ou 1×10^5 cels/mL respectivamente com $3 \mu\text{M}$ (K562) ou $8 \mu\text{M}$ (Jurkat) de LQB por 24h, 48h e 72h. Após esse tempo, as células foram lavadas e incubadas com FITC-LEHD-FMK (inibidor específico de Caspase-9) por 40 min. Após a incubação, as células foram lavadas e centrifugadas 3 vezes a $3000\text{g}/5$ min.

4. *Resultados*

4.1. *Manifestação do Fenótipo MDR*

A fim de demonstrar o fenótipo MDR presente nas linhagens Lucena-1 e FEPS, nós utilizamos dois quimioterápicos usados na clínica, a Vincristina, conhecido substrato para a proteína ABCB1 e a Daunorrubicina, substrato da proteína ABCC. Como controle usamos a linhagem parental K562, que possui baixíssima expressão dessas proteínas. Estudamos também nas células K562 e Lucena-1 a resposta ao quimioterápico Mitomicina C, uma quinona também utilizada na clínica para o tratamento de diversos tipos de tumores.

A figura 18 indica que Lucena-1 é em torno de 20 vezes mais resistente à Vincristina vezes maior que a linhagem parental, visto que na linhagem K562, em 6 nM já há grande efeito tóxico e na linhagem Lucena-1 só aparece em 120nM. Quando testou-se Mitomicina C, a linhagem Lucena-1 mostrou-se também resistente a essa quinona (Fig 190). Esses experimentos mostram a necessidade de encontrar quimioterápicos que sejam efetivos mesmo em linhagens resistentes.

Já a linhagem FEPS é extremamente resistente à Daunorrubicina quando comparada à K562, visto que daunorrubicina já apresenta efeito tóxico em 75nM e morre em 900nM enquanto que a esse quimioterápico não apresenta efeito tóxico para a linhagem FEPS. (Fig 20).

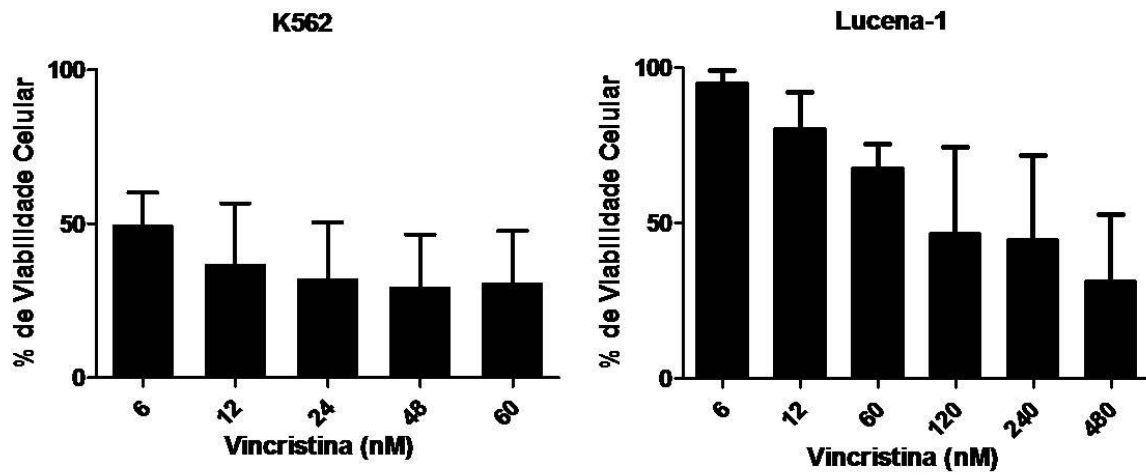


Fig 18. Quimioterápico Vincristina testado na linhagem K562 nas concentrações de 6nM, 12nM, 24nM, 48nM, 60nM e Lucena-1 (MDR) nas concentrações de 6nM, 12nM, 60nM, 120nM, 240nM e 480nM. A viabilidade foi obtida pelo método MTT, após incubação de 3 dias com o quimioterápico. O resultado obtido é a média de 3 experimentos com desvio padrão. Valores normalizados para porcentagem em relação ao controle.

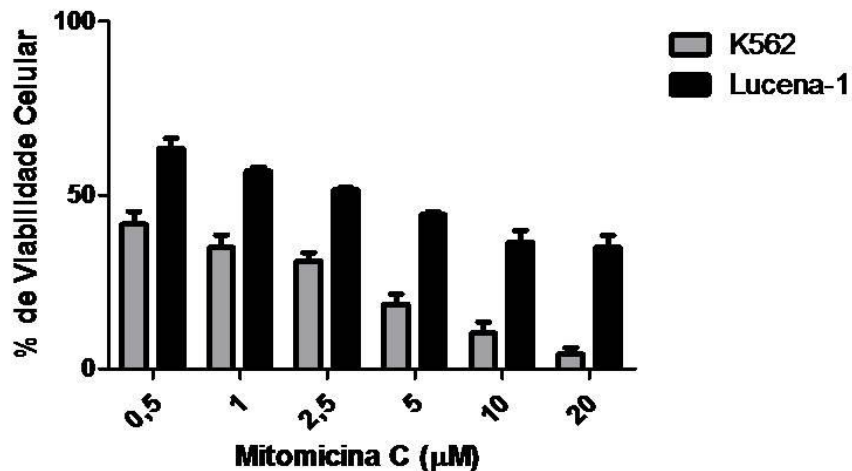


Fig 19. Quimioterápico Mitomicina C testado nas linhagens K562 e Lucena-1 (MDR) nas concentrações de 0.5 μM, 1 μM, 2.5 μM, 5 μM, 10 μM e 20 μM. A viabilidade foi obtida pelo método MTT, após incubação de 3 dias com o quimioterápico. O resultado obtido é a média de 3 experimentos com desvio padrão. Valores normalizados para porcentagem em relação ao controle.

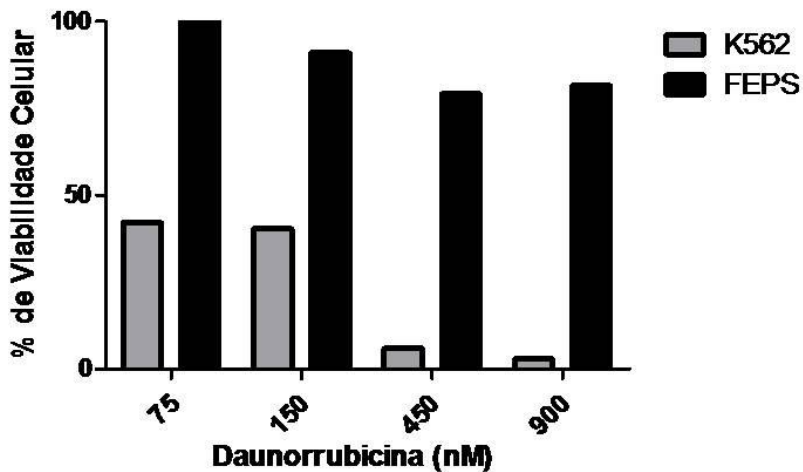


Fig 20. Quimioterápico Daunorubicina testado nas linhagem K562 e FEPS nas concentrações de 75nM, 150 nM, 450 nM e 900 nM. A viabilidade foi obtida pelo método MTT, após incubação de 3 dias com o quimioterápico. Valores normalizados para porcentagem em relação ao controle.

4.2. Efeito do composto sintético LQB 118 em linhagens de leucemia mielóide

Na busca de novos quimioterápicos que fossem eficazes em células resistentes, estudamos a pterocarpanoquinona LQB 118. Esse composto foi testado inicialmente em três linhagens de leucemia mielóide crônica: duas linhagens resistentes a múltiplas drogas, uma superexpressando ACBB1 (Lucena-1) e outra superexpressando ABCB1 e ABCC1 (FEPS) e sua parental K562. O composto LQB 118 também apresentou um efeito citotóxico significativo contra todas as três linhagens, sem diferença de magnitude entre elas, tendo já 2,5 μ M matado em torno de 50% das células e tendo um efeito de quase 100% em 5 μ M. (Fig 21 e 22).

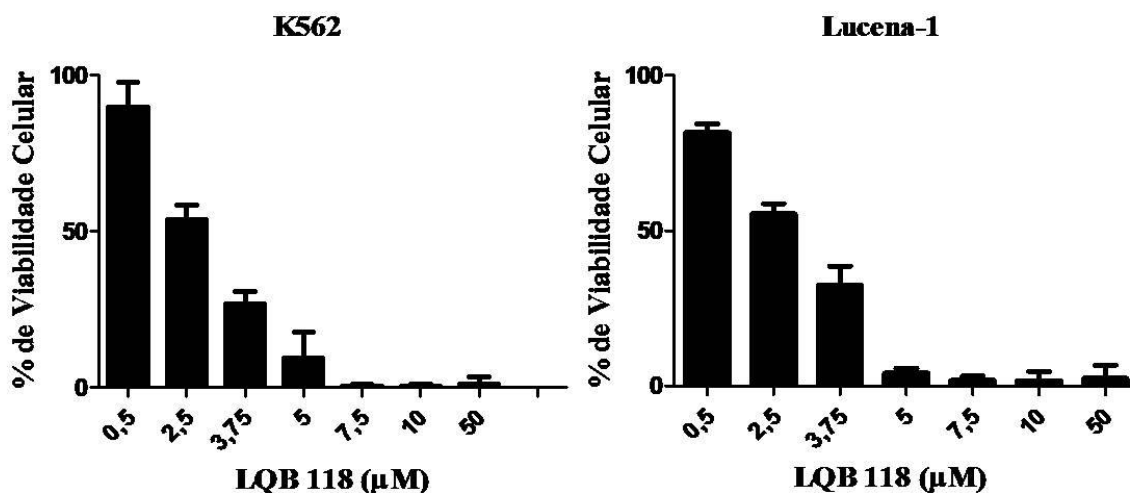


Fig 21. Composto LQB118 testado nas linhagem K562 e Lucena-1 nas concentrações de 0.5 μ M, 2.5 μ M, 3.75 μ M, 5 μ M, 7.5 μ M, 10 μ M e 50 μ M. A viabilidade foi obtida pelo método MTT, após incubação de 3 dias com a LQB. O resultado obtido é a média de 3 experimentos com desvio padrão. Valores normalizados para porcentagem em relação ao controle

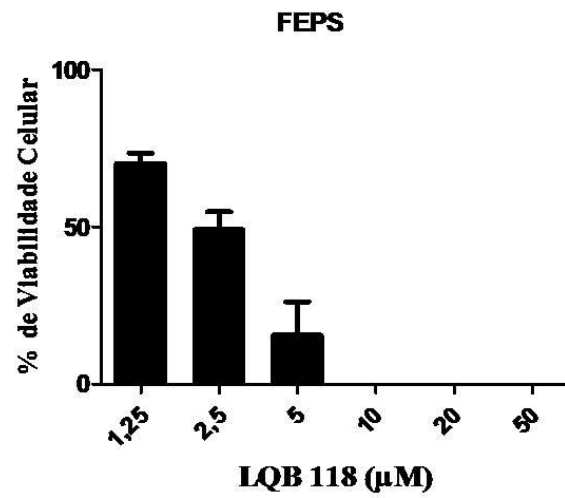


Fig 22. Composto LQB118 testado na linhagem FEPS nas concentrações de 1,25 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM e 50 µM. A viabilidade foi obtida pelo método MTT, após incubação de 3 dias com a LQB. O resultado obtido é a média de 3 experimentos com desvio padrão. Valores normalizados para porcentagem em relação ao controle

Além disso, em um trabalho em colaboração com a Dra Raquel Maia do Laboratório de Hematologia Molecular no INCA, foi possível demonstrar que células Lucena-1 expostas a uma baixa dose de LQB 118 (1,5 μ M) demonstraram menor expressão de ABCB1 (Fig 23).

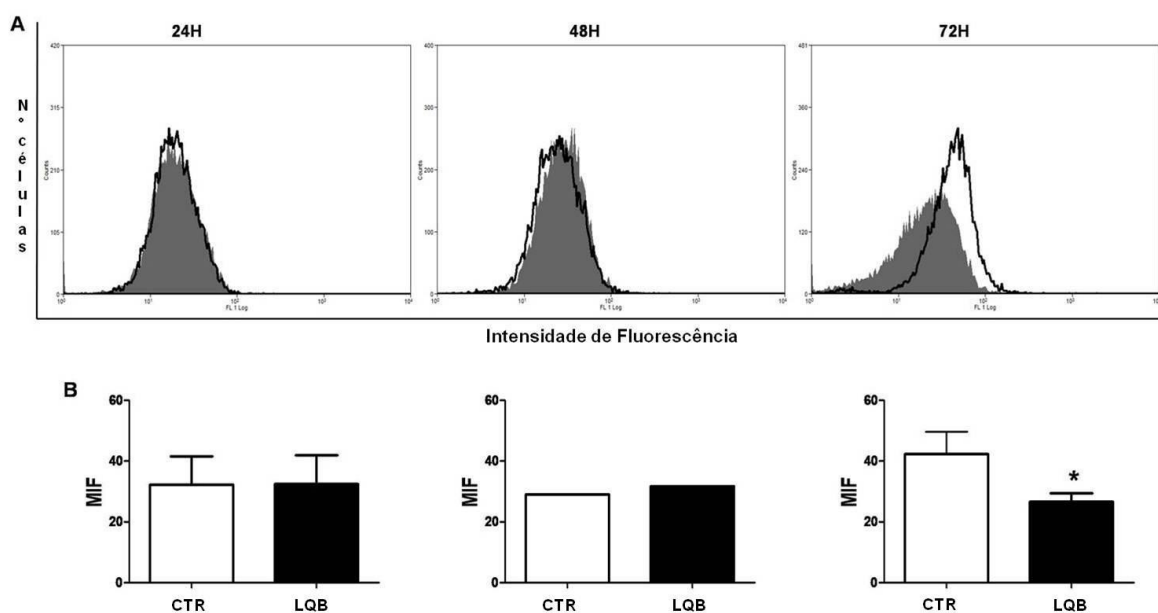


Fig 23. Análise de expressão de ABCB1 na membrana plasmática por citometria de fluxo em linhagem Lucena-1. As células foram tratadas com 1,5 μ M de LQB 118 por 24h, 48h e 72h e após isso, a expressão de ABCB1 foi quantificada com o uso de um anticorpo para essa proteína acoplado a FITC, a leitura foi feita com o filtro FL1. * $p < 0,05$. A) Histograma representativo, a linha preta sem preenchimento corresponde ao controle e o histograma cinza às células tratadas com 1,5 μ M de LQB 118. B) Gráfico de barras correspondente a 3 experimentos. Barra branca corresponde ao controle e a barra preta às células tratadas com LQB 118.

4.3. Efeito do LQB 118 na linhagem HL60 sensível a estresse oxidativo

As naftoquinonas lapachol e beta-lapachona tem como mecanismo de ação a indução de estresse oxidativo (da Silva et al., 2003). A fim de verificar a presença desse mecanismo na ação do composto LQB 118, foi realizado um ensaio de viabilidade em uma linhagem de leucemia promielócítica HL60, sensível a estresse oxidativo, e essa linhagem foi apenas um pouco mais sensível à ação da LQB se comparado às outras linhagens de leucemia mielóide (Fig. 24).

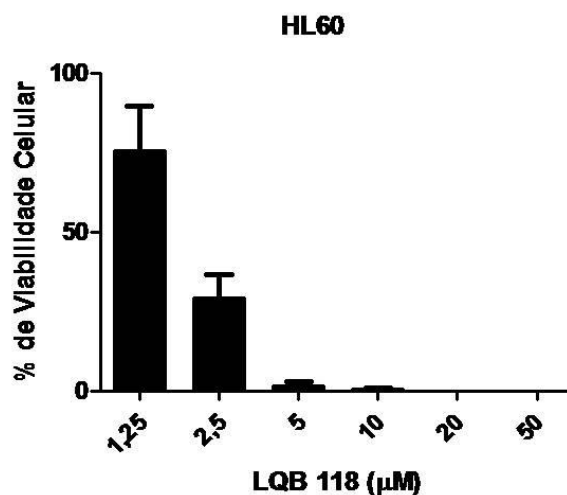


Fig 24. Composto LQB118 testado na linhagem HL60 nas concentrações de 1,25 μM, 2,5 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM e 50 μM. A viabilidade foi obtida pelo método MTT, após incubação de 3 dias com LQB. O resultado obtido é a média de 3 experimentos com desvio padrão. Valores normalizados para porcentagem em relação ao controle

4.4. Efeito do LQB 118 em linhagens de leucemia linfóide B

Com o objetivo de avaliar se o composto LQB 118 possuía efeito somente específico para leucemias mielóides, esse foi testado em duas linhagens de linfócito B, Raji e Daudi, que apresentam mutação na proteína p53, tornando-a não funcional. O composto LQB 118 apresentou eficácia também nas linhagens Raji (p53 missense) e Daudi (p53 nonsense) em magnitude semelhante às linhagens mielóides, independente das mutações na proteína p53 (Fig 25). Mutações em p53 geralmente tornam as células mais resistentes a diversos quimioterápicos, porém, esse composto parece induzir morte independente de p53.

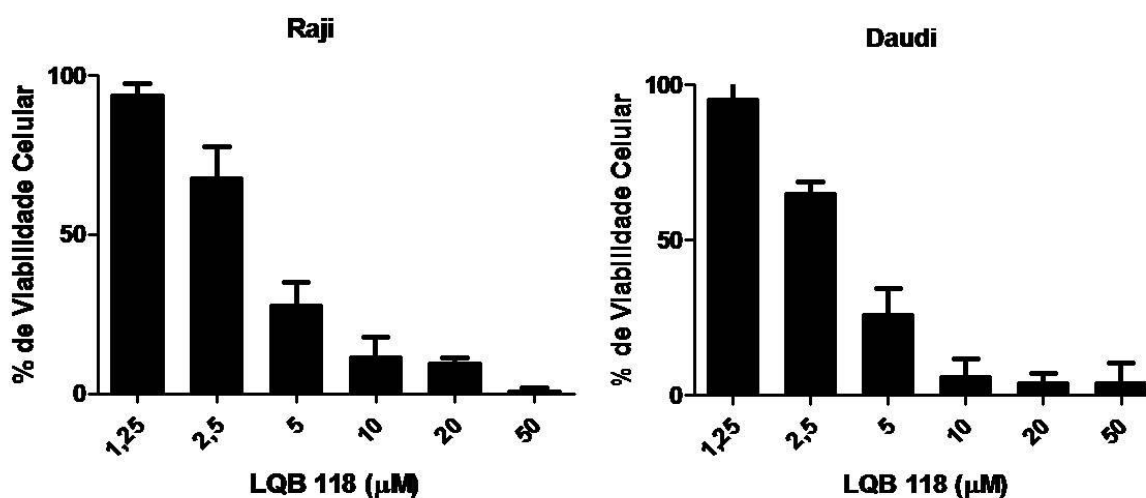


Fig 25. Composto LQB118 testado nas linhagens Raji e Daudi nas concentrações de 1,25 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM e 50 µM. A viabilidade foi obtida pelo método MTT, após incubação de 3 dias com LQB. O resultado obtido é a média de 3 experimentos com desvio padrão. Valores normalizados para porcentagem em relação ao controle.

4.5. Efeito do LQB 118 na linhagem de leucemia de linfócito T Jurkat

As células T são células altamente resistentes a quimioterápicos, os mecanismos mais clássicos que justificam sua resistência são pela expressão diferenciada de proteínas que controlam a apoptose. Neste estudo, foi avaliada a sensibilidade de células da linhagem Jurkat em relação ao LQB 118. Essa linhagem mostrou-se mais resistente ao LQB 118 quando comparada às linhagens de leucemia mielóide crônica (Fig 26).

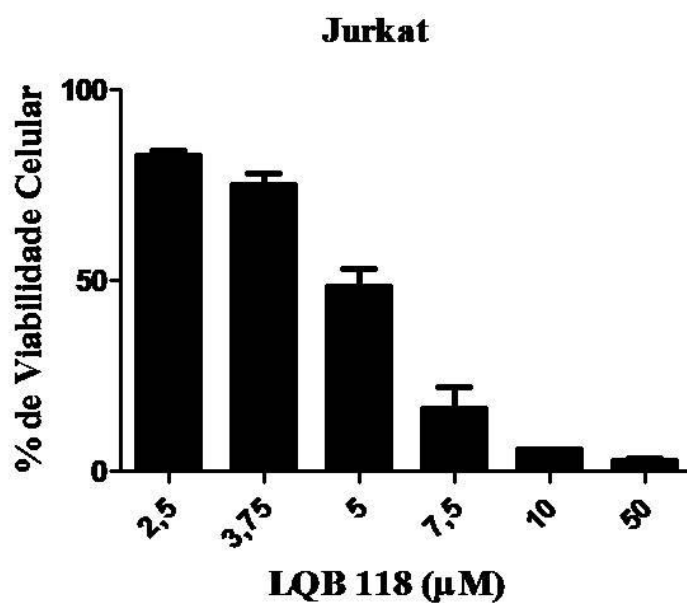


Fig 26. Composto LQB118 testado na linhagem Jurkat nas concentrações de 2,5 µM, 3,75 µM, 5 µM, 7,5 µM, 10 µM e 50 µM. A viabilidade foi medida pelo método MTT, após incubação de 3 dias com LQB. O resultado obtido é a média de 3 experimentos com desvio padrão. Valores normalizados para porcentagem em relação ao controle.

4.6. Cálculo do CE_{50} para a LQB 118

Foram calculados os CE_{50} do LQB 118 para K562, Lucena-1, FEPS, HL-60, Raji, Daudi e Jurkat (Tabela 1). CE_{50} é a concentração eficaz média, ou seja, a dose necessária para uma substância realizar 50% do seu efeito.

Linhagens	Lapachol	LQB 118
K562	16,76± 4,406	2,67± 0,144
Lucena-1	22,14± 8,127	2,62± 0,087
FEPS	NR	2,72± 0,171
HL-60	NR	1,91± 0,330
Daudi	25,18± 4,928	3,57± 0,548
Raji	NR	3,66± 0,148
Jurkat	NR	4,99± 0,349

Tabela 1. Comparação de concentração eficaz média (CE_{50}) do Lapachol e do LQB 118 em linhagens leucêmicas. Valores de CE_{50} (concentração em μM) para as linhagens testadas. NR= não realizado

4.7. Efeito do LQB 118 em células normais

A fim de avaliar se esse composto seria tóxico em células de tecidos normais e também para estimar uma janela terapêutica do uso desse composto, o LQB 118 foi testada em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) ativadas pelo mitógeno PHA. O PHA é um mitógeno capaz de ativar linfócitos, fazendo-os proliferar. Uma vez que quimioterápicos geralmente atuam especialmente em células que proliferam, o nós utilizamos PHA para ver se o composto seria tóxico contra células normais com capacidade proliferativa. O composto se mostrou seletivo para células tumorais, visto que foi necessária uma concentração mais alta desse ($CE_{50}=18,6\pm 5,74 \mu M$) para que haja efeito tóxico nessas células (Fig 27).

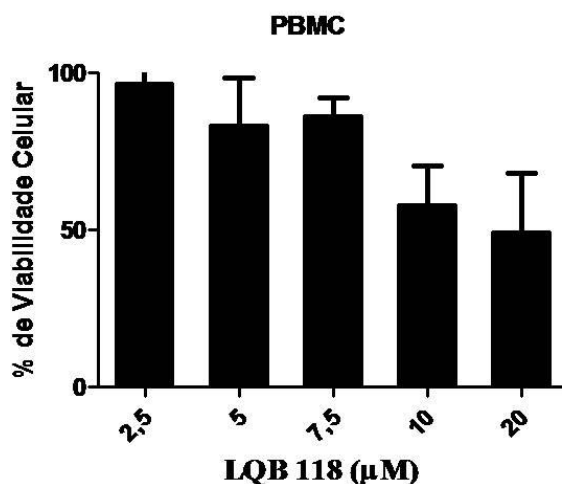


Fig 27. Composto LQB118 testado nas concentrações de 2,5 µM, 3,75 µM, 5 µM, 7,5 µM e 10 µM e 20 µM em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de doadores saudáveis ativadas por PHA. A viabilidade foi obtida pelo método MTT, após incubação de 3 dias com LQB. O resultado obtido é a média de 3 experimentos com desvio padrão. Valores normalizados para porcentagem em relação ao controle.

4.8. Avaliação de apoptose e necrose em células de leucemia mielóide crônica e leucemia T do adulto

Os resultados anteriores sugeriram que havia uma diferença clara em termos de susceptibilidade entre a linhagem de leucemia mielóide crônica K562 e da leucemia T Jurkat. Para saber se o composto induzia morte pela via apoptótica ou pela via necrótica foi feito um ensaio de anexina/PI. A anexina se liga aos resíduos de fosfatidilserina em células apoptóticas e o PI entra em células com a membrana rompida (necróticas). Sendo assim nós temos que células marcadas com anexina apresentam apoptose, células com PI apresentam necrose e células com dupla marcação apresentam apoptose tardia, ou necrose secundária. Células que entram em apoptose geralmente são fagocitadas, porém sem a presença de fagócitos, essas células prosseguem na via apoptótica até o rompimento da membrana plasmática, permitindo a entrada de PI e com isso a dupla marcação. Nós utilizamos concentrações acima do CE50 das duas linhagens. A CE50 de K562 era 2,7 μM e utilizamos 3 μM e a de Jurkat era de 5 μM e utilizamos 8 μM .

Como pôde ser observado na figura 28 e tabela 2, ambas as linhagens morreram por apoptose, porém na linhagem K562, o efeito ocorreu em 24h enquanto na linhagem Jurkat o efeito parece ocorrer entre 24h e 48h, uma vez que em 24h não há grandes diferenças em relação ao controle e em 48h já há células em necrose secundária.

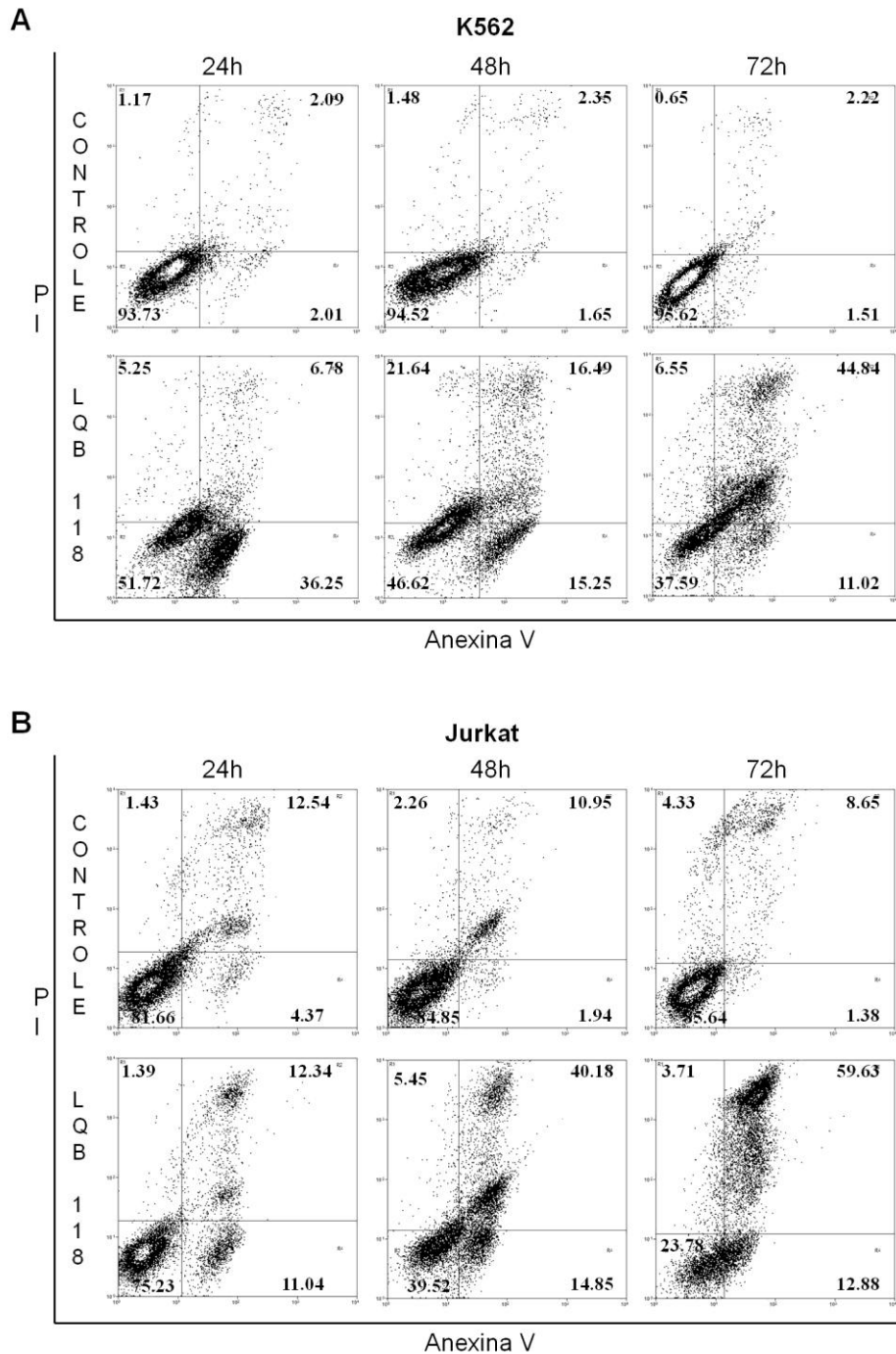


Fig 28. Ensaio de anexina/PI nas linhagens K562 com 3 μ M LQB 118 (A) e Jurkat com 8 μ M de LQB 118 (B). Os ensaios de anexina/PI foram obtidos após 24, 48 e 72h de incubação. O resultado obtido é representativo de 3 experimentos.

		Anexina	Anexina + PI	PI
	24h	20.13± 7.08	5.04± 1.09	8.13± 5.92
K562	48h	14.16± 5.21	26.06± 6.2	13.45± 5.48
	72h	4.49± 2.31	28.51± 4.99	14.67± 3.83
	24h	7.37 ±2.46	1.73± 1.09	0.23 ±0.23
Jurkat	48h	12.56± 0.35	27.21± 1.37	4.13± 0.94
	72h	21.64± 7.1	40.81± 5.2	0.68± 0.68

Tabela 2. Índices de apoptose (anexina), apoptose tardia (anexina+PI) e necrose (PI) em linhagens K562 e Jurkat nas concentrações de 3 μ M e 8 μ M. Os ensaios de anexina/PI foram obtidos após 24, 48 e 72h de incubação. A tabela representa a média de 3 experimentos \pm desvio padrão. Os resultados foram normalizados em porcentagem de células e normalizados pelo controle.

4.9. *Análise de ciclo celular nas duas linhagens tratadas com LQB*

118

Uma das propostas de ação do composto é de ligante e DNA. Com isso o composto atuaria provavelmente nas fases S ou G2 do ciclo celular. A fim de tentar identificar a fase do ciclo em que o composto estaria atuando e para confirmar apoptose através de fragmentação de DNA, foi realizado um ensaio de ciclo celular em citometria de fluxo. O composto induziu fragmentação de DNA em K562 (Figura 29A, sub-G1) em todos os tempos testados (em torno de 20%), e houve também uma queda significativa na população G1 a partir de 24h (em torno de 10%) e uma queda nas populações G2 (6%) e S (6%) em 24h e 72h respectivamente. Em Jurkat (figura 29B) observou-se uma pequena fragmentação de DNA já em 24h (6%), e esse efeito aumentou em 48h (17%), sendo acompanhado por uma queda na população G1 (22%). Em 72h, foi observado também fragmentação de DNA (22%), acompanhada de uma queda nas populações G1 (16%) e G2 (5%) (Fig. 29). Esses resultados sugerem que o composto possa não atuar como ligante de DNA, visto que seu efeito parece ocorrer especialmente sobre a população G1.

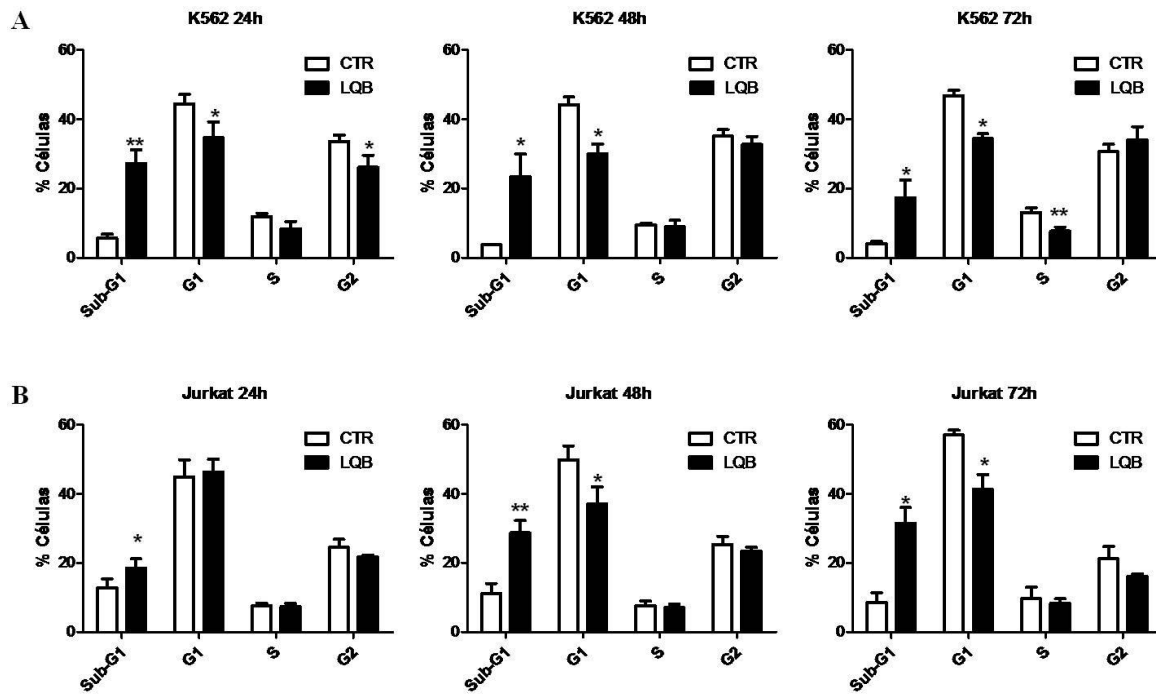


Fig 29. Análise de ciclo celular das linhagens K562 com ou sem 3 μ M (A) e Jurkat com ou sem 8 μ M (B) de LQB. O resultado é a média de 3 experimentos diferentes. *= p <0,05, **= p <0,01

4.1. Avaliação de Caspase-9 ativa

As várias vias de apoptose culminam com a ativação de caspase-9, uma das iniciadoras do processo apoptótico. Sendo assim, foi analisada a ativação de caspase-9 nas células K562 e Jurkat tratadas com 3 e 8 μM de LQB 118 respectivamente.

Na Fig. 30, pôde ser observado que tanto K562 quanto Jurkat mostram ativação de caspase 9, especialmente em 48, onde as as duas linhagens apresentaram em torno de 40% de células com caspase 9 ativada. Esta ativação continua aumentando em Jurkat até 72h (50%), porém, decai em K562 (20%) (possivelmente pelo excesso de células mortas que possuem já membrana plasmática permeável).

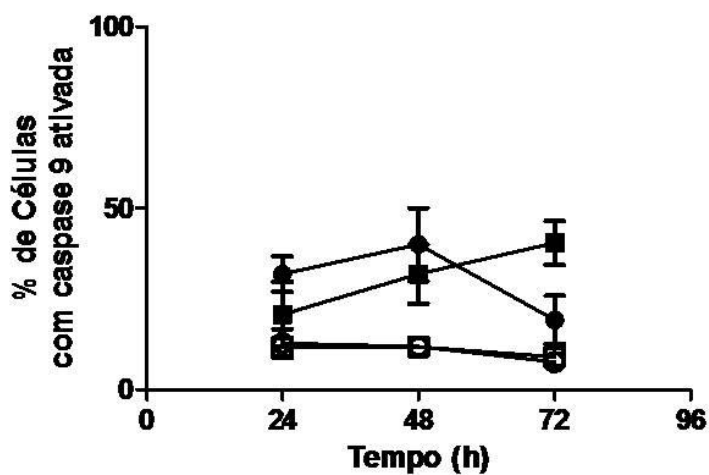


Fig 30. Ensaio de ativação de caspase-9 nas linhagens K562 e Jurkat tratadas com LQB 118. A linhagem K562 foi mantida por 24h, 48h e 72h sem (○) ou com (●) 3 μM de LQB 118 e a linhagem Jurkat foi mantida por 24h, 48h e 72h sem (□) ou com (■) 8 μM de LQB 118. Os resultados são a média de 3 experimentos com desvio padrão.

4.2. Mudanças no Potencial de Membrana Mitocondrial

Para poder identificar se o composto estaria induzindo apoptose pela via intrínseca foram avaliadas as mudanças no potencial de membrana mitocondrial com o uso de DiOC6. Como mostrado na figura 31, as células K562 sofreram grande despolarização em 24h (55% de células com despolarização) e 48h (61% de células com despolarização), e hiperpolarização em 72h (63 % de células com hiperpolarização). Essa hiperpolarização pode ocorrer em células no início da apoptose, precedendo a despolarização. Esse efeito também pode ser um acúmulo de DiOC6 devido a um aumento no volume da mitocôndria que também pode ocorrer no início da apoptose. Esses dados sugerem que essas células estariam morrendo pela via intrínseca (mitocondrial). Entretanto a linhagem Jurkat sofreu pouca despolarização nos tempos testados (15% em 24h), indicando que há um outro mecanismo envolvido na ação do LQB 118 nesta linhagem.

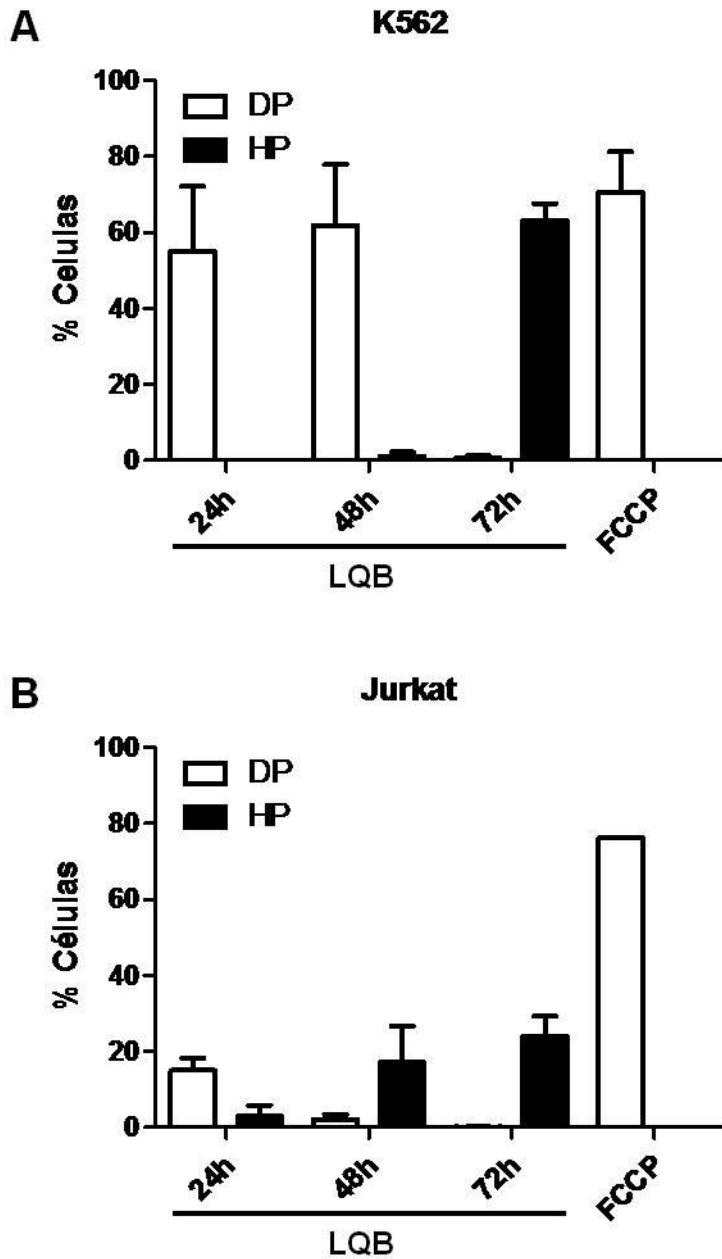


Figura 31. Ensaio de despolarização de membrana mitocondrial em células tratadas com DioC6. As células K562 foram incubadas por 24h, 48h e 72h com ou sem 3 μM de LQB 118 e as células Jurkat foram incubadas por 24h, 48h e 72h com ou sem 8 μM de LQB 118. DP= despolarização, HP= hiperpolarização. Os resultados representam a média de 4 experimentos, subtraído o controle. Como controle positivo, foi usado FCCP (50 μM), um desacoplador da cadeia respiratória.

4.3. Avaliação de Caspase-12 ativa

Uma outra via de morte apoptótica é a via de estresse do retículo endoplasmático, que parece ativar a caspase-12. Com isso, foi avaliada a ativação de caspase-12 em células K562 e Jurkat tratadas com 3 μM e 8 μM de LQB 118 respectivamente. Tanto as células K562 como as células Jurkat tiveram pico de ativação de caspase-12 em 48h, entretanto, o efeito em Jurkat foi de maior magnitude em relação a K562 (70% para Jurkat e 34% para K562) (Fig 32). Tanto K562 quanto Jurkat tiveram ativação de caspase-12 quando tratadas com 500 nM de taspigargina (TG), porém K562 mostrou maior ativação de caspase-12 em relação a Jurkat, contrapondo o que foi visto com a LQB 118.

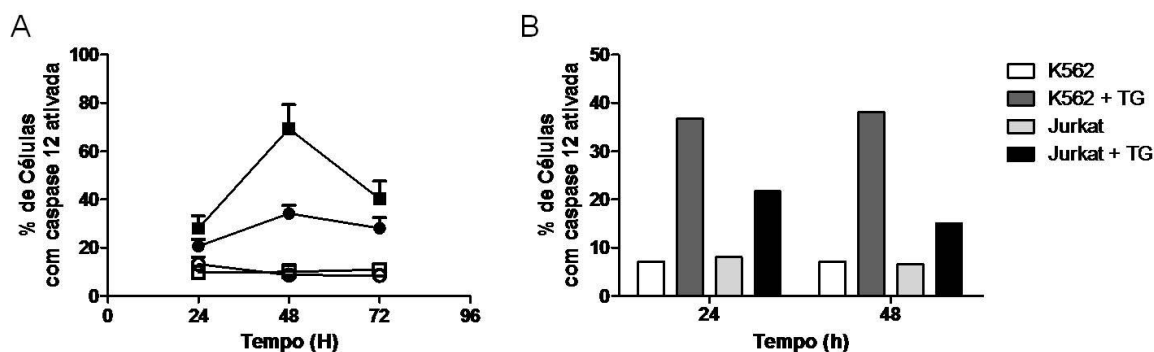


Figura 32. Ensaio de ativação de caspase-12 nas linhagens K562 e Jurkat. A linhagem K562 foi mantida por 24h, 48h e 72h sem (\circ) ou com (\bullet) 3 μM de LQB 118 e a linhagem Jurkat foi mantida por 24h, 48h e 72h sem (\square) ou com (\blacksquare) 8 μM de LQB 118. Os resultados são a média de 3 experimentos com desvio padrão. Como controle as células K562 foram mantidas por 24h e 48h sem (\circ) ou com (\bullet) TG 500 nM e Jurkat também foram mantidas por 24h e 48h sem (\square) ou com (\blacksquare) TG 500 nM.

4.4. Alterações na Concentração Intracelular de Cálcio

Uma das causas de estresse do RE é uma alteração na homeostase de cálcio, que pode sair do RE para o citoplasma. Por isso, avaliamos possíveis mudanças na concentração intracelular de cálcio nas linhagens K562 e Jurkat tratadas com 3 μM ou 8 μM de LQB 118. Tanto a linhagem K562 quanto a linhagem Jurkat sofreram aumento na concentração intracelular de cálcio nos primeiros 10 min, porém, o aumento do cálcio em K562 se estabilizou (e tornou de 73% de aumento), ao passo que em Jurkat apesar do aumento inicial ser igual ao de K562, pudemos observar uma subida gradual com o tempo (em torno de 70% em 10min e 2,5x em 60min). As concentrações utilizadas não mostraram diferenças entre si (Fig. 33). Tapsigargina (TG) na concentração de 500 nM também foi capaz de mobilizar cálcio em proporções semelhantes as observadas com o composto LQB 118.

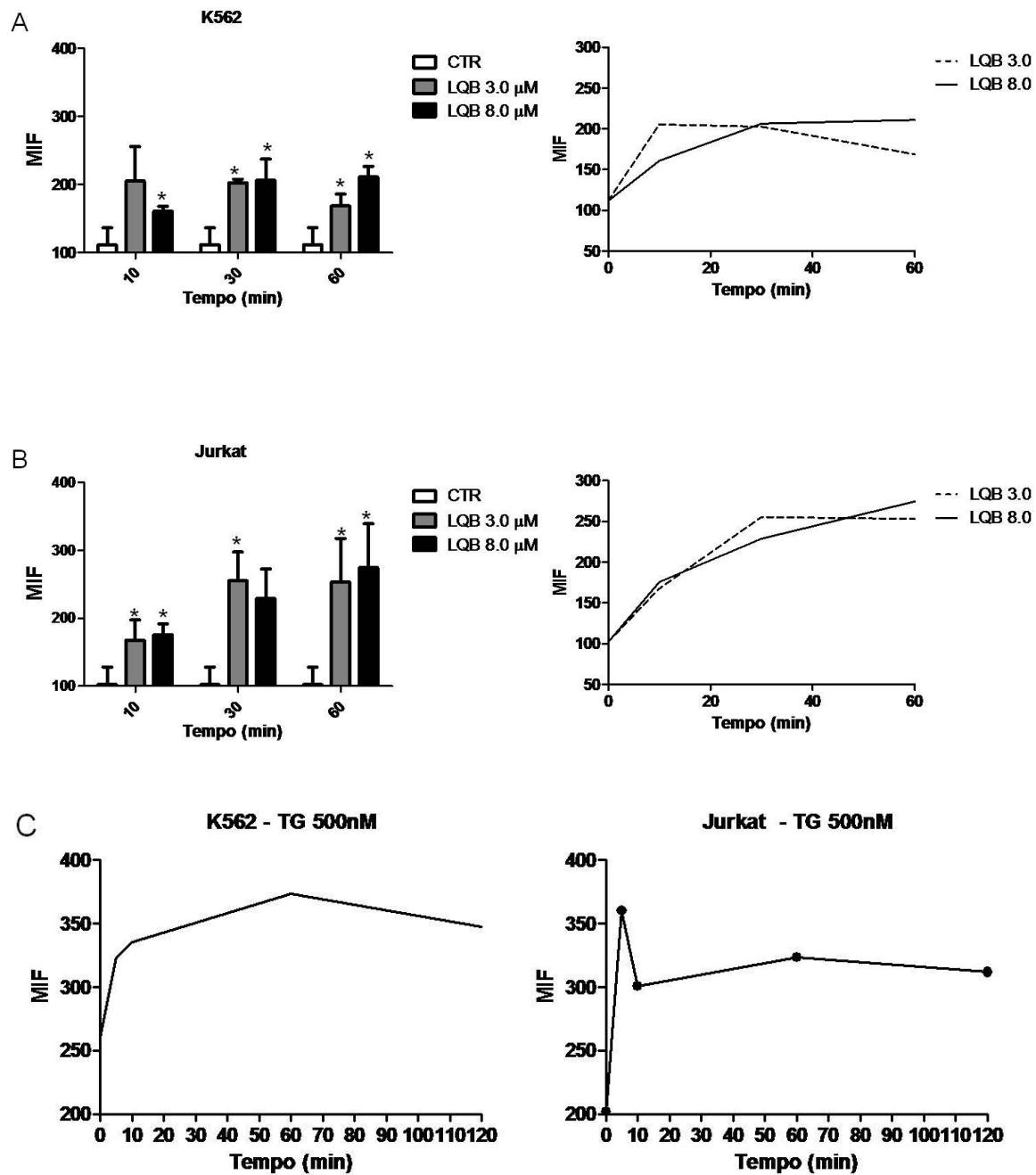


Fig 33. Ensaio de cálcio intracelular nas linhagens K562 (A) e Jurkat (B) tratadas com 3 ou 8 μ M de LQB 118. As células foram pré incubadas com Fluo-3 e depois mantidas com ou sem LQB 118 por 10, 30 ou 60 min. Os resultados são a média de 4 experimentos \pm desvio padrão. Como controle foi usado 500 nM de TG por 5, 10, 60 e 120 min (C). MIF = média da intensidade de fluorescência.

4.5. Influxo de Cálcio Extracelular

O aumento na concentração de cálcio no citoplasma da célula pode ocorrer pela liberação dos estoques intracelulares de cálcio ou pelo influxo de cálcio extracelular através de canais de cálcio. Para identificar por qual mecanismo estaria ocorrendo o aumento de cálcio causado pela LQB-118, nós utilizamos EDTA, um quelante de cálcio extracelular. Como mostrado na figura 35, a adição do EDTA aboliu o aumento de cálcio induzido pela LQB 118 na linhagem Jurkat (Fig34b), nas concentrações usadas. Também houve diminuição do efeito na linhagem K562 (Fig 34A), apesar do uso do EDTA sozinho, reduzir a concentração intracelular de cálcio nessas células.

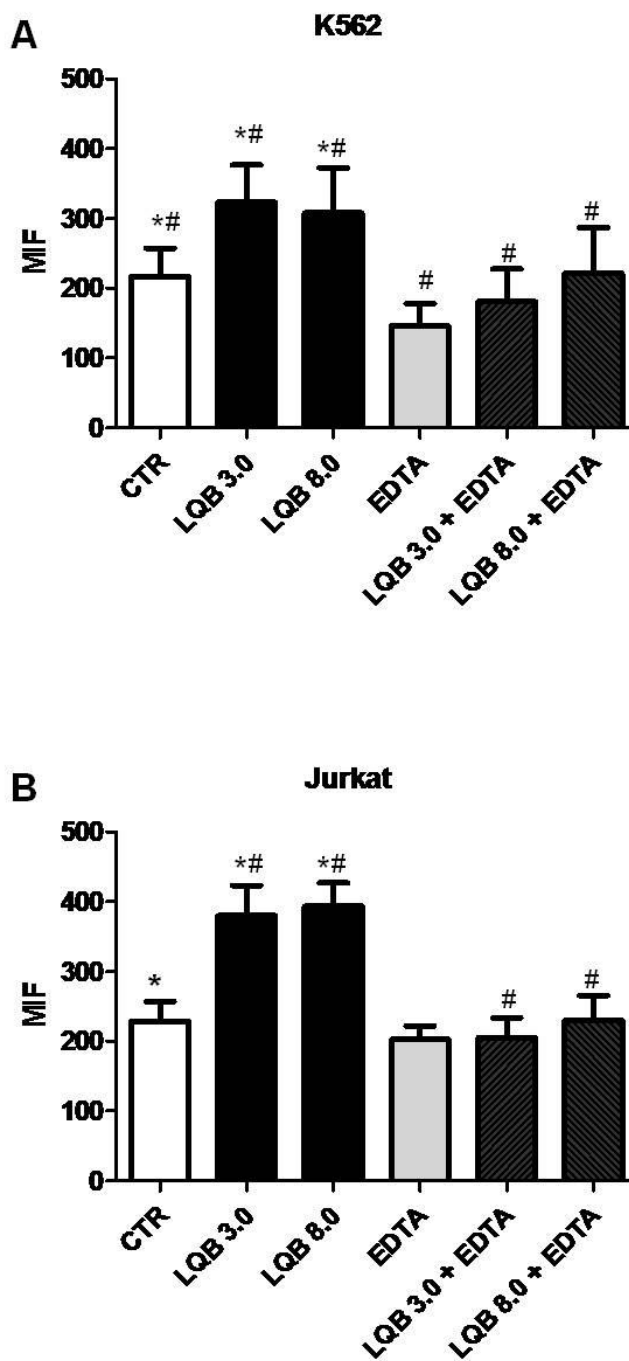


Figura 34. Ensaio de cálcio intracelular nas linhagens K562 e Jurkat tratadas com 3 ou 8 μ M de LQB 118 + EDTA. As células foram pré incubadas com Fluo-3 AM e depois mantidas com ou sem LQB 118 e com ou sem EDTA (5 mM) por 30 min. Os resultados são a média de 3 experimentos \pm desvio padrão. MIF = média da intensidade de fluorescência.

4.6. *Despolarização Precoce da Membrana Mitocondrial*

Após a entrada de cálcio na célula, esse cálcio pode ser capturado pelo retículo endoplasmático e, pela mitocôndria. Essa captação de cálcio pela mitocôndria pode gerar despolarização desta e pode levar a célula à morte celular se não for revertida. Com isso, resolvemos avaliar se em 30 min, quando já se tem aumento na concentração de cálcio, estaria havendo despolarização da membrana mitocondrial. A figura 35 mostra uma despolarização de mais de 40% das células na linhagem K562 tratadas com LQB em ambas concentrações, quando tratadas com BAPTA (quelante intracelular de cálcio); apesar desse já induzir despolarização da membrana mitocondrial, houve uma diminuição na taxa de despolarização dessas células. Em Jurkat não houve alterações no potencial de membrana mitocondrial em nenhum tratamento. Esses resultados sugerem que o cálcio estaria entrando na mitocôndria e provocando despolarização de sua membrana.

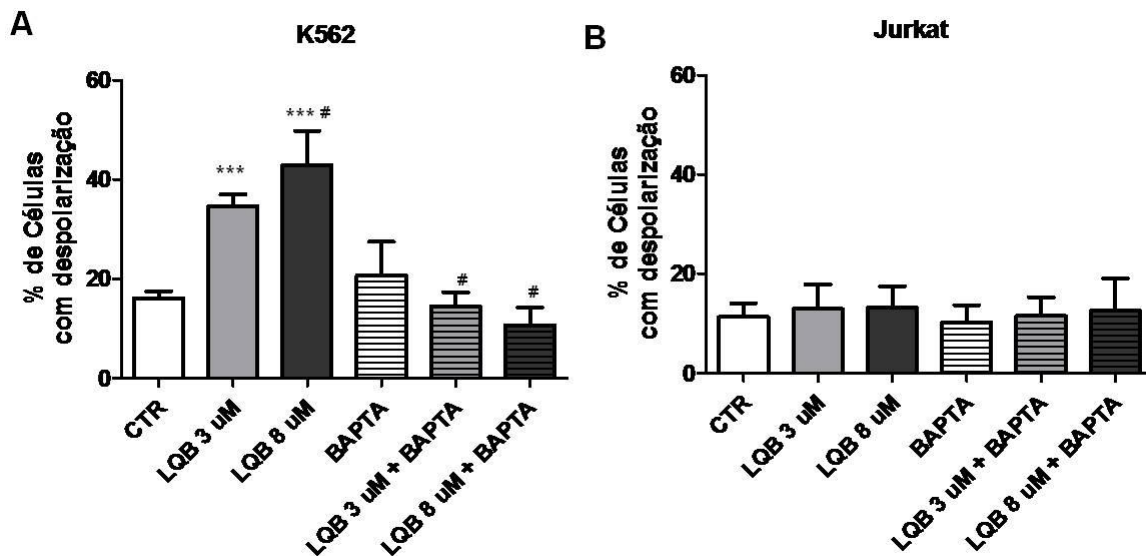


Figura 35. Ensaio de despolarização de membrana mitocondrial em 30min. As células K562 e Jurkat foram incubadas por 30 min com ou sem 3 μ M ou 8 μ M de LQB 118 e com ou sem BAPTA (5 μ M). Os resultados representam a média de 3 experimentos.

5. Discussão

Este trabalho visava verificar se a LQB 118 seria um quimioterápico potencialmente útil no tratamento de leucemias, inclusive aquelas com fenótipo de resistência, e também havia interesse em compreender seu mecanismo de ação.

Como controle para as células com fenótipo MDR, foram utilizados dois quimioterápicos usados (vincristina e daunorrubicina) na clínica, sendo que um é substrato para ABCB1 (vincristina) e outro para ABCC (daunorrubicina). Foi utilizado também um outro quimioterápico, usado na clínica, que possui a estrutura quinona presente nos compostos testados (mitomicina c). A linhagem Lucena-1 apresentou em relação a sua parental, uma grande resistência ao quimioterápico Vincristina, mostrando uma boa viabilidade em concentrações maiores que a concentração tóxica para a K562. Além disso, essa linhagem MDR apresentou maior resistência ao quimioterápico Mitomicina C em relação à parental. A resistência da linhagem Lucena-1 à vincristina pode ser atribuída a superexpressão de ABCB1, uma vez que esse quimioterápico é substrato para essa proteína ABC. No caso do quimioterápico mitomicina C, Kong mostrou que, numa linhagem K562/ADM (resistente a adriamicina, superexpressando ABCB1), apesar da inibição da expressão da proteína ABCB1 reduzir a resistência dessas células a vincristina, daunorrubicina e etoposídeo, essa inibição não reverteu a resistência dessas células a mitomicina c (KONG, 2009). Com isso, outros mecanismos podem ser atribuídos à resistência da linhagem K562 a mitomicina C. Um dos mecanismos pode ser a maior resistência dessas células a estresse oxidativo, visto que essas células possuem maior conteúdo de catalase que as células da linhagem K562, ou por fatores como as alterações no citoesqueleto também observadas nessa linhagem resistente.

A linhagem FEPS mostrou-se também mais resistente que sua parental K562, quando submetidas a diferentes concentrações do quimioterápico Daunorrubicina.

Esses dados estão de acordo com estudos anteriores que também mostraram a grande resistência apresentada por essas duas linhagens MDR em diferentes quimioterápicos (RUMJANEK et al., 2000; DA SILVA, 2007)

Nosso estudo confirmou o fenótipo das linhagens leucêmicas utilizadas e comprovou o efeito do Lapachol, composto com efeito antitumoral já conhecido e relativamente bem estudado em tumores sólidos e que também se mostrou efetivo para leucemias (DOS SANTOS et al., 2009). Além do efeito antitumoral, o Lapachol possui um efeito reconhecido contra outros agentes patogênicos como leishmania, nematódeos, bactérias e vírus. Seu mecanismo principal é a indução de estresse oxidativo devido a sua função quinona, que pode ser convertida em semiquinona e com isso gerar espécies reativas de oxigênio que podem causar danos na célula, como peroxidação de lipídios de membrana, alteração na estrutura de proteínas e oxidação das bases nitrogenadas presentes no DNA ou RNA e do açúcar desoxirribose, causando danos na estrutura do DNA (DA SILVA et al., 2003).

Neste trabalho verificamos que o Lapachol mostrou efeito antitumoral semelhante em duas linhagens de leucemia mielóide crônica, sendo que uma delas possui o fenótipo MDR e uma grande concentração de catalase e resistência a radicais livres. Esse resultado sugere também que o Lapachol não é um substrato para a proteína ABCB1, altamente expressa na linhagem MDR Lucena-1. Esse composto também mostrou efeito semelhante em uma linhagem de leucemia linfóide B, mostrando aplicabilidade em diferentes tipos de leucemia. Outro fator importante é que o Lapachol mostrou efeito semelhante entre a linhagem lucena-1 e a linhagem daudi, que é dita ser sensível a estresse oxidativo (BARROSO, 1997), isso contrapõe o proposto mecanismo principal de ação desse composto que seria a via de estresse oxidativo. Entretanto, o Lapachol mostrou-se pouco

potente, exigindo altas concentrações para exercer o efeito desejado em linhagens leucêmicas.

Nosso laboratório já havia demonstrado o efeito de pterocarpanos sobre leucemias, porém os compostos testados se mostraram instáveis (perda de atividade) e de difícil produção, além desta ser extremamente onerosa (gasto de paládio). Apesar de alguns pterocarpanos não mostrarem toxicidade contra células normais, o composto mais ativo contra leucemias também foi tóxico contra células mononucleares normais de sangue periférico (NETTO et al., 2009).

O composto LQB 118 possui a estrutura naftoquinona do Lapachol, além de uma estrutura de pterocarpano semelhante à do produto natural extraído da planta *Petalostemon purpureus*. Possui ainda as mesmas estruturas de quinona e pterocarpano presentes em outros compostos pterocarpanoquinonas já estudados no laboratório, porém não apresenta os radicais hidroxí e metoxi no anel D de sua estrutura, tornando sua síntese mais fácil e apresentando menor custo de produção. Outras vantagens do LQB 118 são ter uma solubilidade relativamente alta e não apresentar perda de atividade. Sendo assim, nosso primeiro interesse foi verificar se o composto LQB 118 possuía citotoxicidade em células normais e, para isso, nós utilizamos células mononucleares de sangue periférico, retiradas de doadores saudáveis. O composto LQB 118 mostrou-se pouco tóxico para essas células, sendo necessária uma concentração alta do composto para que esse, tivesse efeito tóxico nessas células, sendo sua toxicidade, semelhante a do seu pterocarpano de origem (NETTO et al., 2009).

Os resultados em linhagens de leucemia mostraram que esse composto é bem mais potente que o Lapachol. Além disso, como os compostos testados anteriormente, a LQB 118 apresentou efeito citotóxicos equivalentes tanto na linhagem sensível (K562) como na

linhagem Lucena-1 produzida no nosso laboratório e que superexpressa ABCB1. Em adição a esse resultado, podemos observar também que a linhagem FEPS possui igual sensibilidade ao composto. Essa sensibilidade da FEPS a LQB 118 sugere que esse composto também não é substrato para a ABCB1.

Por outro lado, um trabalho em colaboração com o laboratório da Dra. Raquel Maia do Instituto Nacional do Câncer (INCA) também demonstrou que uma dose sub-letal de LQB 118 é capaz de reduzir a expressão de ABCB1 na membrana da célula Lucena-1 em 72h. Esse mesmo trabalho mostrou uma inibição na expressão de survivina e XIAP, nas células K562 e Lucena-1 em 24h, sendo esse efeito dose-dependente. Esses dados aumentam o potencial do composto, visto que ele consegue inibir 3 proteínas relacionadas ao fenótipo de resistência em diferentes tumores. Entretanto, mais estudos são necessários para entender esse mecanismo de ação adicional, bem como identificar se esse efeito ocorre pré ou pós-tradução da proteína (Maia et al., 2010). Esse mesmo trabalho também mostrou em experimentos *ex vivo*, que o composto LQB 118 é capaz de induzir apoptose em células de pacientes com leucemia mielóide crônica, independente de atividade MDR.

Diversos artigos vêm demonstrando o efeito de uma outra quinona, a beta-lapachona. A beta-lapachona é também uma quinona extraída da planta do gênero *tabebuia* que tem sido testada em diversos tipos de linhagens tumorais provenientes de pulmão, de próstata e de leucemia.

Dentre os mecanismos de ação descritos para esse composto, um dos mais estudados é o de estresse oxidativo. Estudos realizados por Chau, mostraram a produção de peróxidos como sendo a responsável por seu efeito citotóxico na linhagem HL-60, descrita como sendo uma linhagem altamente sensível a estresse oxidativo (CHAU, 1998). Devido a sua semelhança estrutural com a beta-lapachona, nós testamos a LQB 118 na linhagem HL-

60, a qual apresentou efeito citotóxico alto, porém, com pouca diferença em relação às linhagens K562, Lucena-1 e FEPS, todas resistentes a estresse oxidativo. Esse resultado parece indicar que esse mecanismo participa pouco do seu efeito citotóxico em leucemias, ou que o LQB 118 é capaz de induzir mecanismos adicionais. Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

A fim de verificar a eficácia do LQB 118 em outros tipos de leucemias, nós estendemos os estudos dessa substância em linhagens de origem linfóide. Foi estudado o efeito do LQB 118 nas linhagens Daudi, Raji e Jurkat.

As linhagens Daudi e Raji mostraram-se um pouco mais resistentes à ação do composto em relação às linhagens de origem mielóide. Outra informação que pudemos verificar é se a presença de mutação no gene da p53 induzia resistência à LQB 118. A proteína p53 é uma proteína supressora de tumor, ela age no controle do ciclo celular, na fase G1, verificando a presença de danos no DNA. Caso sejam encontrados danos no material genético da célula, essa proteína pode ativar os mecanismos de reparo do DNA da célula ou levar essa célula a apoptose, dependendo do quão danificado se apresente o material genético da célula. Mutações na proteína p53 são descritas como uma das responsáveis pela resistência de células tumorais a diversos tratamentos como quimioterapia ou radioterapia. Não foram verificadas diferenças significativas entre as sensibilidades de Raji (mutante para p53) e Daudi, podendo sugerir que a via de morte induzida pela LQB 118 seria independente de p53. Esses resultados estão de acordo com o que foi verificado subsequente também com células leucêmicas de pacientes onde LQB 118 mostrou-se tão eficiente quanto o imatinib e ser independente de p53 (MAIA et al., 2010).

Uma informação importante é que a linhagem Daudi, diferente da linhagem Raji, não expressa a proteína anti-apoptótica Bcl-2. A expressão de proteínas anti-apoptóticas

tem sido correlacionada com a resistência a quimioterápicos em diversos tipos de câncer. A semelhança na sensibilidade de Daudi e Raji nos sugere que a Bcl-2 pode não conferir resistência dessas células a esse pterocarpanoquinona.

Para verificar essa informação, utilizamos neste trabalho a linhagem Jurkat, uma linhagem de leucemia T do adulto descrita como uma linhagem que superexpressa Bcl-2 e não expressa Bax. Essa linhagem mostrou-se mais resistente em relação a todas as outras linhagens (tanto as de origem mielóide como as de origem linfóide). Apesar disso, o composto mostrou-se um pouco mais potente que o pterocarpano natural de origem nessa mesma linhagem (NETTO et al., 2009). Com base nesse resultado, verificamos a possibilidade de Bcl-2, em grandes quantidades, aumentar a resistência de células tumorais a LQB 118. Podemos sugerir também que a não expressão de Bax, favorece a sobrevivência da linhagem Jurkat, na presença do LQB 118. Entretanto, apesar da Jurkat se mostrar mais resistente a ação do LQB 118, ainda assim ela apresentou uma sensibilidade maior a esse pterocarpanoquinona do que as células normais, sugerindo ser esse composto também aplicável a esse tipo de leucemia.

Com base nesses resultados, utilizamos duas linhagens para analisar os mecanismos envolvidos na indução de morte do composto LQB 118. Nós utilizamos a linhagem K562 como um modelo de linhagem celular sensível ao composto, e a linhagem Jurkat como um modelo de linhagem celular menos sensível.

Para verificar se o composto LQB 118 induz a morte dessas células através de necrose ou apoptose (vias clássicas de indução de morte), nós realizamos ensaios com Anexina-V e PI por citometria de fluxo. O composto LQB 118 foi capaz de induzir predominantemente apoptose nas duas linhagens testadas. A linhagem K562 apresentou marcação para Anexina, ou seja, presença de apoptose, em 24h, enquanto a linhagem Jurkat

somente sofreu apoptose em torno de 48h. Isso mostra que a linhagem Jurkat não só é mais resistente ao composto, como também, mesmo em concentrações mais altas, essa só começa a sofrer apoptose em tempos mais tardios. Em concordância com esses resultados, a fragmentação do DNA foi mais marcante e mais precoce em K562 quando comparada com Jurkat. Outro aspecto importante observado é que diferente do que ocorre com grande parte dos quimioterápicos e do que já foi visto para a beta-lapachone, onde o efeito desses ocorre geralmente na fase G2/M, o LQB 118 exerceu efeito em K562 e Jurkat especialmente na fase G1, mostrando possuir um mecanismo de ação diferenciado.

Quimioterápicos em geral tendem a induzir apoptose pela via intrínseca, na qual ocorrem alterações nas mitocôndrias, formação do poro de transição de permeabilidade (PTP) com a participação das proteínas pró-apoptóticas bax/bak, liberação de citocromo c, formação do apoptossomo e ativação de caspases. Para identificar se o composto LQB 118 induzia apoptose por essa via, foi analisado o potencial de membrana mitocondrial nos tempos de 24h, 48h e 72h. Cerca de 50% das células K562 sofreu despolarização da membrana mitocondrial nos tempos de 24h e 48h, indicando que o composto induziu apoptose nessas células pela via intrínseca. Entretanto, a linhagem Jurkat sofreu poucas alterações no potencial de membrana mitocondrial ao ser exposta ao composto, indicando a existência de um outro mecanismo envolvido na indução de morte nessas células.

Esta poderia ser a via de estresse do retículo endoplasmático. Essa via pode ser causada por diversos fatores como; falta de glicose, estresse oxidativo, ou alterações na homeostase de cálcio, entre outros. Isso leva ao acúmulo de proteínas mal enoveladas que ativa a resposta a proteínas mal enoveladas (UPR). Essa via inicialmente tenta reduzir esse acúmulo pela redução da síntese de proteínas e aumento na síntese de chaperonas. Porém, essa resposta também pode levar à morte por inibição de proteínas Bcl-2 e ativação de

caspase-12, que por sua vez irá ativar caspase-9, levando à execução do processo apoptótico. Nossos resultados mostraram ativação de caspase-12 nos tempos de 24h, 48h e 72h na linhagem K562 e com maior intensidade na linhagem Jurkat, chegando a mais de 60% de células com caspase-12 ativadas em 48h. Como controle positivo, foi utilizado taspigargina (TG), a qual inibe a SERCA (SARCO/ endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase) e é capaz de induzir estresse do retículo. O tratamento com 500 nM de TG em 24h e 48h conseguiu causar ativação de caspase-12 na linhagem K562, porém, a linhagem Jurkat apresentou menor ativação de caspase-12 nos tempos testados, o que talvez seja por esse efeito ter ocorrido mais precoce na linhagem Jurkat e tenhamos observado apenas o final da ativação dessa caspase.

Nós também observamos ativação de caspase-9 nas duas linhagens. A linhagem K562 exibiu ativação de caspase-9 já em 24h, corroborando os resultados de Anexina/PI, esse valor aumentou em 48h (em torno de 40% das células com caspase 9 ativada) e caiu em 72h (20%), provavelmente, devido à permeabilização da membrana plasmática dessas células, característica de necrose secundária. A linhagem Jurkat apresentou caspase-9 ativada em 48h e esse valor subiu em 72h, sugerindo uma duração maior do processo apoptótico nessas células. Esse resultado corrobora com os resultados publicados pela Dra. Raquel Maia e colaboradores que mostram ativação de caspase-3 nas linhagens K562 e sua derivada MDR Lucena-1, confirmando a indução de morte por apoptose dependente de caspases (MAIA et al., 2010).

Kim e colaboradores sugeriram que a ativação de caspase-9 seria um evento mitocondrial posterior a ativação de caspase-12 (KIM et al., 2009), porém Mirishina e colaboradores mostraram que a caspase-12 poderia ativar caspase-9 independente da via mitocondrial (MIRISHINA et al., 2002). Nesse trabalho, foi verificado em Jurkat a ativação

de caspase-12 e subsequente ativação de caspase-9 sem despolarização de membrana mitocondrial, sugerindo uma interação direta dessas caspases, provavelmente independente da via mitocondrial.

Lien e colaboradores (LI et al., 2008) mostraram que a beta-lapachona induz apoptose via estresse de RE em células de câncer de próstata e visualizaram um aumento na concentração do cálcio intracelular nas células tratadas com essa naftoquinona. Da mesma forma, o composto LQB 118 parece ser capaz de induzir estresse de RE, especialmente na linhagem Jurka (talvez por ser usada uma maior concentração para essa linhagem). Para ratificar essa hipótese, foram analisadas alterações nas concentrações de cálcio intracelular nas linhagens, expostas a 3 μM e 8 μM de LQB por 10min, 30min e 60min. O composto induziu aumento na concentração de cálcio em ambas linhagens, sendo em Jurkat seu efeito de maior magnitude. Ao incubarmos as linhagens com LQB 118 por 30min na presença de EDTA (um quelante extracelular de cálcio), nós observamos uma reversão desse aumento na concentração intracelular de cálcio, especialmente na linhagem Jurkat, sugerindo que, pelo menos, grande parte desse cálcio estaria vindo do meio extracelular. Ao tratar essas células com TG por nós também conseguimos observar um aumento na concentração de cálcio intracelular em proporções semelhantes àsquelas do LQB 118.

Com base nesses resultados, nós imaginamos que esse aumento na concentração de cálcio intracelular poderia estar envolvido na indução de morte nas células pelo LQB 118. A fim de reforçar nossa hipótese, foi avaliado, mais uma vez, o potencial de membrana mitocondrial nas duas linhagens, só que em um tempo menor, em 30min, tempo onde já há grande concentração de cálcio intracelular. Nós observamos despolarização significativa na membrana mitocondrial das células K562 enquanto nenhuma alteração foi observadas nas

células Jurkat. Parte desse cálcio aumentado nas células pode estar sendo capturado pela mitocôndria, o que explicaria essa despolarização nas células K562. Por outro lado, a linhagem Jurkat apresenta uma maior razão bcl2/bax, proteínas que também possuem participação na entrada de cálcio através da membrana mitocondrial. Somando-se a isso, ao tratarmos a célula com BAPTA-AM (quelante intracelular de cálcio), há uma queda na despolarização da membrana mitocondrial das células K562, reforçando a idéia de que essa despolarização seria causada pelo aumento de cálcio no citoplasma.

Uma outra proposta para o mecanismo de ação do LQB 118 é que esse composto poderia sofrer uma alteração em sua estrutura após ser reduzido a hidroquinona pela enzima NQO1 (NAD(P)H:Quinona-oxidoreductase1), agindo também como alquilante de DNA, mecanismo de ação comum a muitos quimioterápicos, inclusive em quinonas como as mitomicinas (NETTO, 2007). Nossos resultados contradizem essa proposta, uma vez que o composto agiu na população em G1 e agentes alquilantes agem especialmente na população S/G2. Outro possível mecanismo de ação poderia ser resultado da forma hidroquinona desse composto ser instável, se auto-oxidando e criando assim um ciclo fútil que causaria a depleção de NADH e NADPH, substratos da enzima NQO1. Entretanto, nem a linhagem mais sensível HL60 e nem a linhagem mais resistente Jurkat expressam NQO1 (TAN et al., 2010; NGUYEN et al., 2010). Além disso, dados do nosso laboratório mostraram que o LQB 118 foi pouco potente contra a linhagem de câncer de não-pequenas células de câncer de pulmão A549, a qual expressa altos níveis de NQO1 (NETTO et al., 2010; BEY et al., 2007).

Há ainda a possibilidade de conversão desse composto por outras enzimas, como pelas oxidoreduases B5R e P450R (BEY et al 2008). Entretanto, não há comprovação da real participação dessas enzimas e esse aspecto não foi abordado por nós.

Com isso, nós propomos que poderia haver outro mecanismo de ação relacionado com o LQB 118 que não envolveria essas enzimas. A nossa proposta é que o composto LQB 118 poderia estar ativando canais de cálcio na célula. Com isso esses canais aumentariam a captação de cálcio da célula. No caso da linhagem K562, esse aumento de cálcio seria captado pela mitocôndria. Isso inicialmente poderia aumentar a atividade de enzimas mitocondriais, porém, após algum tempo, haveria um colapso na mitocôndria e abertura do poro de transição de permeabilidade da mitocôndria (mPTP), iniciando o processo de apoptose pela via intrínseca. Nesse contexto, há a possibilidade de uma calpaína (uma enzima que aumenta a atividade quando ligada a cálcio) presente na mitocôndria estar realizando a abertura do mPTP.

No caso da linhagem Jurkat, poderia haver abertura de canais de cálcio do retículo endoplasmático. Também há a possibilidade de haver captação de cálcio extracelular e esse cálcio induzir a abertura de canais de cálcio no retículo endoplasmático, um fenômeno denominado de "liberação de cálcio induzida por cálcio" (CICR - calcium-induced calcium release). Isso provocaria posteriormente, o esvaziamento de cálcio nessa organela, o que iniciaria o processo de estresse de retículo, levando essa célula a apoptose por essa via. Outra possibilidade seria a inibição de Ca^{2+} ATPases tanto na membrana plasmática como na membrana do retículo endoplasmático. Caso haja a inibição dessas bombas na membrana plasmática, essas bombas deixariam de extrair cálcio para fora da célula, e caso haja inibição das bombas no retículo, essas bombas deixariam de captar cálcio para dentro do retículo endoplasmático (Fig 36). Em ambos os casos, haveria aumento de cálcio no citoplasma da célula.

Há artigos mostrando a participação de canais de cálcio da membrana plasmática na morte celular. A capsaicina, substância encontrada na pimenta a qual já é descrita

possuindo efeito antitumoral parece agir pela ativação de canais TRPV1 (transient receptor potential cation canal, subfamily V, member 1), ativando a entrada de cálcio e sódio e levando a célula a morte por necrose ou apoptose (PREVARSKAYA et al., 2007). Em adição a esses trabalhos, há trabalhos que mostram que a capsaicina é capaz de modular a atividade da proteína mdr ABCB1 (HAN et al., 2006; OKURA et al., 2010). Um outro trabalho utilizando verapamil, (um bloqueador de canais de cálcio) mostrou que essa substância era capaz de inibir tanto a expressão de survivina como de ABCB1 (LIU et al., 2007). Isso nos trás a possibilidade de que as alterações no cálcio observadas com o tratamento com LQB 118 possam estar alterando a expressão tanto de survivina como de ABCB1 nas células Lucena-1 e K562.

Existem também compostos que são capazes de mobilizar cálcio pela ativação de canais intracelulares de cálcio como é o caso da cafeína que pode agir em canais de rianodina no retículo endoplasmático (MACKRILL et al., 2010). Somando-se a isso, Gao e colaboradores mostrou que o composto 7,8-Benzo(a)Pireno Quinona é capaz de induzir a abertura de canais de rianodina na linhagem de leucemia Daudi e nas células PBMC humanas e em células murinas de baço (GAO ET AL., 2005). A possibilidade de uma outra quinona abrir canais intracelulares de cálcio em células sanguíneas, torna ainda mais possível nossa hipótese para o mecanismo de ação do LQB 118.

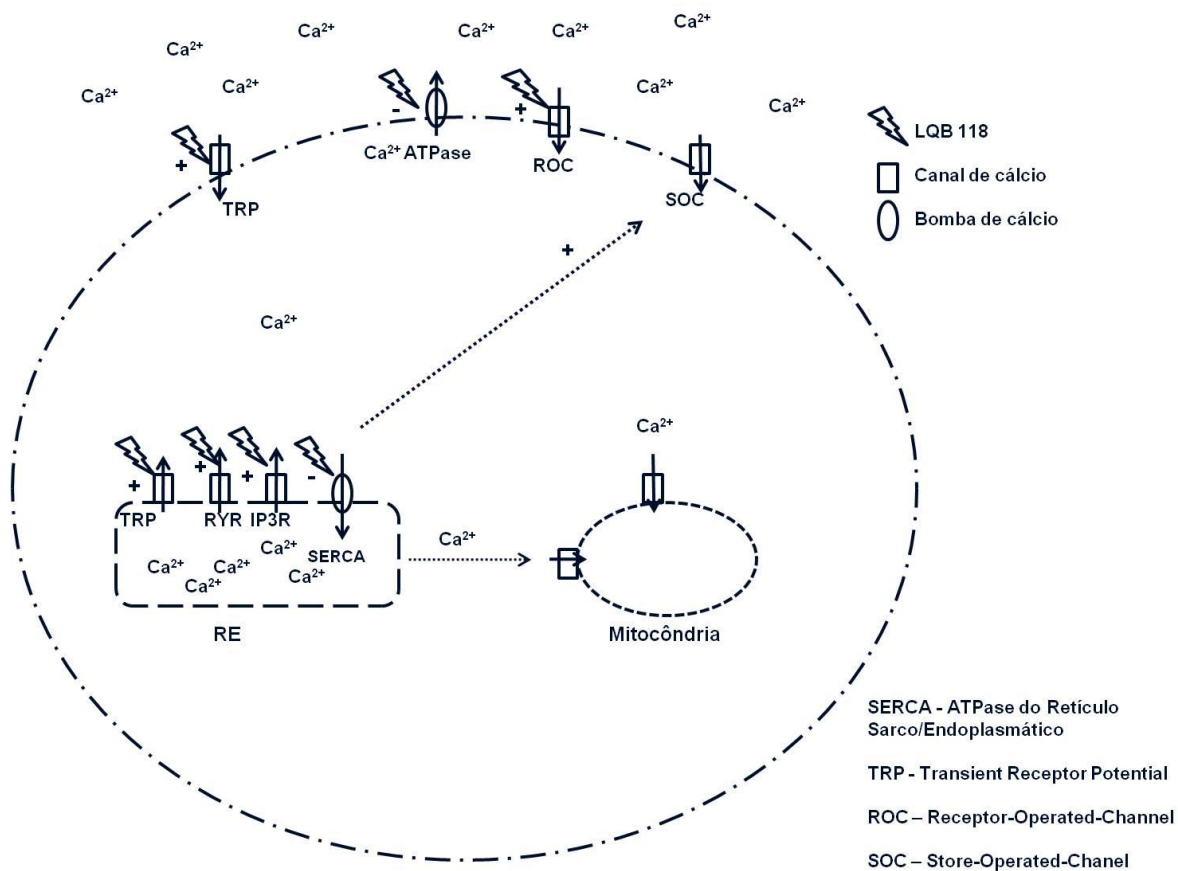


Fig 36. Esquema mostrando possível mecanismo de ação do LQB 118. Abertura de canais cálcio extracelulares e/ou intracelulares ou inibição de bombas de cálcio na membrana plasmática e/ou no retículo endoplasmático com aumento no conteúdo de cálcio no citoplasma da célula. Perda de cálcio e estresse no retículo endoplasmático e captação de cálcio pela mitocôndria com consequente despolarização da membrana mitocondrial e morte da célula.

Entretanto, mais estudos são necessários para comprovar essa hipótese. Com isso, a maior resistência de determinadas linhagens ao composto LQB 118 (como no caso das linhagens H560 e A549 de câncer de pulmão) poderia ser explicada por uma menor expressão de determinado(s) canal(is) ou bombas de cálcio dessas células. No momento, nosso trabalho conseguiu demonstrar a eficácia do composto contra diferentes linhagens de leucemia e identificou que o composto induz apoptose por pelo menos duas vias

distintas (via intrínseca e estresse de retículo endoplasmático). Este estudo também coloca o composto LQB 118 como um potencial candidato a quimioterápico no tratamento de neoplasias, especialmente leucemias.

6. *Conclusão*

O composto foi capaz de induzir morte celular em diferentes linhagens de leucemia humana. Além de ser eficaz contra linhagens MDR, esse composto foi capaz de inibir a expressão da proteína ABCB1, além de inibir expressão de IAPS (MAIA, 2010), dando-lhe uma vantagem no tratamento de leucemias.

Esse composto não se mostrou tóxico contra células normais visto que apresentou um LD50 alto para PBMC, isso lhe garante mais uma vantagem em como candidato a quimioterápico, visto que muitos quimioterápicos também são tóxicos contra células normais.

O composto foi capaz de induzir apoptose em duas linhagens por vias distintas. Induzindo apoptose pela via mitocondrial na linhagem K562 e por estresse de RE na linhagem JURKAT.

O composto também foi capaz de aumentar a concentração de cálcio intracelular e esse aumento foi reduzido com o uso de um quelante extracelular de cálcio, sugerindo que esse cálcio viria do meio extracelular.

Porém, uma melhor compreensão do mecanismo de ação desse e de outros compostos com potencial antitumoral é importante para podermos identificar as consequências da interação do composto nessas células tumorais bem como em células normais, não só na indução de morte como também na alteração de expressão de proteínas (como observado nas proteínas ABCB1, survivina e XIAP).

7. Perspectivas

Análisar o aumento na concentração de cálcio intracelular com uso de diferentes inibidores de canais de cálcio e avaliar a viabilidade celular com esses inibidores

Analisar ativação das MAPKs p38 e JNK e avaliar o efeito de inibidores na viabilidade

Analisar ativação de PKCs e avaliar o uso de inibidores na mobilização de cálcio intracelular e na viabilidade

Realizar ensaios de atividade de Ca²⁺-ATPases com LQB 118

Ver influencia de inibidores de canais de cálcio no efeito do LQB 118 sobre a expressão de ABCB1

8. *Referências*

ADAMS JM, CORY S. The Bcl2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007; 26;26(9):1324-37.

AKSENTIJEVICH I; FLINN IW. Chronic lymphocytic leukemia: advances in biology and therapeutics. *Curr Opin Oncol*. 2003; 15(1):16-22.

ALBERTS B; JOHNSON A; LEWIS J; RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. Cancer. Molecular biology of the cell. 4^o edição, São Paulo. Editora Artmed, 2004; 1313-30.

ALMEIDA VL, LEITÃO A, REINA LCB, MONTANARI CA, DONNICI CL, LOPES MTP. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim Nova*. 2005; 28(1):118-129.

ASHKENAZI A, DIXIT VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998;281:1305–8.

AUGUSTINE LM, MARKELEWICZ RJ, BOEKELHEIDE K, CHERRINGTON NJ. Xenobiotic and endobiotic transporter mRNA expression in the blood-testis barrier. *Drug Metab Dispos*. 2005; 33:182-9.

BARILE FA, DIERICKX PJ, KRISTEN U. In vitro cytotoxicity testing for prediction of acute human toxicity. *Cell Biol Toxicol*. 1994; 10(3): 155-62.

BARROSO MP, GÓMEZ-DÍAZ C, LÓPEZ-LLUCH G, MALAGÓN MM, CRANE FL, NAVAS P. Ascorbate and α -Tocopherol Prevent Apoptosis Induced by Serum Removal Independent of Bcl-2. *Arch Biochem Biophys*. 1997. 343(2):243-8.

BARRY M, BLEACKLEY RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:401–9.

BEY EA, BENTLE MS, REINICKE KE, DONG Y, YANG CR, GIRAR L, MINNA JD, BORNMANN WG, GAO J AND BOOTHMAN DA. An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cell by beta-lapachone. *PNAS*. 2007; 104(28):11832-37.

BEY EA, WUERZBERGER-DVIS SM, PINK JJ, YANG CR, ARAKI S, REINICKE KE, DONG Y, CATALDO E, CRISWELL TL, WAGNER MW, LI L, GAO J, BOOTHMAN DA. Mornings With Art, Lessons learned: Feedback Regulation, Restriction Threshold Biology, and Redundancy Govern Molecular Stress Response. *J Cellr Phys*. 2006; 209:604-610.

BORGES HL, LINDEN R, WANG JYJ. DNA damage-induced cell death: Lessons from the central nervous system. *Cell Research*. review. 2008; 18: 17-26.

BOROWSKI E, BONTEMPS-GRACZ MM, PIWKOWSKA A. Strategies for overcoming ABC-transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells. *Acta Biochim Pol*. 2005; 52(3):609-27

BOTTON S, COITEUX V, CHEVRET S, RAYON C, VILMER E, SANZ M, LA SERNA J, PHILIPPE N, BARUCHEL A, LEVERGER G, ROBERT A, SAN MIHUEL J, CONDE E, SOTTO

JJ, BORDESSOULE D, FREGUEUX N, FEY M, PARRY A, CHOMIENNE C, DEGOS L, FENAUX P. Outcome of Childhood Acute Promyelocytic Leukemia With All-Trans-Retinoic Acid and Chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2004; 22(8):1404-12

BRIMMELL M, MENDIOLA R, MANGION J, PACKHAM G. BX frameshift mutations in cell lines derived from human haemopoietic malignancies are associated with resistance to apoptosis and microsatellite instability. *Oncogene*. 1998 Apr 9;16(14):1803-12.

CHAU YP, SHIAH SG, DON MJ, KUO ML. Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor beta-lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. *Free Radic Biol Med*. 1998; 24(4):660-70.

CHOPRA R; PU QQ; ELEFANTY AG. Biology of BCR-ABL. *Blood Reviews*. 1999; 13: 211 – 229.

CIRRITO JR, DEANE R, FAGAN AM, SPINNER ML, PARSADANIAN M, FINN MB, JIANG H, PRIOR JL, SAGARE A, BALES KR, PAUL SM, ZLOKOVIC BV, PIWNICA-WORMS D, HOLTZMAN DM. P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest*. 2005; 115(11):3285-90

COHEN GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326(Pt 1):1–16.

COLE SP, BHARDWAJ G, GERLACH JH, MACKIE JE, GRANT CE, ALMQUIST KC, STEWART AJ, KURZ EU, DUNCAN AM, DEELEY RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. 1992; 258:1650-4.

COLLINS SJ, GALLO RC, GALLAGHER RE. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature*. 1977; 270(5635):347-9.

COLLINS SJ, RUSCETTI FW, GALLAGHER RE, GALLO RC. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978; 75(5):2458-62.

COLICELLI J. ABL Tyrosine Kinases: Evolution of Function, Regulation, and Specificity. *Sci Sign*. 2010; 3(139)

CONTI AA, LIPPI D, GENSINI GF. The Historical Evolution of the concepts of apoptosis in rheumatic diseases. *Reumatismo*. 2005; 57(1):57-61.

CORY S, ADAMS JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:647-56.

CULLEN SP, BRUNET M, MARTIN SJ. Granzymes in Cancer and Immunity. *Cell Death Differ*. 2010; 17:616-623.

D'ALESSANDRO N, POMA P, MONTALTO G. Multifactorial nature of hepatocellular carcinoma drug resistance: could plant polyphenols be helpful? *World J Gastroenterol*. 2007; 13(14):2037-43

DA SILVA FEP, Seleção e caracterização de uma nova linhagem leucêmica humana MDR. Rio de Janeiro, 2007. Dissertação de mestrado,. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

DA SILVA MN, FERREIRA VF, DE SOUZA MCBV. Um panorama da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase em beta-lapachona e derivados. *Quim Nova*. 2003;.26(3):407-16

DALLAS S, MILLER DS, BENDAYAN R. Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacol Rev*. 2006;58(2):140-61.

DEININGER MW, O'BRIEN SG, FORD JM, DRUKER BJ. Practical management of patients with chronic myeloid leukemia receiving imatinib. *J Clin Oncol*. 2003 Nov 15;21(22):4255-6

DENIZOT F, LANG R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; 89(2): 271-7.

DEWSON G, WALSH GM, WARDLAW AJ. Expression of Bcl-2 and its homologues in human eosinophils. Modulation by interleukin-5. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999 Apr;20(4):720-8

DORDELMANN M, REITER A, BORKHARDT A, LUDWIG WD, GÖTZ N, VIEHMANN S, GADNER H, RIEHM H, SCHRAPPE M. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1999; 96(4):1209-17

DU C, FANG M, LI Y, LI L, WANG X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000;102:33-42.

DUVOIX A, DELHALLE S, BLASIUS R, SCHNEKENBURGER M, MORCEAU F, FOUGÈRE M, HENRY E, GALTEAU MM, DICATO M, DIEDERICH M. Effect of chemopreventive agents on glutathione S-transferase P1-1 gene expression mechanisms via activating protein 1 and nuclear factor KappaB inhibition. *Bioch Pharmacol*. 2004; 68:1101-1111.

ECHEVARRIA-LIMA J, RUMJANEK VM, KYLE-CEZAR F, HARAB RC, LEITE DFP, DOS SANTOS ORNELLAS D, MORALLES MM, ARAUJO AQ, ANDRADA-SERPA MJ, HTLV-I alters the multidrug resistance associated protein 1 (ABCC1/MRP1) expression and activity in human T cells. *J Neuroimmunol*. 2007; 185:175-81.

EGGER L, SCHNEIDER J, RHÊME C, TAPERNOUX M, HÄCKI J, BORNER C. Serine proteases mediate apoptosis-like cell death and phagocytosis under caspase-inhibiting conditions. *Cell Death Differ*. 2003; 10(10):1188-203.

ELMORE S. Apoptosis: A Review of programmed Cell Death. *Toxicol Pathology*. 2007; 35(4):495-516.

ENOKIZONO J, KUSUHARA H, OSE A, SCHINKEL AH, SUGIYAMA Y. Quantitative Investigation of the Role of Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp/Abcg2) in Limiting and testis Penetration of Xenobiotic Compounds. *Drug Metab Dispos*. 2008; 36(6):995-1002

EPSTEIN MA, BARR YM. Characteristics and mode of growth of tissue culture strain (EB1) of human lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *J Natl Cancer Inst.* 1965 Feb; 34:231-40

FAN Z, BERESFORD PJ, OH DY, ZHANG D, LIEBERMAN J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell.* 2003;112:659-72.

FISCHER H, KOENIG U, ECKHART L, TSCHACHLER E. Human caspase-12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Comm.* 2002;293:722-726.

FOERSTER J. Leucemia Linfocítica Crônica, in: LEE GR, BITHEI TC, FOERSTER J, ATHENS JW, LUKENS JN. Wintrobe Hematologia Clínica. São Paulo, Manole Ltda. 1998; 78: 2241 - 2262

FRAND AR, CUOZZO JW, AND KAISER CA. Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol.* 2000; 10, 203-210

FULDA S. Caspase-8 in Cancer Biology and Therapy. *Cancer Letters.* 2009; 281:128-133.

GALLAGHER R, COLLINS S, TRUJILLO J, MCCREDIE K, AHEARN M, TSAI S, METZGAR R, AULAKH G, TING R, RUSCETTI F, GALLO R. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 1979;54(3):713-33.

GAO G, DOU QP. G1 Phase-Dependent Expression of Bcl-2 mRNA and Protein Correlates with Chemoresistance of Human Cancer Cells. *Mol Pharmacol.* 2000; 58(5):1001-10.

GAO J, VOSS AA, PESSAH IN, LAUER FT, PENNING TM, BURCHIEL SW. Ryanodine receptor-mediated rapid increase in intracellular calcium induced by 7,8(a)pyrene quinone in human and murine leukocytes. *Toxicol Sci.* 2005; 87(2):419-26.

GARRIDO C, GALLUZZI L, BRUNET M, PUIG PE, DIDELOT C, KROEMER G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 2006;13:1423-33.

GOASGUEN JE; BENNETT JM; HENDERSON ES. Biologic Diagnosis of Leukemias, in: HENDERSON ES; LISTER TA; GREAVES MF. Leukemia, 6ª edição, Editora WB Saunders, 1996; 2:8-33

GREER JP; KINNEY MC. Leucemia não linfocítica aguda, in: LEE GR, BITHEL TC, FOERSTER J, ATHENS JW, LUKENS JN. Wintrobe Hematologia Clínica, , editora Manole Ltda, São Paulo. 1998; 73:2114-2142

GROVES FD; LINET MS; DEVESSA SS. Epidemiology of leukemias: overview and patients of occurrence. In: Henderson ES; Lister TA; Greaves MF. Leukemia, 6ª edição, Editoras WB Saunders, London, England; 1996; 8:145-159

HAHN CW. Role of Telomeres and telomerase in the Pathogenesis of Human Cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21(10):2034-43

HAN Y, TAN TM, LIM LY. Effects of capsaicin on P-gp function and expression in Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol.* 2006; 71(12):1727-34.

HARDING HP, NOVOA I, ZHANG Y, ZENG H, WEK R, SCHAPIRA M, RON D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell.* 2000; 6(5):1099-108.

HARDING HP, ZHANG Y, ZENG H, NOVOA I, LU PD, CALFON M, SADRI N, YUN C, POPKO B, PAULES R, STOJDL DF, BELL JC, HETTMANN T, LEIDEN JM, RON D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell.* 2003; 11(3):619-33.

HAYASHI M, TOMITA M. Mechanistic Analysis for drug permeation through intestinal membrane. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2007;22(2):67-77.

HEEREMA NA, SATHER HN, SENSEL MG, ZHANG T, HUTCHINSON RJ, NACHMAN JB, LANGE BJ, STEINHERZ PG, BOSTROM BC, REAMAN GH, GAYNON PS, UCKUN FM. Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia an high hyperdiploidy (>50 chromosomes). *J Clin Oncol.* 2000; 18(9):1876-87.

HINTON CV, AVRAHAM S, AVRAHAM HK. Contributions of Intergin-Linked Kinase to Breast Cancer Metastasis and Tumorigenesis. *J Cell Mol Med.* 2008;12(5A):1517-26.

HITOMI J, KATAYAMA T, EGUCHI Y, KUDO T, TANIGUCHI M, KOYAMA Y, MANABE T, YAMAGISHI S, BANDO Y, IMAIZUMI K, TSUJIMOTO Y, TOHYAMA M. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol.* 2004; 165(3):347-56.

HOELZER D. Acute Lymphoblastic Leukemia in adults, in: HENDERSON ES, LISTER TA, GREAVES MF. *Leukemia*, 6ªedição. Editora WB Saunders, London, England; 1996; 21:446-478

IGNEY FH, KRAMMER PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:277–88.

IIDA A, TOMITA M, IDOTA Y, TAKIZAWA Y, HAYASHI M. Improvement of intestinal absorption of P-glycoprotein substrate by D-tartaric acid. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2006; 21(5):424-8.

JEDLITSCHKY G, LEIER I, BUCHHOLZ U, BARNOUIN K, KURZ G, KEPPLER D. Transport of glutathione, glucuronate and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res.* 1996;56:988-994.

JENNINGS CD; FOON KA. Recent advances in flow cytometry: application to he diagnosis of hematologic malignancy. *Blood.* 1997; 90 (8): 2863-2892.

JEYAPALAN J, LEAKE A, AHMED S, SARETZKI G, TILBY M, VON ZGLINICKI T. The role of telomeres in Etoposide induced tumor cell death. *Cell Cycle.* 2004;3(9):1169-76.

JULIANO RL, LING V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*. 1976;455(1):152-62.

KAPOOR A, SANYAL AJ. Endoplasmic Reticulum Stress and the Unfolded Protein Response. *Clin Liver Dis*. 2009. 13:581-590.

KAR P, SAMANT K, SHAIKH S, CHOWDHURY A, CHAKRABORTI T, CHAKRABORTI S. Mitochondrial calpain system: An overview. *Arch Biochem biophys*. 2010; 495(1):1-7

KASPERS GJ, SMETS LA, PIETERS R, VAN ZANTWIJK CH, VAN WERING ER, VEERMAN AJ. Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: results of an in vitro study. *Blood*. 1995; 85(3):751-6

KAUFMANN SH, KARP JE, SVINGEN PA, KRAJEWSKI S, BURKE PJ, GORE SD, REED JC. Elevated expression of the apoptotic regulator Mcl-1 at the time of leukemic relapse. *Blood*. 1998;91(3):991-1000.

KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26(4): 239-57.

KERR JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*. 2002; 181-182:471-4.

KILE BT. The Role of Intrinsic Pathway in Platelet Life and Death. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009; 7 (suppl 1):214-217.

KIM SM, PARK HS, JUN DY, WOO HJ, YANG, CH, KIM YH. Mollugin induces apoptosis in human Jurkat T cells through endoplasmic reticulum stress-mediated activation of JNK and caspase-12 and subsequent activation of mitochondria-dependent caspase cascade regulated by Bcl-xL. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009; 241(2):210-20

KISCHKEL FC, HELLBARDT S, BEHRMANN I, GERMER M, PAWLITA M, KRAMMER PH, PETER ME. Cytotoxicitydependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J*. 1995;14:5579-88.

KITAMURA M. Endoplasmic Reticulum Stress in the Kidney. *Clin Exp Nephrol*. 2008; 12:317-25.

KOEFFLER HP, GOLDE DW. Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood*. 1980;56(3):344-50.

KONG X, GE H, CHEN L, LIU Z, YIN Z, LI P, LI M. Gamma-linoleic acid modulates the response of multidrug-resistant K562 leukemic cells to anticancer drugs. *Toxicol In Vitro*. 2009 23(4):634-9.

KROGER LA, DENARDO GL, GUMERLOCK PH, XIONG CY, WINTHROP MD, SHI XB, MACK PC, LESHCHINSKY T, DENARDO SJ. Apoptosis-Related Gene and Protein Expression in

Human Lymphoma Xenografts (Raji) After Low Dose Rate Radiation Using ^{67}Cu -2IT-BAT-Lym-1 Radioimmunotherapy. *Cancer Biother and Radiopharm*. 2001; 16(3):213-25.

KURZOCK R KANTARJIAN HM; DUKER BJ; TALPAZ M. Philadelphia chromosome-positive in leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med*. 2003; 138: 819 – 830.

KYLE-CEZAR F, ECHEVARRIA-LIMA J, DOS SANTOS GOLDENBERG RC, RUMJANEK VM. Expression of c-kit and Sca-1 and their relationship with multidrug resistance protein 1 in mouse bone marrow mononuclear cells. *Immunology*. 2007;121:122-8.

LAANE E, PANARETAKIS T, POKROVSKAJA K, BUENTKE E, CORCORAN M, SÖDERHÄLL S, HEYMAN M, MAZUR J, ZHIVOTOVSKY B, PORWIT A, GRANDÉR D. Dexamethasone-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia involves differential regulation of Bcl-2 family members. *Haematologica*. 2007; 92(11):1460-9.

LAMKANFI, M, DECLERCQ W, KALAI M, SAELENS X, VANDENABEELE P. A lice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ*. 2002; 9,358-361

LEE JH, CHEONG J, PARK YM, CHOI YH. Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by beta-lapachone in human prostate carcinoma cells. *Pharmacol Res*. 2005; 51(6):553-60.

LEGRAND O, PERROT JY, TANG R, SIMONIN G, GURBUXANI S, ZITTOUN R, MARIE JP. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) mRNA and protein in normal peripheral blood and bone marrow haemopoietic cells. *Br J Haematol*. 1996;94:23-33.

LEITE DF, ECHEVARRIA-LIMA J, CALIXTO JB, RUMJANEK VM. Multidrug resistance related protein (ABCC1) and its role on nitrite production by the murine macrophage cell line RAW264.7. *Biochem Pharmacol*. 2007;73:665-74.

LEITE DF, ECHEVARRIA-LIMA J, SALGADO LT, CAPELLA MA, CALIXTO JB, RUMJANEK VM. In vivo and in vitro modulation of MDR molecules in murine thymocytes. *Int Immunopharmacol*. 2006; 6:204-15.

LI CJ, AVERBOUKH L, PARDEE AB. Beta-Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. *J Biol Chem*. 1993;268(30):22463-8.

LIU F, XIE ZH, GAI GP, JIANG YY. The effect of survivin on multidrug resistance mediated by P-glycoprotein in MCF-7 and its adriamycin resistant cells. *Biol Pharm Bull*. 2007; 30(12):2279-83.

LI YH, HU CF, SHAO Q, HUANG MY, HOU JH, XIE D, ZENG YX, SHAO JY. Elevated expressions of survivin and VEGF protein are strong independent predictors of survival in advanced nasopharyngeal carcinoma. *J Transl Med*. 2008;6:1.

LIEN YC, KUNG HN, LU KS, JENG CJ, CHAU YP. Involvement of endoplasmic reticulum stress and activation of MAP kinases in beta-lapachone-induced human prostate cancer cell apoptosis. *Hist and Histopat.* 2008; 23:1299-1308.

LINARD MCF, OLIVEIRA MM, SAMPAIO MRP. A Lapachol Derivative Active against Mouse Lymphocytic Leukemia P-388. *J Med Chem.* 1975; 18:1159-1161

LIU CJ, DEAVOURS BE, RICHARD SB, FERRER JL, BLOUNT JW, HUHMAN D, DIXON RA, NOEL JP. Structural basis for dual functionality of isoflavonoid O-methyltransferases in the evolution of plant responses. *Plant Cell.* 2006;18(12):3656-69.

LIU M, LI D, ANEJA R, JOSHI HC, XIE S, ZHANG C, ZHOU J. PO2-dependent Differential Regulation of Multidrug Resistance 1 Gene Expression by the c-Jun NH2-terminal Kinase Pathway. *J Biol Chem.* 2007; 282(24):17581-86.

LOCKSLEY RM, KILLEEN N, LENARDO MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001;104:487-501.

LOZZIO BB, LOZZIO CB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* 1975;45(3):321-34.

LUKENS JN. Leucemia linfocítica aguda, in: LEE GR, BITHELL TC; FOERSTER J; ATHENS JW; LUKENS JN. Wintrobe Hematologia Clínica, Manole Ltda, São Paulo. 1998; 72:2083-2113

MA, Y E HENDERSHOT, LM. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J. Chem. Neuroanat.* 2004; 28:51-65

MACKRILL JJ. Ryanodine receptor calcium channels and their partners as drug targets. *Biochem Pharmacol.* 2010; 79:1535-1543.

MAIA RC, VASCONCELOS FC, BACELAR TS, SALUSTIANO EJS, DA SILVA LFR, PEREIRA DL, MOELLMAN-COELHO A, NETTO CD, DA SILVA AJM, RUMJANEK VM, COSTA PRR. LQB-118, a pterocarpanquinone structurally related to lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone]: a novel class of agent with high apoptotic effect in chronic myeloid leukemia cells. *Invest New Drugs.* 2010. [Epub ahead of print]

MARCHES R, HSUEH R, UHR JW. Cancer Dormancy and cell signaling: Induction of p21 (waf1) initiated by membrane IgM engagement increases survival of B lymphoma cells.

MARCINIAK SJ, YUN CY, OYADOMARI S, NOVOA I, ZHANG Y, JUNGREIS R, NAGATA K, HARDING HP, RON D. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 2004; 18(24):3066-77.

MARCO F, BUREO E, ORTEGA JJ, BADELL I, VERDAGUER A, MARTINEZ A, MUÑOZ A, MADERO L, OLIVÉ T, CUBELLS J, CASTEL V, SASTRE A, MALDONADO MS, DIAZ MA. High survival rate in infant acute leukemia treated with early high-dose chemotherapy and stem-cell support. *J Clin Oncol.* 2000; 18 (18):3256-61

MARTINVALET D, ZHU P, LIEBERMAN J. Granzyme A induces caspase- independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. 2005;22:355–70

MCCULLOUGH KD, MARTINDALE JL, KLOTZ LO, AW TY, HOLBROOK NJ. *Mol Cell Biol*. 2001;21(4):1249-59.

MES-MASSON AM, SCHAFFHAUSEN B, HASSELL JA. The major site of tyrosine phosphorylation in polyomavirus middle T antigen is not required for transformation. *J Virol*. 1984; 52(2): 457-64.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/INCA (2010). Incidência de Câncer no Brasil. Em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>

MINISTÉRIO DA SAÚDE/INCA (2010). Tipos de Câncer. Em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/subtipos>

MI Q, LANTVIT D, REYES-LIM E, CHAI H, ZHAO W, LEE IS, SÁNCHEZ SP, NGASSAPA O, FARNSWORTH NR, CORDELL GA, KINGHORN AD, PEZZUTO JM. Evaluation of the Potetion Cancer Chemotherapeutic Efficacy of Natural Product Isolates Employing in Vivo Hollow Fiber Tests. *J Nat Prod*. 2002; 65:842-850.

MITSCHER LA. Chemistry of newer antibiotics directed toward overcoming bacterial resistance. *Bull N Y Acad Med*. 1987;63(3):269-94.

MORISHIMA N, NAKANISHI K, TAKENOUCHI H, SHIBATA T, YASUHIKO Y. An Endoplasmic Reticulum Stress-specific Caspase Cascade in Apoptosis Cytochrome c-Independent Activation of Caspase-9 by Caspase-12. *J Biol Chem*. 2002. 277(37):34287-94.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65(1-2): 55-63.

MULLER M, MEIJER C, ZAMAN GJ, BORST P, SCHEPER RJ, MULDER NH, DE VRIES EG, JANSEN PL. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:13033-13037.

NA Y, WANG S, KOHN H. 7-N-(mercaptoalkyl)mitomycins: Implications of Cyclization for Drug Function. *J Am Chem Soc*. 2002;124(17):4666-77

NETTO CD, DA SILVA AJM, SALUSTIANO EJS, BACELAR TS, RIÇA IG, CAVALCANTE MCM, RUMJANEK VM, COSTA PRR. New paterocarpanquinones: Synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF- α modulation in human PBMC. *Bioorg Med Chem*. 2010; 18(4):1610-6

NETTO CD, SALUSTIANO EJS, CASTRO CP, DA SILVA AJM, RUMJANEK VM, COSTA PRR. (\pm)-3,4-Dihydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan and derivatives: Cytotoxic effect on human leukemia cell lines. *Europ J Med Chem* (shot communication). 2009. 44:920-925.

NETTO, CD. Síntese de Pterocarpanos e Pterocarpanoquinonas: Substâncias com Potencial Atividade Antineoplásica, Antimalarial e Leishmanicida. Tese de Doutorado apresentada ao Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) 2007

NGUYEN PM, PARK MS, CHOW M, CHANG JH, WRISCHNIK L, CHAN WK. Benzo[a]pyrene Increases the Nrf2 Content by Downregulating the Keap1 Message. *Toxicol Sci.* 2010;116(2):549-61

NILSSON K, GIOVANELLA BCM STEHLIN JS, KLEIN G. Tumorigenicity of human hematopoietic cell lines in athymic nude mice. *Int J Cancer.* 1977;19(3):337-44.

NOOTER K, WESTERMAN AM, FLENS MJ, ZAMAN GJ, SCHEPER RJ, VAN WINGERDEN KE, BURGER H, OOSTRUM R, BOERSMA T, SONNEVELD P, GRATAMA JW, KOK T, EGGERMONT AMM, BOSMAN FT, STOTER G. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human cancers. *Clin Cancer Res.* 1995; 1:1301-10.

NORBURY CJ, HICKSON ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:367–401. [PubMed: 11264462]

O'BRIEN PJ. Molecular Mechanisms of Quinone Cytotoxicity. *Chem Biol Interactions.* 1991; 80:1-41

OHSUGI Y, GERSHWIN ME, OWENS RB, NELSON-REES WA. Tumorigenicity of human malignant lymphoblasts: comparative study with unmanipulated nude mice, antilymphocyte serum-treated nude mice, and X-irradiated nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 1980 Oct;65(4):715-8.

OKURA T, IBE M, UMEGAKI K, SHINOZUKA K, YAMADA S. Effects of dietary ingredients on function and expression of P-glycoprotein in human intestinal epithelial cells. *Biol Pharm Bull.* 2010; 33(2):255-9.

Oncologychannel. www.oncologychannel.com, 2008.

OYADOMARI S AND MORI M. Roles of CHOP/GADD 153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 2004; 11:381-389.

PALMA M, KOKHAEI P, LUNDIN J, CHOUDHURY A, MELLSTEDT H, OSTERBORG A. The biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. 2006; 17 Suppl 10:x144-54.

PAWELETZ N. Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2:72–5.

PENDINO F, FLEXOR M, DELHOMMEAU F, BUET D, LANOTTE M, SEGAL-BENDIRDJIAN E. Retinoids down-regulates telomerase and telomere length in a pathway distinct from leukemia cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98 (12):6662-7.

PÉREZ-LOUZADA J; GONZÁLES-SARMIENTO R; SÁNCHEZ-GARCIA I. El cromosoma Filadelfia: desde el gen hacia mecanismos terapéuticos. *Sangre.* 1998, 43 (2): 127 – 135.

POTSCHKA H, BALTES S, LÖSCHER W. Inhibition of multidrug transporters by verapamil or probenecid does not alter blood-brain barrier penetration of levetiracetam in rats. *Epilepsy Res.* 2004; 58:85-91

PREVARSKAYA N, ZHANG L, BARRITT G. TRP channels in cancer. *Biochim et Biophys Acta.* 2007; 1772:937-946.

PUI CH, GAYNON PS, BOYETT JM, CHESSELLS JM, BARUCHEL A, KAMPS W, SILVERMAN LB, BIONDI A, HARMS DO, VILMER E, SCHRAPPE M, CAMITTA B. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet.* 2002;359(9321):1909-15.

PULTE D, GONDOS A, BRENNER H. Improvements in survival of adults diagnosed with acute myeloblastic leukemia in the early 21st century. *Haematologica.* 2008; 93(4):594-600

PULVERTAFT JV. Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet.* 1964;1(7327):238-40.

PUTHALAKATH H, O'REILLY LA, GUN P, LEE L, KELLY PN, HUNTINGTON ND, HUGHES PD, MICHALAK EM, MCKIMM-BRESCHKIN J, MOTOYAMA N, GOTOH T, AKIRA S, BOUILLET P, STRASSER A. ER stress trigger apoptosis by activating BH3-only protein BIM. *Cell.* 2007; 129(7):1337-49.

RAI NK, TRIPATHI K, SHARMA D, SHUKLA VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds.* 2005;4:138-44.

RIÇA IG, Trabalho final de graduação em Ciências Biológicas – Modalidade Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) 2008.

ROHATINER A; LISTER TA. Acute myelogenous leukemia in adults, in: HENDERSON ES, LISTER TA, GREAVES MF. Leukemia, 6^a edição. WB Saunders, London, England; 1996; 22:479-508

ROWE JM. Innovative Approaches in the treatment and Support of Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Oncologist.* 2007;12 Suppl 2:1

RUMJANEK VM, TRINDADE GS, WAGNER-SOUZA K, MELLETI-DE-OLIVEIRA MC, MARQUES-SANTOS LF, MAIA RC, CAPELLA MAM. Multidrug resistance in tumour cells: characterisation of

RUSSELL JH, LEY TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:323-70.

SALUSTIANO EJS, NETTO CS, FERNANDES RF, DA SILVA AJM, BACELAR TS, CASTRO CP, BUARQUE CD, MAIA RC, RUMJANEK VM, COSTA PRR. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, α -lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. *Invest New Drugs.* 2009; 28(2):139-44.

SANGFELT O, ERICKSON S, CASTRO J, HEIDEN T, EINHORN S, GRANDÉR D. Induction of apoptosis and inhibition of cell growth are independent responses to interferon-alpha in hematopoietic cell lines. *Cell Growth Differ.* 1997; 8(3):343-52.

SARKADI B, HOMOLYA L, SZAKÁCS G, VÁRADI A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev.* 2006; 86(4):1179-236.

SAUNA ZE, AMBUDKAR SV. About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6(1):13 – 23.

SCHEPER RJ, BROXTERMAN HJ, SCHEFFER GL, KAAIJK P, DALTON WS, VAN-HEIFNINGEN THM. Overexpression of a M(r) 110.000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.* 1993; 53:1475-9.

SCHEUNER D, SONG B, MCEWEN E, LIU C, LAYBUTT R, GILLESPIE P, SAUNDERS T, BONNER-WEIR S, KAUFMAN RJ. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell.* 2001; 7(6):1165-76.

SCHIMMER AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res.* 2004; 64:7183–90.

SCHNEIDER U, SCHWENK HU, BORNKAMM G. Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-hodgkin lymphoma. *Int J Cancer.* 1977;19(5):621-6.

SERMEUS A, COSSE JP, CRESPIEN M, MAINFROID V, DE LONGUEVILLE F, NINANE N, RAES M, REMACLE J, MICHIELS C. Hypoxia induces protection against etoposide-induced apoptosis: molecular profiling of changes in gene expression and transcription factor activity. *Mol Cancer.* 2008; 7(1):27

SESSIONS J. Chronic myeloid leukemia in 2007. *J Manag Care Pharm.* 2007; 13 (8 Suppl A):4-7.

SHAH NP. Medical Management of CML. *Hematology Am Soc. Hematol Educ Program.* 2007; 2007:371-5.

SHILKAITIS A, GREEN A, STEELE V, LUBET R, KELLOFF G, CHRISTOV K. Neoplastic transformation of mammary epithelial cells in rats is associated with decreased apoptotic cell death. *Carcinogenesis.* 2000;21(2):227-33.

SINGHAL PC, KAPASI AA, REDDY K, FRANKI N, GIBBONS N, DING G. Morphine promotes apoptosis in jurkat cells. *J Leukoc Biol.* 1999;66(4):650-8.

SONG B, SCHEUNER D, RON D, PENNATHUR S AND KAUFMAN RJ. CHOP deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J. Clin. Invest.* 2007. 119:1337-1349.

STAMS WA, DEN BOER ML, HOLLEMAN A, APPEL IM, BEVERLOO HB, VAN WERING ER, JANKA-SCHAUB GE, EVANS WE, PIETERS R. Asparagine synthetase expression is linked with L-asparaginase resistance in TEL-AML1-negative but not TEL-AML1-positive pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2005; 105(11):4223-5.

SYNTICHAKI P, TAVERNARAKIS N. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(8):672-84.

SZEGEZDI E, FITZGERALD U, SAMALI AFSHIN. Caspase-12 and ER-Stress-Mediated Apoptosis: the story so far. *Ann. N.Y. Acad Sci*. 2003; 1010: 186-194

TAN AS, BERRIDGE MV. Evidence for NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)-mediated quinone-dependent redox cycling via plasma membrane electron transport: A sensitive cellular assay for NQO1. *Free Rad Biol Med*. 2010; 48:421-429.

THOMPSON HJ, STRANGE R, SCHEDIN PJ. Apoptosis in the Genesis and prevention of Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1992; 1(7):597-602.

TOURNIER C, HESS P, YANG DD, XU J, TURNER TK, NIMNUAL A, BAR-SAGI D, JONES SN, FLAVELL RA, DAVIS RJ. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*. 2000; 288:870-874.

TRAMONTI G, XIE P, WALLNER EI, DANESH FR, KANWAR YS. Expression and functional characteristics of tubular transporters: P-glycoprotein, PEPT1, and PEPT2 in renal mass reduction and diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006; 291(5):972-80.

TRAPANI JA, SMYTH MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:735-47.

TSURUO T, IIDA H, OHKOCHI E, TSUKAGOSHI, SAKURAI Y. Establishment and properties of a vincristine-resistant human myelogenous leukemia K562. *Jpn J Cancer*. 1983; 74:751-758

VAN LOO G, VAN GURP M, DEPUYDT B, SRINIVASULA SM, RODRIGUEZ I, ALNEMRI ES, GEVAERT K, VANDEKERCKHOVE J, DECLERCQ W, VANDENABEELE P. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ*. 2002; 9:20-26.

VAUTIER S, FERNANDEZ C, MILANE A, LACOMBLEZ L, DAVRINCHE C, FARINOTTI R. ABCB1 (P-glycoprotéine) et barrière hémato-encéphalique: implication dans les maladies neurologiques et leurs traitements. *J Pharm Clin*. 2006; 25(4):225-35.

VIRCHOW R. Die Cellularpathologie. 1858

VOLK EL, FARLEY KM, LI F, ROBEY RW, SCHNEIDER E. Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Res*. 2003; 62(17):5035-40.

WALLER EK. The role of sargramostin (rhGM-CSF) as immunotherapy. *Oncologist*. 2007;12 Suppl 2:22-6. Review.

- WANG XZ AND RON D. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP kinase. *Science*. 1996; 272:1347-49.
- WEIR EG; BOROWITZ MJ. Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemia. *Sem Hematol*. 2001; 38(2): 124-138
- WHEATLEY SP, MCNEISH IA. Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *Int Rev Cytol*. 2005;247:35-88.
- WHELAN RS, KAPLINSKIY V, KITSIS RN. Cell Death in the Pathogenesis of Heart Disease: Mechanisms and Significance. *Annu. Rev. Physiol*. 2010; 72:19-44.
- WYLLIE AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull*. 1997; 53(3): 451-65.
- YANG YX, HU HD, ZHANG DZ, REN H. Identification of proteins responsible for the development of adriamycin resistance in human gastric cancer cells using comparative proteomics analysis. *J Biochem Mol Biol*. 2007; 40(6):853-60.
- YONEDA T, IMAIZUMI K, OONO K, YURI D, GOMI F, KATAYAMA T, TOHYAMA M. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to ER stress. *J. Biol. Chem*. 2001; 276:13935-13940
- ZHANG G, FANG L, ZHU L, ZHONG Y, WANG PG, SUN D. Syntheses and Biological Activities of 3'-Azido Disaccharide Analogues of Daunorubicin against Drug-Resistant Leukemia. *J Med Chem*. 2006; 49:1792-99.
- ZHAO X, SUN Y, YU H, YE L, ZHANG L, LU J, YUAN Y, QIAN G, GE S. Apoptosis induced by BIK was decreased with RNA interference of caspase-12. *Biochem and Biophys Res Commun*. 2007; 359:896-901.
- ZHIVOTOVSKY B, ORRENIUS S. Carcinogenesis and apoptosis: paradigms and paradoxes. *Carcinogenesis*. 2006; 27(10):1939-45
- ZHU Z, JIANG W, THOMPSON HJ. Effect of energy restriction on tissue size regulation during chemically induced mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1999; 20(9):1721-6.

9. *Anexos*

Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, α -lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells

Eduardo J. S. Salustiano · Chaquip D. Netto · Renata F. Fernandes · Alcides J. M. da Silva · Thiago S. Bacelar · Carolina P. Castro · Camilla D. Buarque · Raquel C. Maia · Vivian M. Rumjanek · Paulo R. R. Costa

Received: 27 November 2008 / Accepted: 10 February 2009
© Springer Science + Business Media, LLC 2009

Summary The pentacyclic 1,4-naphthoquinones **1a–d** were cytotoxic ($IC_{50} \sim 2\text{--}7 \mu\text{M}$) to human leukemic cell lines K562 (oxidative stress-resistant), Lucena-1 (MDR phenotype) and Daudi. Fresh leukemic cells obtained from patients, some with the MDR phenotype, were also sensitive to these compounds. The pentacyclic 1,4-naphthoquinones **1a** and **1c** induced apoptotic cell death in cells from leukemic patients as determined by flow cytometry. Conversely, the cell lines were highly insensitive to lapachol (**2**) and α -lapachone (**3**). Mitomycin-C inhibited cell proliferation at concentrations as low as $0.5 \mu\text{M}$. The low toxicity against lymphocytes activated by phytohemagglutinin shows that these compounds are selective for the cancer cells studied. Previous data suggest that these compounds (**1a–d**) can be bioactivated in situ by reduction followed by rearrangement leading to enones, which are powerful alkylating agents. In contrast, lapachol (**2**) and β -lapachone (**3**), which cannot be bio-

activated by reduction, showed little activity against the same cell lines.

Keywords Naphthoquinones · Lapachol · α -Lapachone · Leukemia · Multidrug resistance · Oxidative stress

Introduction

Naturally occurring quinones and their analogs are important sources of cytotoxic compounds [1–4]. For example, dactinomycin, anthracycline antibiotics (daunorubicin, doxorubicin, idarubicin and mitoxantrone), bleomycins and mitomycin-C have been clinically used for cancer chemotherapy [5–9]. New natural and synthetic cytotoxic compounds of this group have been described in the recent years [5]. The *para*-quinone moiety present in the structure of most of them may participate in the cell redox cycle, acting as a precursor of reactive oxygen species and leading to oxidative stress [1, 2, 5, 6]. Some quinones also act as intercalating agents in the DNA molecule [5] or as inhibitors of enzymes essential for DNA duplication and nucleotide biosynthesis [10–12], or they can be activated in situ by reduction, leading to conjugated intermediates which are powerful alkylating agents [13–17].

As part of a program directed at the discovery of new anticancer drugs, we synthesized a series of pentacyclic 1,4-naphthoquinones of type **1** (Fig. 1) [18]. These compounds were designed as molecular hybrids of the cytotoxic naphthoquinones lapachol (**2**) and α -lapachone (**3**), isolated from *Tabebuia* spp. [1, 2] and natural pterocarpan (**4**), a cytotoxic isoflavonoid isolated from *Petalostemon purpureus* [19–21]. These pentacyclic 1,4-naphthoquinones were cytotoxic to MCF-7, a breast cancer

E. J. S. Salustiano · R. F. Fernandes · T. S. Bacelar · V. M. Rumjanek
Laboratório de Imunologia Tumoral,
Instituto de Bioquímica Médica,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro, Brazil

C. D. Netto · A. J. M. da Silva · C. P. Castro · C. D. Buarque · P. R. R. Costa (✉)
Laboratório de Química Bioorgânica (LQB),
Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais,
Centro de Ciências da Saúde, Bloco H,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil
e-mail: lqb@nppn.ufrj.br

R. C. Maia
Serviço de Hematologia, Instituto Nacional de Câncer,
Rio de Janeiro, Brazil

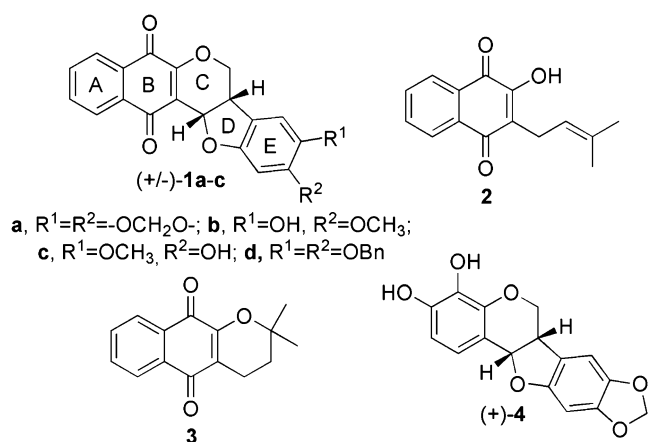


Fig. 1 Pentacyclic naphthoquinones **1a–d**, lapachol (**2**), α -lapachone (**3**) and natural pterocarpin (**4**)

cell line (Table 1), whereas α -lapachone (**3**) was inactive on these cells [18, 22].

It has been reported that MCF-7 cells are resistant to oxidative stress [11]. Since they are sensitive to the 1,4-naphthoquinones, it was felt that the cytotoxicity of these compounds should be studied in other oxidative stress-resistant cell lines as well as in tumor cells obtained from patients.

For this study three human leukemic cell lines were chosen. Daudi, a cell line that does not contain elevated levels of Bcl-2 protein [26], is sensitive to oxidative stress and undergoes lipid peroxidation and apoptosis following the removal of serum, required to maintain growth in vitro. K562 has a high content of glutathione [11]. Lucena-1 [23, 24] was originally selected from K562 for resistance to the *Vinca* alkaloid vincristine (multidrug-resistant phenotype). Lucena-1 cells are also very resistant to oxidative stress; they have a high content of catalase and overexpress ABCB1, a transmembrane protein of the ABC superfamily of transporters which plays an important role in the process of MDR [25]. In addition to these cell lines, fresh leukemic cell samples obtained from patients were also analyzed.

Materials and methods

Cell lines

The human leukemic cell lines Daudi, K562 and its MDR variant, Lucena-1, were all maintained in RPMI-1640 medium, supplemented with 50 μ M β -mercaptoethanol, 25 mM HEPES, pH adjusted to 7.4 with NaOH, 60 mg/L penicillin, 100 mg/L streptomycin and 10% fetal calf serum (FCS), inactivated at 56°C for 1 h. Daudi cells were supplemented with 20% FCS. Vincristine sulfate (60 nM) was added to Lucena-1 cells in order to maintain the MDR phenotype.

Preparation of peripheral blood mononuclear cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by fractionating heparinized blood from healthy volunteers or chronic myeloid leukemia patients admitted to the Hematology Service of the Brazilian National Cancer Institute. Blood was heparinized and fractionated on Ficoll-Hypaque (Hystopaque) by density gradient centrifugation. The PBMC fraction was washed twice and resuspended in RPMI-1640, supplemented as described above, and the cell density was adjusted to 10⁶ cells/mL. Cells were incubated with 5 μ g/mL of the mitogen phytohemagglutinin (PHA), in the presence or absence of the compounds being tested. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Brazilian National Cancer Institute and written informed consent was obtained from the participants according to the Declaration of Helsinki.

Cell treatment

Leukemic cell lines were exposed to the compounds in culture for 72 h. Briefly, 2 \times 10⁴ cells/mL in 200 μ L were seeded in 96-well microtiter plates in drug-free medium or in medium containing different concentrations of each

Table 1 Effect of compounds **1a–d**, **2**, **3** and mitomycin-C on the growth of human cell lines

Cell line	1a	1b	1c	1d	2	3	Mit. C
K562	4.63 \pm 0.90	2.18 \pm 0.28	4.50 \pm 0.64	3.46 \pm 0.60	16.04 \pm 3.21	42.71 \pm 5.57	0.47 \pm 0.08
Lucena-1	5.47 \pm 0.35	2.57 \pm 0.07	4.49 \pm 1.44	3.64 \pm 0.25	20.84 \pm 6.48	47.44 \pm 10.47	2.75 \pm 0.60
Daudi	6.74 \pm 0.62	2.85 \pm 0.75	6.08 \pm 0.82	6.31 \pm 0.79	25.55 \pm 5.06	69.36 \pm 10.06	0.45 \pm 0.03
MCF-7	29.0 \pm 1.30	5.3 \pm 0.70	7.8 \pm 0.60	>100	ND	38.0 ^a	ND
PBMC	23.25 \pm 0.12	ND	23.50 \pm 1.28	8.56 \pm 0.54	ND	ND	4.03 \pm 1.35

Results are reported as IC₅₀ values \pm SD (concentration required to inhibit cell growth by 50%) in micromolar. Data represent the means of three independent experiments, with each concentration tested in triplicate. Assays were performed as described in the “Materials and methods” section

ND not done

^a Ref. [22]

compound and maintained for 72 h at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂, and cell viability was then measured.

Cell viability

Cell viability was determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) colorimetric assay. MTT can be reduced by dehydrogenases present in active mitochondria of living cells. After 72 h of incubation in the presence or absence of the drugs being tested, 20 µL of MTT (5 mg/mL) was added to each well. Plates were then kept at 37°C in 5% CO₂ for 3 h. After centrifugation, 200 µL of DMSO was added to all wells in order to dissolve the dark blue crystals formed by the reduction of MTT. Absorbance was measured with an ELISA reader at 490 nm. Absorbance was directly proportional to the amount of

formazan (reduction product) present, indicating the percentage of living cells.

Analysis of apoptosis

Leukemic cells from patients were cultured for 24 h at 37°C in the presence of 5 µM **1a** and **1c**. The percentage of apoptotic cells was assessed using the Annexin V assay. Cells were stained with FITC-labeled Annexin V as described by our group [31].

Detection of MDR phenotype

To measure ABCB1 and ABCC1 expression, leukemic cells were incubated with anti-ABCB1 or anti-ABCC1 monoclonal antibody for 30 min. After incubation, cells were washed and incubated with rabbit anti-mouse antibody for another 30 min.

Fig. 2 Effects of compounds **1a–d** on the viability of (a) K562, (b) Lucena-1 and (c) Daudi cell lines. Viability was determined by MTT assay after 72 h incubation with the drugs. Control cells were treated with diluent. Each point of the experiment was performed in triplicate and results are reported as the mean±SD of at least three independent experiments

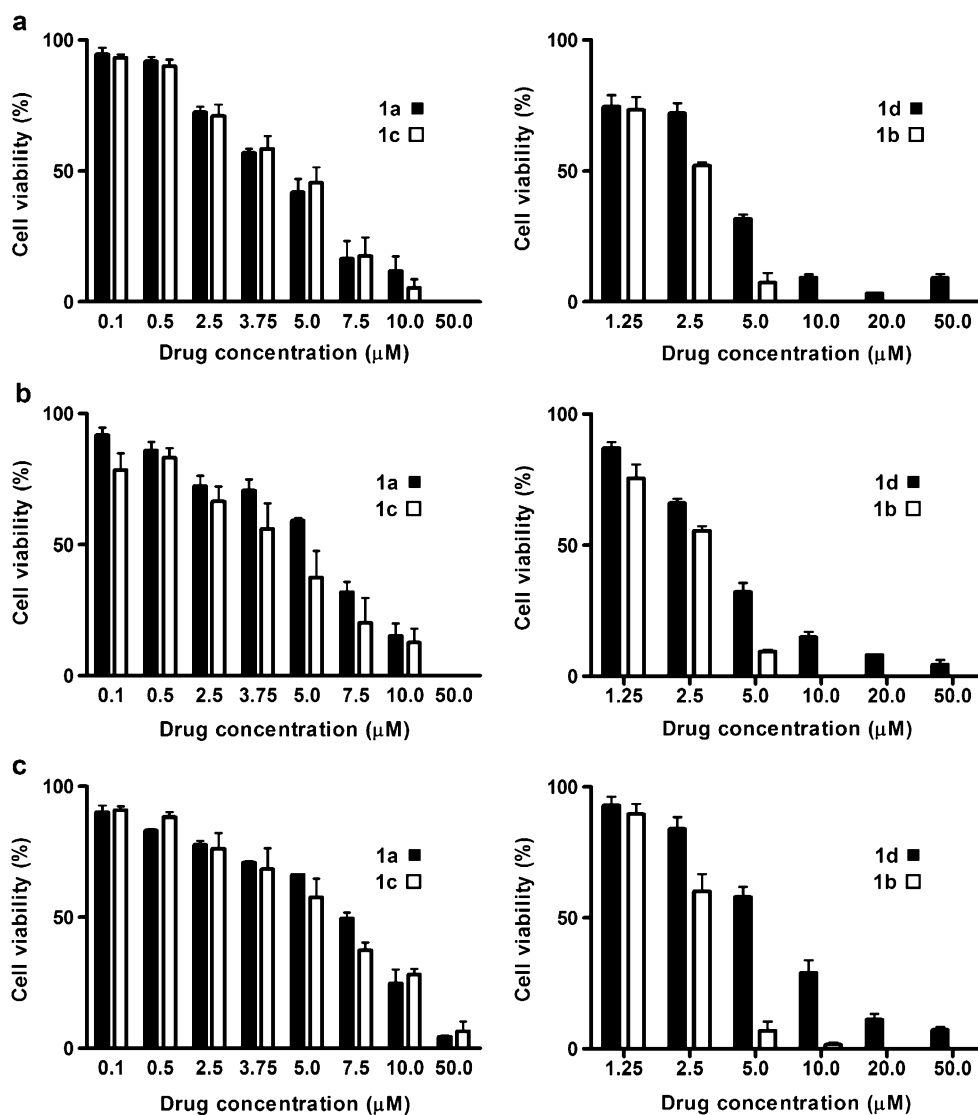
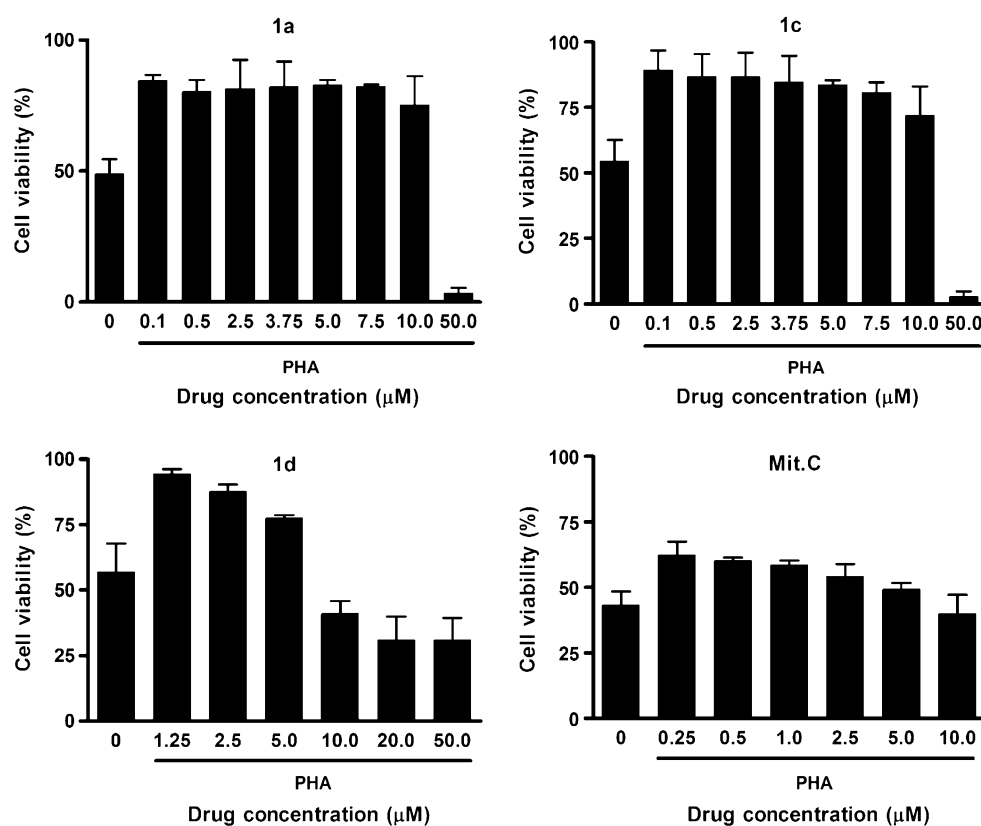


Fig. 3 Effect of compounds **1a**, **1c**, **1d** and mitomycin-C on the viability of normal human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Viability was determined by MTT assay after 72 h incubation with the drugs. PBMC were stimulated with the mitogen PHA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Control cells were treated with diluent and no PHA. Each point of the experiment was performed in triplicate and results are reported as the mean \pm SD of at least three independent experiments



For the determination of MDR activity, leukemic cells were incubated with rhodamine-123 plus cyclosporin A. Both ABCB1 and ABCC1 expression levels and functional activity were determined by flow cytometry [32].

Results

Compounds **1a–d** were synthesized as described by our laboratory [18]. Their cytotoxic effects on MCF-7, K562, Lucena-1 and Daudi cell lines are shown in Table 1. As previously reported [18], the potency toward MCF-7 cells was dependent on the of substitutions at the E-ring. Compounds **1b** and **1c**, bearing a phenol group at this ring, were fivefold and fourfold more active, respectively, than **1a**, in which the oxygen atoms are part of the apolar methylenedioxy group. Compound **1d**, bearing two apolar benzyloxy groups, exhibited the lowest activity on the MCF-7 cell line (Table 1).

In contrast, the cytotoxic effect of these quinones on the K562, Lucena-1 and Daudi cell lines (Table 1) was less dependent on the substitutions at the E-ring: compounds **1a–d** were almost equipotent. Interestingly, K562 and Lucena-1 were slightly more sensitive than Daudi cells (Table 1 and Fig. 2). The toxicity toward human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) activated by PHA was also determined for **1a**, **1c** and **1d**. Compounds **1a** and **1c**

had IC_{50} values above 23 μM , whereas for compound **1d** the IC_{50} value was 8.56 μM (Table 1 and Fig. 3).

Lapachol (**2**) and α -lapachone (**3**), lacking D- and E-rings in their structures, required extremely high concentrations to induce cytotoxicity in the same cells. Mitomycin-C, a drug used as a reference that shares the *para*-quinone moiety with **1a–d**, inhibited cell growth by nearly 50% when 0.5 μM was used.

The cell lines K562 and Lucena-1 are chronic myeloid leukemias (CML), whereas Daudi derives from a Burkitt's lymphoma. Studies using compounds **1a** and **1c** suggested that **1a** induced apoptosis while **1c** induced both apoptosis and necrosis. Compounds **1a** and **1c** were tested against patients' leukemic cells, with eight samples being from

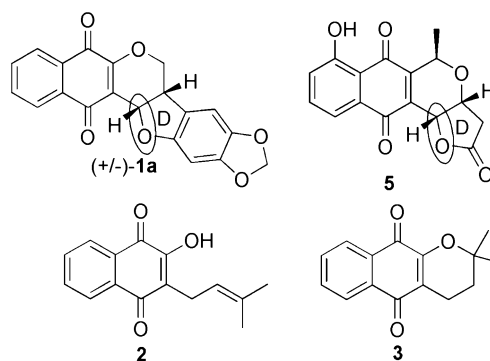


Fig. 4 Structural comparison of naphthoquinones **1a**, **2**, **3** and **5**

patients with CML and one from a patient with acute lymphoid leukemia (ALL). Apoptosis was measured after 24 h incubation with 5 μ M of the compounds. When CML samples were tested, the median percentage of apoptosis obtained with both compounds was 12.5% (range=2% to 42% for **1a** and 2% to 60% for **1c**). In the only sample from an ALL patient, 39% of the cells died of apoptosis in the first 24 h with either compound. Other leukemia cells were also tested: two acute myeloid leukemia (AML) and two chronic lymphoid leukemia (CLL) samples were sensitive to compounds **1a** and **1c**. Furthermore, nine of the 13 patients' samples tested expressed ABCB1 and 11 expressed ABCC1, another transmembrane protein of the ABC superfamily of transporters that is also involved in the mechanism underlying multidrug resistance. These results, when taken together with those on cell lines, suggest that compounds **1a** and **1c** are not substrates for these ABC transporters.

Discussion

Xenobiotic quinones can be converted into cytotoxic semiquinone radicals through one-electron reduction by enzymes such as NADH cytochrome *b5* reductase and NADPH:cytochrome P-450 reductase [1, 27, 28]. Recently, cyclic voltammetric studies performed with **2** in the presence and absence of oxygen clearly indicated the formation of semiquinone anion and HOO• [29]. Alternatively, quinones can be reduced by a two-electron process mediated by NAD(P)H quinone oxidoreductase (NQO1 or DT-diaphorase) [27, 28, 30], leading to the corresponding hydroquinone which can be transformed into more polar products to be excreted. It has been proposed that **2** inhibits DT-diaphorase [30]. It was also reported that **3** inhibits topoisomerase II [10] and this effect seems to be associated with the redox properties of this compound since it is reversed in the presence of antioxidants [11].

It is reasonable to suppose that our pentacyclic 1,4-naphthoquinones **1a–d** can undergo a similar metabolic reaction, acting via oxidative stress mainly on Daudi cells, which are sensitive to oxidative stress [26]. However, for K562 and Lucena-1, cells that are resistant to oxidative stress [11, 23, 24], this mechanism should be less important. In contrast to **2** and **3**, compounds **1a–d** present a C–O bond at the D-ring and in principle could be activated by reduction as suggested for kalafungin (**5**), an antibiotic produced by various species of *Streptomyces* [15]. Kalafungin (**5**) acts as an antibiotic [15] through a mechanism similar to those proposed for mitomycin C and analogs [5–7, 16], and for model quinomethanes [13, 14, 17]. After reduction of kalafungin (**5**) by NQO1, the resulting hydroquinone undergoes a rearrangement, leading

to a Michael *bis*-acceptor which reacts with essential nucleophiles in the cell, as proposed by Moore and Czeniak [15]. Since compounds **1a–d** are structurally correlated with kalafungin (**5**) (Fig. 4), we believe that, like kalafungin (**5**), these compounds can be activated by two-electron reduction, generating an electrophilic species that could act as a pro-alkylating agent, forming covalent bonds with DNA, glutathione and other essential nucleophiles. Work is in progress to investigate this mechanistic possibility.

In contrast to MCF-7 cells, the cytotoxic effect of **1a–d** on leukemic cells was less dependent on the pattern of substitution at the E-ring, with compounds **1a–d** almost equipotent on these cell lines and compounds **1a** and **1c** having similar effects on patients' samples. Furthermore, these compounds were active against cell lines and patients' samples expressing the multidrug resistance phenotype. This indicates that they are not substrates for ABCB1 or ABCC1, and can reach intracellular concentrations required for the cytotoxic effect.

In conclusion, the fact that compounds **1a–d** were active on K562 and Lucena-1 cell lines (oxidative stress-resistant) indicates that the bioreductive activation of pentacyclic naphthoquinones type **1** could be responsible for the cytotoxic effect on these cells. The low toxicity against PBMC activated by PHA indicates that compounds **1a** and **1c** show some degree of selectivity for the cancer cells studied. Furthermore, leukemic cells obtained from patients were also sensitive to compounds **1a** and **1c**. Therefore, our data suggest that the pentacyclic quinones studied herein might be important for the treatment not only of solid tumors, but also of multidrug-resistant leukemias.

Acknowledgments The authors would like to thank Flavia C. Vasconcelos and Luiz Felipe R. Silva for the technical support with the experiments involving patients' samples. Research was supported by grants from Financiadora de Estudos e Projetos—FINEP, Programa de Oncobiologia, Fundação Ary Frauzino/Fundação Educacional Charles Darwin—FAF/FECD, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência—PRONEX, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro—FAPERJ, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq, Swissbridge Foundation, Pensa Rio-FAPERJ and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—CAPES. We are grateful to Dr. Ottilia R. Affonso-Mitidieri for the useful suggestions and Central Analítica NPPN-UFRJ for the analytical data.

References

- O'Brien PJ (1991) Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem Biol Interact* 80:1–41 doi:10.1016/0009-2797(91)90029-7
- Salas C, Tapia RA, Ciudad K, Armstrong V, Orellana M, Kemmerling U, Ferreira J, Maya JD, Morello A (2008) *Trypanosoma cruzi*: activities of lapachol and alpha- and beta-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorg Med Chem* 16:668–674 doi:10.1016/j.bmc.2007.10.038

3. Linardi MCF, de Oliveira MM, Sampaio MRP (1975) A lapachol derivative active against mouse lymphocytic leukemia P-388. *J Med Chem* 18:1159–1161 doi:10.1021/jm00245a027
4. Portela MPM, Stoppani AOM (1996) Redox cycling of β -lapachone and related *o*-naphthoquinones in the presence of dihydrolipoamide and oxygen. *Biochem Pharmacol* 51:275–283 doi:10.1016/0006-2952(95)02168-X
5. Williams DA, Lemke TL (2002) Foye's principles of medicinal chemistry, 3rd edn. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, pp 924–951
6. Galm U, Hager MH, Lanen SGV, Ju J, Thorson JS, Shen B (2005) Antitumor antibiotics: bleomycin, enediynes, and mitomycin. *Chem Rev* 105:739–758 doi:10.1021/cr030117g
7. Wolkenberg SE, Boger DL (2005) Mechanisms of in situ activation for DNA-targeting antitumor agents. *Chem Rev* 102:2477–2495 doi:10.1021/cr010046q
8. Gewirtz DA (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57:727–741 doi:10.1016/S0006-2952(98)00307-4
9. Zhang G, Fang L, Zhu L, Zhong Y, Wang PG, Sun D (2006) Syntheses and biological activities of 3'-azido disaccharide analogues of daunorubicin against drug-resistant leukemia. *J Med Chem* 49:1792–1799 doi:10.1021/jm050916m
10. Krishnan P, Bastow KF (2000) Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives—eleutherin, α -lapachone, and β -Lapachone. *Biochem Pharmacol* 60:1367–1379 doi:10.1016/S0006-2952(00)00437-8
11. Chau Y, Shiah S, Don M, Kuo M (1998) Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor β -lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. *Free Radic Biol Med* 24:660–670 doi:10.1016/S0891-5849(97)00337-7
12. Gantchev TG, Hunting DJ (1998) The *ortho*-quinone metabolite of the anticancer drug etoposide (VP-16) is a potent inhibitor of the topoisomerase II/DNA cleavable complex. *Mol Pharmacol* 53:422–428
13. Lin AJ, Cosby LA, Shansky CW, Sartorelli AC (1972) Potential bioreductive alkylating agents 1. benzoquinone derivatives. *J Med Chem* 15:1247–1252 doi:10.1021/jm00282a011
14. Lin AJ, Pardini RS, Cosby LA, Lillis BJ, Shansky CW, Sartorelli AC (1973) Potential bioreductive alkylating agents 2. Antitumor effect and biochemical studies of naphthoquinone derivatives. *J Med Chem* 16:1268–1271 doi:10.1021/jm00269a010
15. Moore HW, Czerniak R (1981) Naturally occurring quinones as potential bioreductive alkylating agents. *Med Res Rev* 1:249–280 doi:10.1002/med.2610010303
16. Denny WA (2000) The role of hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy. *Lancet Oncol* 1:25–29 doi:10.1016/S1470-2045(00)00006-1
17. de Abreu FC, Lopes ACO, Goulart MOF (2004) Influence of the leaving group and of the annelation in the electroreduction of 2-methyl-substituted quinones. *J Electroanal Chem* 562:53–59 doi:10.1016/j.jelechem.2003.07.038
18. da Silva AJM, Buarque CD, Brito FV, Aurelian L, Macedo LF, Malkas LH, Hickey RJ, Lopes DVS, Nöl F, Murakami YLB, Silva NMV, Melo PA, Caruso RRB, Castro NG, Costa PRR (2002) Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of new (\pm) 1,4-naphthoquinones structurally related to lapachol. *Bioorg Med Chem* 10:2731–2738 doi:10.1016/S0968-0896(02)00100-1
19. Chaudhuri SK, Huang L, Fullas F, Brown DM, Wani MC, Wall ME (1995) Isolation and structure identification of an active DNA strand scission agent, (+)-3,4-dihydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan. *J Nat Prod* 58:1966–1969 doi:10.1021/np50126a030
20. da Silva AJM, Netto CD, Costa PRR (2004) The first synthesis of (\pm)-3,4-dihydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan, an antitumoral agent and its coumestan derivative. *J Braz Chem Soc* 15:979–981
21. Netto CD, Santos ES, Castro CP, da Silva AJ, Rumjanek VM, Costa PR (2008) (+/-)-3,4-Dihydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan and derivatives: cytotoxic effect on human leukemia cell lines. *Eur J Med Chem*. doi:10.1016/j.ejmech.2008.01.027
22. Mi Q, Lantvit D, Reyes-Lim E, Chai H, Zhao W, Lee I, Peraza-Sánchez S, Ngassapa O, Kardono LBS, Riswan S, Hollingshead MG, Mayo JG, Farnsworth NR, Cordell GA, Kinghorn AD, Pezzuto JM (2002) Evaluation of the potential cancer chemotherapeutic efficacy of natural product isolates employing in vivo hollow fiber tests. *J Nat Prod* 65:842–850 doi:10.1021/np010322w
23. Rumjanek VM, Trindade GS, Wagner-Souza K, de-Oliveira MC, Marques-Santos LF, Maia RC, Capella MA (2001) Multidrug resistance in tumour cells: characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. *An Acad Bras Cienc* 73:57–69 doi:10.1590/S0001-37652001000100007
24. Trindade GS, Capella MA, Capella LS, Affonso-Mitidieri OR, Rumjanek VM (1999) Differences in sensitivity to UVC, UVB and UVA radiation of a multidrug-resistant cell line overexpressing P-glycoprotein. *Photochem Photobiol* 69:694–699 doi:10.1111/j.1751-1097.1999.tb03348.x
25. Raub TJ (2006) P-glycoprotein recognition of substrates and circumvention through rational drug design. *Mol Pharm* 3:3–25 doi:10.1021/mp0500871
26. Esposti MD, Hatzinisiriou I, McLennan H, Ralph S (1999) Bcl-2 and mitochondrial oxygen radicals. *J Biol Chem* 274:29831–29837 doi:10.1074/jbc.274.42.29831
27. Park HJ, Ahn KJ, Ahn SD, Choi E, Lee SW, Williams B, Kim EJ, Griffin R, Bey EA, Bornmann WG, Gao J, Park HJ, Boothman DA, Song CW (2005) Susceptibility of cancer cells to beta-lapachone is enhanced by ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 61:212–219 doi:10.1016/j.ijrobp.2004.09.018
28. Pink JJ, Planchon SM, Tagliarino C, Varnes ME, Siegel D, Boothman DA (2000) NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of β -lapachone cytotoxicity. *J Biol Chem* 275:5416–5424 doi:10.1074/jbc.275.8.5416
29. Goulart MOF, Falkowski P, Ossowski T, Liwo A (2003) Electrochemical study of oxygen interaction with lapachol and its radical anions. *Bioelectrochemistry* 59:85–87 doi:10.1016/S1567-5394(03)00005-7
30. Preusch PC (1986) Lapachol inhibition of DT-diaphorase (NAD(P)H:quinone dehydrogenase). *Biochem Biophys Res Commun* 137:781–787 doi:10.1016/0006-291X(86)91147-2
31. Vasconcelos FC, Gattass CR, Rumjanek VM, Maia RC (2007) Pomolic acid-induced apoptosis in cells from patients with chronic myeloid leukemia exhibiting different drug resistance profile. *Invest New Drugs* 25:525–533 doi:10.1007/s10637-007-9064-5
32. Vasconcelos FC, Cavalcanti GB, Silva KL, de Meis E, Kwee JK, Rumjanek VM, Maia RC (2007) Contrasting features of MDR phenotype in leukemias by using two fluorochromes: implications for clinical practice. *Leuk Res* 31:445–454 doi:10.1016/j.leukres.2006.07.016



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

New pterocarpanquinones: Synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF- α modulation in human PBMC cells

Chaquip D. Netto^a, Alcides J. M. da Silva^b, Eduardo J. S. Salustiano^c, Thiago S. Bacelar^c, Ingrid G. Riça^d, Moises C. M. Cavalcante^d, Vivian M. Rumjanek^c, Paulo R. R. Costa^{b,*}

^a Laboratório Integrado Multiusuário II, Instituto Macaé de Metrologia e Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, Brazil

^b Laboratório de Química Bioorgânica, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Centro de Ciências da Saúde, Bloco H, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

^c Laboratório de Imunologia Tumoral, Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Bloco H, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

^d Laboratório Integrado Multiusuário I Prof. Vera Koatz, Instituto Macaé de Metrologia e Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 November 2009

Revised 24 December 2009

Accepted 31 December 2009

Available online xxx

Keywords:

Naphthoquinone

Pterocarpan

Catalytic oxa-Heck reaction

Cancer

TNF- α modulation

Bioreduction

ABSTRACT

A new pterocarpanquinone (**5a**) was synthesized through a palladium catalyzed oxyarylation reaction and was transformed, through electrophilic substitution reaction, into derivatives **5b–d**. These compounds showed to be active against human leukemic cell lines and human lung cancer cell lines. Even multidrug resistant cells were sensitive to **5a**, which presented low toxicity toward peripheral blood mononuclear cells (PBMC) cells and decreased the production of TNF- α by these cells. In the laboratory these pterocarpanquinones were reduced by sodium dithionite in the presence of thiophenol at physiological pH, as NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 (NQO1) catalyzed two-electron reduction, and the resulting hydroquinone undergo structural rearrangements, leading to the formation of Michael acceptors, which were intercepted as adducts of thiophenol. These results suggest that these compounds could be activated by bioreduction.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Naturally occurring *para*-quinones and their synthetic analogs are an important source of antineoplastic products^{1–4} and some of these compounds have been used in clinic as anticancer^{5–10} and antiparasitic⁵ drugs. Anthraquinones such as daunorubicin and doxorubicin, used in cancer chemotherapy, act through DNA intercalation. These and other xenobiotic *para*-quinones can be reduced at the mitochondria to the corresponding semiquinone radicals through action of cytochrome P450 reductases (one electron reduction)^{1,2,5,6,10} and the resulting semiquinones can transfer one electron to molecular oxygen. The resulting superoxide anion can be transformed into hydroxyl radical which initiates a cascade of events leading to oxidative stress. Alternatively, enzymes such as NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 (NQO1) catalyze two-electron reduction of xenobiotic *para*-quinones to the corresponding hydroquinones, which are subsequently conjugated (phase II metabolism) and then excreted.^{10–12}

However, some hydroquinones can undergo structural rearrangements leading to the formation of Michael acceptors, that can alkylate essential nucleophiles in the target cells. This process is known as bioreductive activation.^{10,13–18}

As part of a program directed at the discovery of new anticancer drugs, we previously synthesized the natural pterocarpan **1** (Fig. 1) and derivatives.^{19,20} We showed that the compound **1** was active against different leukemic cell lines, including MDR cell lines, and presented low cytotoxicity against lymphocytes activated by the mitogen phytohemagglutinin (PHA).²⁰ However, once catechols can be transformed in vivo into the corresponding *ortho*-quinones, compound **2** was considered as a possible metabolite of **1** and was prepared by the oxidation of the catechol system at ring A in **1**.²⁰ *ortho*-Quinone **2** was more potent against leukemic cells but presented high cytotoxicity against lymphocytes activated by PHA.²⁰ In order to prepare more active and less toxic compounds, we designed new derivatives, named pterocarpanquinones, in which the pro-toxic catechol group was changed by a naphthoquinone group. These compounds can also be seen as analogs of Kalfungin, an antimicrobial agent obtained from the culture broth of a soil isolate of *Streptomyces tanashiensis*, sharing in their structures the dihydrofuran moiety.^{21,22}

Pterocarpanquinones **4a–g** were synthesized and presented antineoplastic effect on human leukemic cell lines mentioned above²³ and MCF-7 breast cancer cell line.²⁴ Some of these pterocarpanquinones were also active in fresh leukemic cell samples obtained from patients and overexpressing ATP-binding cassette transporters (ABC) proteins.²³ On the other hand, these pterocarpanquinones showed low cytotoxicity to peripheral blood

* Corresponding author. Tel.: +55 21 2562 6793; fax: +55 21 2562 6512.
E-mail address: prrcosta@ism.com.br (P.R.R. Costa).

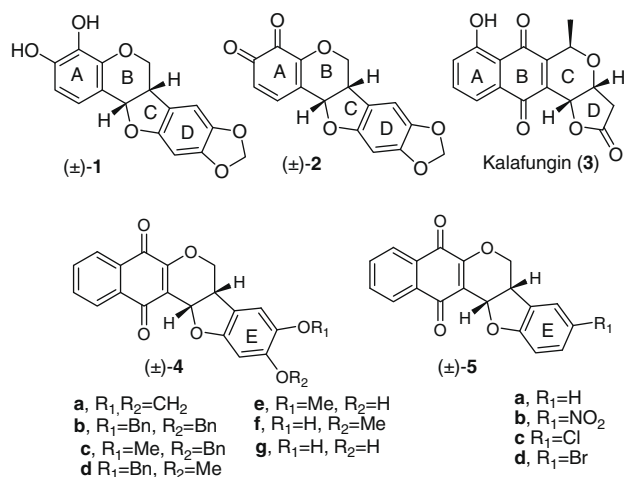


Figure 1. Pterocarpan, lapachol, and pterocarpanquinones.

mononuclear cells (PBMC) activated by PHA.²³ While in MCF-7 cells the antineoplastic activity was stronger for compounds bearing a phenol group at the E ring, the antileukemic profile was independent on the oxygenation pattern at this ring.²⁴ So, in order to know more about the structure–activity relationships, we decided to synthesise a new derivative (**5a**) without substitution at the E ring. Related non phenolic derivatives **5b–d** were also prepared and their antineoplastic activity was also evaluated. Antineoplastic effect of these new pterocarpanquinones on leukemia and lung human cell lines, and TNF- α modulation in PBMC cells was studied.

2. Results

2.1. Chemistry

Although very promising, pterocarpanquinones **4a–d** were synthesized²⁴ through the oxyarylation of chromenone **6** by *ortho*-mercuryphenols **8a–d** under the conditions developed by Horino and Cols²⁵ (stoichiometric PdCl₂, LiCl in acetone, condition A, Scheme 2, Table 1, entries 1–4). However, this procedure is expensive and the use of organomercurial reagents are not recommended to prepare drug candidates.

In contrast to the Heck reaction, only few examples of catalytic oxyarylation (oxa-Heck reaction) of olefins are described in the literature, and in these cases *ortho*-iodophenols^{26–29} were used instead *ortho*-mercuryphenols and we decided to try these more adequate procedures using **9** as source of the organopalladium species to prepare the pterocarpanquinone **4d**. Once arylbromides are also substrates for Heck reactions, compound **10** was also studied.³⁰

In contrast with the easy preparation of oxygenated *ortho*-mercury phenols by direct mercuriation of the corresponding

phenols,^{19,24,25} oxygenated *ortho*-iodo phenols are more difficult to obtain and only few examples describing the iodination of these very reactive substrates are reported in the literature. In our hands, phenol **7** could not be transformed into the corresponding *ortho*-iodophenol **9** when allowed to react with *N*-iodosuccinimide in trifluoroacetic acid or acetonitrile.^{31,32} In both cases a complex mixture of products was formed. However, **9** could be prepared from the corresponding *ortho*-mercuryphenol **8d** by reaction with I₂. On the other hand, the *ortho*-bromophenol **10** was prepared from phenol **7** by reaction with NBS (Scheme 1).^{33,34}

Unfortunately, attempts to accomplish the oxyarylation of **6** by **9** or **10** under the conditions favoring the neutral mechanism (Pd(OAc)₂, Et₃N, Condition B)^{26,27} or under conditions favoring the cationic mechanism (Pd(OAc)₂, Ag₂CO₃, Condition C)²⁸ did not lead to the desired adduct **4d** (Table 1, entries 5 and 6).

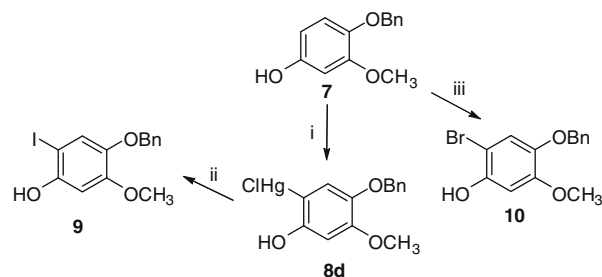
Probably, under the conditions employed it was not possible to accomplish the oxidative addition of Pd(O) in the C–I bond in *ortho*-iodophenol **9** and *ortho*-bromophenol **10**. This step is disfavored by the presence of electron releasing groups in the aromatic ring.

Next, we decided to accomplish the catalytic oxyarylation reaction of **6** using *ortho*-iodophenol (**11**). Compound **5a** was not formed in condition B (Scheme 3, Table 2, entry 1), but in condition C this pterocarpanquinone was obtained in 41% yield (entry 2). A similar yield was obtained in the absence of PPh₃ (entry 3).

Pterocarpanquinones **5b–d** were obtained from **5a** by electrophilic substitution, taking advantage of the great reactivity of E-ring for electrophilic aromatic substitution over the A-ring, which is deactivated due to the conjugation with the carbonyl groups of the quinone moiety (Scheme 4).^{33,35}

2.2. Pharmacology

The pterocarpanquinones **5a–d** were evaluated on two human leukemic cell lines, K562 and HL-60. K562 cells, from a chronic

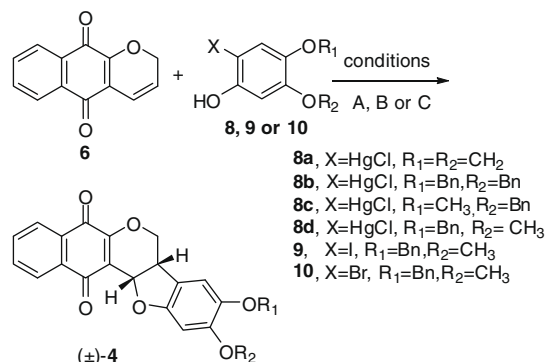


Scheme 1. Synthesis of *o*-halophenols. Reagents and conditions: (i) Hg(OAc)₂/LiCl/rt/quantitative yield; (ii) I₂, THF, rt, quantitative yield; (iii) NBS, CH₃CN, –30 °C, 75%.

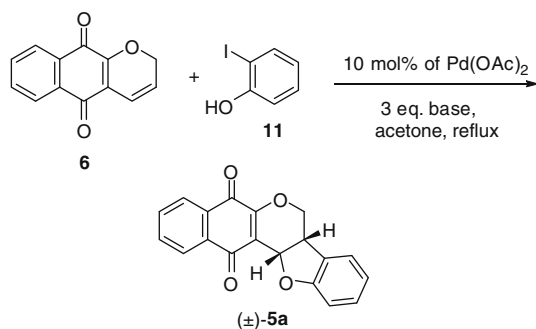
Table 1
Yields and major conditions for reactions showed in Scheme 1

Entry	(Ar–X)	Conditions	4 (yield%)
1	8a	A	4a (57)
2	8b	A	4b (50)
3	8c	A	4c (58)
4	8d	A	4d (55)
5	9	C	–
6	10	B or C	–

Conditions A = stoichiometric PdCl₂, LiCl in acetone at room temperature for 12 h. Conditions B = 10 mol % Pd(OAc)₂, 20 mol % PPh₃, 3.0 equiv Et₃N, acetone, reflux for 12 h. Conditions C = 10 mol % Pd(OAc)₂, 20 mol % PPh₃, 3.0 equiv Ag₂CO₃, acetone, reflux for 12 h.



Scheme 2. Synthesis for pterocarpanquinones **4a–d**.



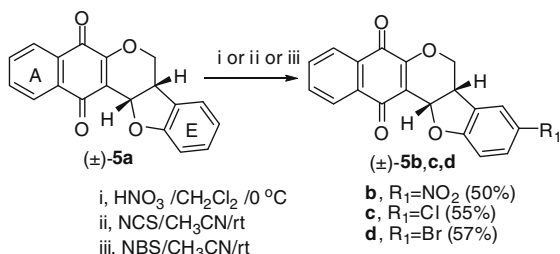
Scheme 3. Synthesis of pterocarpanquinone **5a** by catalytic oxy-arylation of **6**.

Table 2

Yields and major conditions for reactions showed in Scheme 3

Entry	Condition	PPh ₃	5a (yield%)
1	B	0.2 equiv	—
2	C	0.2 equiv	41
3	C	—	40

Conditions B = 10 mol % Pd(OAc)₂, 20 mol % PPh₃, 3.0 equiv Et₃N, acetone, reflux for 12 h. Conditions C = 10 mol % Pd(OAc)₂, 20 mol % PPh₃, 3.0 equiv Ag₂CO₃, acetone, reflux for 12 h.



Scheme 4. Synthesis of pterocarpanquinones **5b–d**.

myeloid leukemia, contains high levels of intracellular glutathione (GSH) and are resistant to oxidative stress.³⁶ Cell viability greater than 90% was observed, even after treatment of these cells with H₂O₂ 100 μM.³⁷ In contrast, HL-60 cells, a pro-myelocytic leukemia, presents a low level of antioxidant defense and is sensible to oxidative stress.³⁶ In Table 3 are presented the results obtained, showing that these new pterocarpanquinones are as active as compounds **1** and **4f**, used as reference in this study. Mitomycin C was used as reference too. Since **5a** was the more potent in K562 and

Table 3

Antineoplastic effect of pterocarpanquinones **5a,b,d,e** in K562 and HL-60 cell lines (IC₅₀ in μM)^a

Quinone	K562	HL-60
5a	1.67	2.00
5b	3.48	0.40
5c	6.77	4.87
5d	5.70	4.87
1	2.95	2.10
3	16.04	ND
4f	2.18	ND
Mitomycin C	0.47	ND

ND = not done.

^a Results are reported as IC₅₀ values (concentration required to inhibit cell growth by 50%) in micromolar. Data represent the means of three independent experiments, with each concentration tested in triplicate and SD values were lower than 15%. Assays were performed as described in Section 5.

(excepted for **5b**) HL-60 cell lines (Table 3), we decided to investigate its pharmacological properties in more details in other selected leukemic cells.

As multidrug resistant (MDR) is one of the most important problems in cancer chemotherapy, the antineoplastic effect of **5a** was tested on Lucena-1 (Table 4). This cell line, derived from K562 and originally selected for resistance to the vinca alkaloid vincristine, is a MDR cell and overexpresses ATP-binding cassette sub-family B member 1 protein (ABCB1), a transmembrane protein of 170 KDa which belongs to the ABC superfamily of transporters and is codified by MDR-1 gene.³⁸ This protein is responsible for removing xenobiotics from the cell, being related to the process of MDR.³⁸

Table 4 shows the IC₅₀ obtained for **5a** on Lucena-1, Raji, Jurkat and Daudi human leukemic cell lines. Lucena-1 is also resistant to oxidative stress³⁹ and was slightly more resistant than K562. Jurkat, Raji and Daudi are human lymphocytic cell lines. Jurkat, a T cell leukemia with high levels of Bcl-2 expression, was more resistant than the other leukemic cell lines. Compound **5a** was very bio-selective and did not show significant cytotoxicity for PBMC activated by PHA (IC₅₀ > 20 μM). Mitomycin C (Mit. C) was used as reference.

Not only leukemic cells were sensitive to quinone **5a**. Table 5 shows that this quinone was very active against a small cell lung cancer cell line (GLC-4), and to a lesser extent to non-small cell lung cancer cell lines (A549 and H460). It is worth to mention that GLC-4 and A549 cell lines present high expression of MRP-1 protein (MDR phenotype).^{40,41}

Currently it is known that inflammation and cancer are often associated. The neoplastic microenvironment is rich in cytokines, chemokines and inflammatory enzymes that can become it more favorable to the tumor development.⁴² One of the most important inflammatory molecule is tumor necrosis factor (TNF-α), a cytokine that drives inflammatory reactions. Despite its name, TNF-α mediates inflammation-induced tumor growth and can act as an endogenous tumor promoter.^{43,44} To determine whether **5a** could modulate the production of TNF-α, we incubated human PBMC with lipopolysaccharide (LPS) and this quinone in different concentrations for 2 h. The levels of TNF-α in PBMC supernatants showed that **5a** significantly reduced TNF-α liberation at 25 μM concentration (Fig. 2). Moreover, the highest concentration tested (100 μM)

Table 4

Antineoplastic effect of pterocarpanquinone **5a** in leukemia cancer cell lines and PBMC (IC₅₀ in μM)^a

Quinone	Lucena-1	Raji	Jurkat	Daudi	PBMC
5a	2.75	3.32	6.77	3.10	>20
Mit. C	2.75	ND	ND	0.45	4.03

ND = not done.

^a Results are reported as IC₅₀ values (concentration required to inhibit cell growth by 50%) in micromolar. Data represent the means of three independent experiments, with each concentration tested in triplicate and SD values were lower than 15%. Assays were performed as described in Section 5.

Table 5

Antineoplastic effect of pterocarpanquinones **5a** on lung cancer cell lines, A549, H460, and GLC-4 cell lines (IC₅₀, μM)^a

Quinone	A549	H460	GLC-4
5a	11.21	12.86	5.17

ND = not done.

^a Results are reported as IC₅₀ values (concentration required to inhibit cell growth by 50%) in micromolar. Data represent the means of three independent experiments, with each concentration tested in triplicate and SD values were lower than 15%. Assays were performed as described in Section 5.

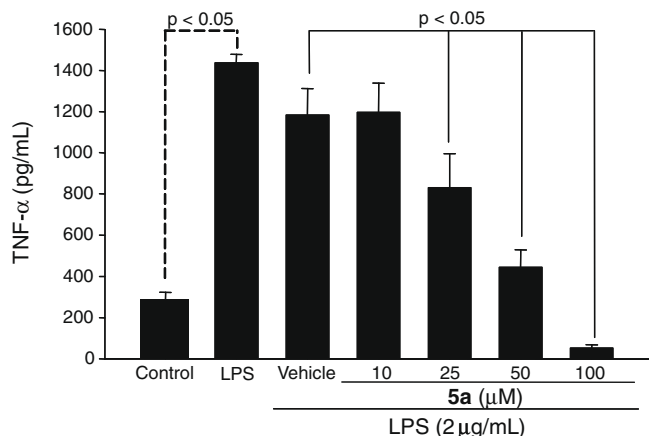


Figure 2. Effect of **5a** on LPS-stimulated TNF- α secretion by PBMC incubated for 2 h. Data are representative of three experiments and are mean \pm SEM.

was able to inhibit almost 100% of TNF- α liberation when compared to LPS-stimulated PBMC treated with vehicle.

Its worth to note that under this condition **5a** was still less toxic to PBMC activated by PHA. In PBMC stimulated by LPS, more than 70% of cell viability was observed even in the presence of 100 μ M of **5a** (data not shown).

3. Discussion

Similar to what has been observed for other *para*-naphthoquinones,^{1,2,5,6,10} it seems reasonable to accept that pterocarpanquinones **4a–d** and **5a–d** can be transformed through one-electron reduction into the corresponding semiquinone radicals. These radicals can initiate a cascade of reactions leading to oxidative stress of the cell. The antineoplastic effect of these compounds on HL-60, Raji, and Daudi cell lines could be associated with this mechanism of action. However, Jurkat, K562 and Lucena-1 cell lines are resistant to oxidative stress and, at least in these cases, an alternative mechanism of action should be operating. Pterocarpanquinones **4** and **5** share with the pyranonaphthoquinone Kalafungin (**3**) an important structural feature, the presence of a C–O bond at D-ring (Fig. 3). It was proposed that Kalafungin acts as antibiotic through a mechanism¹³ similar to that suggested for Mitomycin C and analogs,^{5–7,17} and antitumor drugs model quinomethanes^{14,15} (bioreductive activation), being activated after reduction by NQO1 (two electron reduction). The resulting hydroquinone undergo a structural rearrangement, furnishing a Michael acceptor which react with essential nucleophiles in the cell, as proposed by Moore and Czeniak.^{13,16} The first experimental evidence for this metabolic pathway was supported by Brimble and Nairn through the reduction of the *O*-methyl ether of **3** by sodium dithionite in the presence of sulfur nucleophiles, leading to the incorporation of these nucleophiles.¹³

A similar result was obtained in our laboratory for **4a**, **5a** and **5b** (Scheme 5). The reduction of these compounds by sodium dithio-

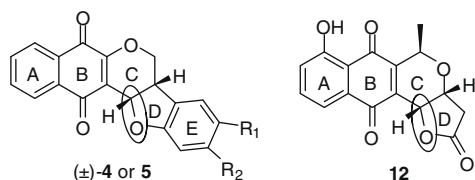
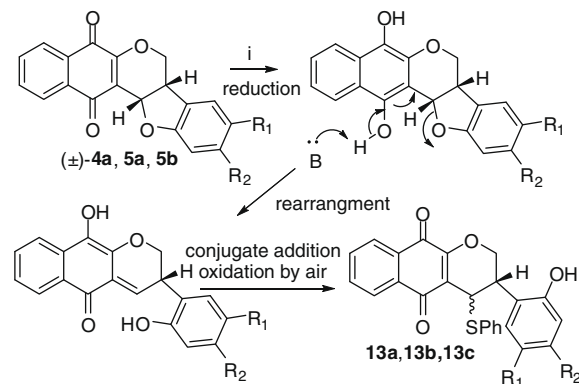


Figure 3. Pterocarpanquinones **4** and **5** and Kalafungin (**12**).



Scheme 5. Reductive activation of pterocarpanquinones **4a**, **5a**, and **5b**. Reagents and conditions: (i) sodium dithionite, Tris/HCl (pH 7.4), PhSH, 22% for **13a**, quantitative for **13b** and 67% for **13c**. Compound **13a**: R₁,R₂ = –OCH₂O–; **13b**: R₁ = R₂ = H; **13c**, R₁ = NO₂, R₂ = H.

nite at buffered pH 7.4 in the presence of thiophenol led to the adducts of thiophenol **13a**, **13b**, and **13c**, respectively, strongly suggesting that these compounds could be activated by bioreduction, acting as alkylating agents (Scheme 5). This mechanism of action could explain the potency of the antineoplastic effect of these compounds on cell lines resistant to oxidative stress.

It is interesting to mention that K562 and probably Lucena-1 expresses a high level of NQO2 (an isoform of NQO1), the enzyme responsible for two electron reduction of quinones to hydroquinones.^{45–47}

4. Conclusions

Although pterocarpanquinones **4a–d** and **5a–d** have similar pharmacological profile, the conditions used to prepare **5a–d** are less expensive, using catalytic amount of Pd(OAc)₂ and avoiding the use of organomercurial reagents.

Pterocarpanquinone **5a** showed potent antineoplastic effect against leukemic cell lines, including those with the MDR phenotype, suggesting that this compound is not a substrate to ABCB1, the transporter that confers resistance to Lucena-1 cells. Although to a lesser degree, **5a** was also effective against non-small lung cancer cell lines (A549 and H460) known to express different levels of the MDR transporters ABCB1 and ABCC1.^{48,49} The small cell lung cancer cell line GLC-4 was, however, more sensitive to **5a**.

One of the most important pro-inflammatory cytokines, TNF- α has a critical role in carcinogenesis too.⁵⁰ Interestingly, several studies have demonstrated endogenous TNF- α as a tumor promoter and metastatic factor.^{51–53} Significant levels of TNF- α was found in tumor microenvironment of various human cancers, including those of breast, ovarian, prostate, lymphoma, melanoma and leukemia.⁵⁴ We demonstrated that **5a** inhibited TNF- α liberation in human PBMC cells. This effect revealed **5a** as potentially even more effective against cancer, since it can act by two mechanisms, directly by killing tumor cells and indirectly, resolving the inflammatory environment that supports tumor development.

The key feature to the understanding the cytotoxic effect of these compounds on cell lines resistant to oxidative stress seems to be the bioreductive activation mechanism, transforming these compounds into potent Michael acceptors, especially in cells that overexpress NQO1. It is possible that this mechanism of action overcomes the antioxidant defenses present in these cells. The low toxicity in vitro (PBMC activated by PHA) and the efficient synthesis of **5a**, show that this compound is a good candidate to further evaluations in vivo.

5. Experimental

5.1. Pharmacology

5.1.1. Cell lines

All cell lines used in this work were maintained in RPMI-1640 medium (Sigma–Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA), supplemented with 50 μ M β -mercaptoethanol, 25 mM Hepes, pH adjusted to 7.4 with NaOH, 60 mg/L penicillin, 100 mg/L streptomycin and 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco, Grand Island, NY, USA), inactivated at 56 °C for 1 h. Daudi cells were supplemented with 20% FCS. Vincristine sulfate (60 nM) (Sigma–Aldrich) was added to Lucena-1 in order to maintain the MDR phenotype.

5.1.2. Isolation of PBMC

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by fractionating heparinized blood from healthy volunteers. Blood was heparinized and fractionated on Ficoll–hpaque (Hystopaque) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) by density gradient centrifugation. The PBMC fraction was washed twice and resuspended in RPMI-1640, supplemented as described above, and the cell density was adjusted to 10^6 cells/mL. Cells were incubated with 5 μ g/mL of the mitogen phytohemagglutinin (PHA) (Sigma–Aldrich), in the presence or absence of the compounds being tested.

5.1.3. Cell treatment

Leukemic cell lines K562, Lucena-1, Daudi, Raji and Jurkat were exposed to **5a** in culture for 24 h, 48 h, or 72 h. Lung cancer cells A549, H460 and GLC-4 were let to adhere for 24 h before being exposed to **5a**. Briefly, 2×10^4 cells/mL in 200 μ L were seeded in 96-well microtiter plates in drug-free medium or in medium containing different concentrations of **5a** and maintained for 72 h at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂, and cell viability was then measured.

5.1.4. Cell viability

Cell viability was determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) colorimetric assay. MTT can be reduced by dehydrogenases present in active mitochondria of living cells. After incubation in the presence or absence of the compound being tested, 20 μ L of MTT (5 mg/mL) (Sigma–Aldrich) was added to each well. Plates were then kept at 37 °C in 5% CO₂ for 3 h. After centrifugation, 200 μ L of DMSO (Sigma–Aldrich) was added to all wells in order to dissolve the dark blue crystals formed by the reduction of MTT. Absorbance was measured with a Tecan Sunrise ELISA reader at 490 nm. Absorbance was directly proportional to the amount of formazan (reduction product) present, indicating the percentage of living cells. The IC₅₀ values were obtained by nonlinear regression on the GraphPad Prism v4.0 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5.1.5. TNF- α release assay

PBMC were cultured in 24-well plates at 10^6 cells/mL. Stimulation of PBMC was induced by 2 μ g/mL of Escherichia Coli 055:B5 LPS (Sigma, Chemical Co., St Louis, MO, USA) for 2 h (37 °C, 5% CO₂). Additionally, groups of cells were incubated at same time with 0.5% DMSO in RPMI 1640 (vehicle) with or without **5a** in different concentrations (10, 25, 50 and 100 μ M). After stimulation, supernatants were collected and analyzed by ELISA. TNF- α Assay-TNF- α levels in PBMC supernatants were determined using sandwich-ELISA kits (R&D Systems, USA), with sensitivities of 4 pg/mL.

5.2. Chemistry

Melting points were determined with a Thomas–Hoover apparatus and are uncorrected. Column chromatography was performed on silica gel 230–400 mesh (Aldrich). ¹H NMR spectrum

was recorded on a Bruker Avance 400 (400.013 MHz) spectrometer at ambient temperature. All *J* values are given in Hz. Chemical shifts are expressed in parts per million downfield shift from tetramethylsilane as an internal standard, and reported as position (δ H) (relative integral, multiplicity (*s* = singlet, *d* = doublet, *dd* = double doublet, *dt* = double triplet, *m* = multiplet), coupling constant (*J* Hz) and assignment. ¹³C NMR spectrum was recorded on a Bruker Avance 400 (100.003 MHz) spectrometer at ambient temperature with complete proton decoupling. Data are expressed in parts per million downfield shift from tetramethylsilane as an internal standard and reported as position (δ C).

5.2.1. Synthesis of pterocarpanquinone **5a**

To a stirred solution of **6** (106 mg, 0.5 mmol) in acetone (10 ml), 2-iodophenol **11** (83 mg, 0.75 mmol), silver-carbonate (413 mg, 1.5 mmol), PPh₃ (26.2 mg, 0.1 mmol, 20 mol %) and Pd(OAc)₂ (11.2 mg, 0.05 mmol, 10 mol %) were added. The reaction mixture was refluxed for 16 h and filtered in celite with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over anhyd Na₂SO₄ and concentrated. The crude product was washed in *n*-hexane and purified by flash chromatography on silica. After column chromatography using *n*-hexane/ethyl acetate (95:5) as eluant, this compound was obtained as a yellow solid in 41% yield, mp 145 °C. A 40% yield was observed in absence of PPh₃.

¹H NMR (CDCl₃) δ 8.21–8.10 (m, 2H); 7.78–7.68 (m, 2H); 7.30–7.18 (m, 2H); 6.98–6.91 (m, 2H); 5.66 (d, *J* = 6.69 Hz; 1H); 4.59 (dd, *J* = 11.08, 5.03 Hz; 1H); 3.81 (t, *J* = 11.08 Hz; 1H); 3.64–3.53 (m, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 183.25 (C); 179.28 (C); 158.73 (C); 157.01 (C); 134.54 (CH); 133.38 (CH); 130.58 (C); 130.57 (C); 129.58 (CH); 126.49 (CH); 126.42 (CH); 125.11 (C); 124.51 (CH); 121.23 (CH); 118.16 (C); 110.80 (CH); 72.32 (CH); 67.09 (CH₂); 38.37 (CH); LRMS (EI) *m/z* 304.

5.2.2. Electrophilic substitution reactions on **5a**. Synthesis of **5b**, **5c** and **5d**

5.2.2.1. Pterocarpanquinone **5b.** To a solution of **5a** (100 mg, 0.33 mmol) in 3.5 mL of CHCl₃ was added fuming HNO₃ (0.5 ml) at –30 °C. The reaction mixture was stirred for 2 h at same temperature. After this time, the TLC showed the formation of a product more polar than start material. The reaction mixture was dropped into cold water and then extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over anhyd Na₂SO₄ and concentrated in vacuum. The crude product was purified by flash chromatography on silica to furnish a yellow solid (57.6 mg, 0.165 mmol) in 50% yield, mp 250 °C.

¹H NMR (CDCl₃) δ 8.24–8.16 (m, 4H); 7.86–7.77 (m, 2H); 7.02 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz); 5.90 (d, 1H, *J* = 6.3 Hz); 4.67 (d, 1H, *J* = 4.1 and 10.9 Hz); 3.90 (t, 1H, 10.8 Hz); 3.78–3.75 (m, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 179.0 (C); 164.2 (C); 157.4 (C); 142.6 (C); 134.9 (CH); 133.9 (CH); 131.8 (C); 130.7 (C); 127.2 (CH); 126.8 (CH); 126.8 (CH); 121.2 (CH); 117.3 (C); 110.9 (CH); 74.8 (CH); 66.6 (CH₂); 38.1 (CH). LRMS (EI) *m/z* 349.

5.2.2.2. Pterocarpanquinone **5c.** To a solution of **5a** (50 mg, 0.165 mmol) in 5 mL of CH₃CN was added NCS (100 mg, 0.75 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 24 h. After the reaction was complete, the solvent was evaporated under reduced pressure and ethyl acetate was added. The organic layer was washed with brine, dried over anhyd Na₂SO₄ and concentrated. The crude product was purified by flash chromatography on silica to furnish a yellow solid (30.8 mg, 0.091 mmol) in 55% yield, mp 228 °C.

¹H NMR (CDCl₃) δ 8.18 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz); 8.13 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz); 7.81–7.71 (m, 2H); 7.25 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz); 7.17 (dd, 1H, *J* = 8.5, 2.1 Hz); 6.85 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz); 5.69 (d, 1H, *J* = 6.7 Hz); 4.57 (dd, 1H, *J* = 11.2, 5.1 Hz); 3.81 (t, 1H, *J* = 11.1 Hz); 3.61–3.55 (m, 1H);

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ 183.31 (C); 179.3 (C); 157.63 (C); 157.20 (C); 134.8 (CH); 133.66 (CH); 131.98 (C); 130.76 (C); 129.71 (CH); 127.14 (C); 126.72 (CH); 126.17 (C); 124.87 (CH); 117.96 (C); 111.96 (CH); 73.16 (CH); 66.92 (CH_2); 33.67 (CH); LRMS (EI) m/z 338.

5.2.2.3. Pterocarpanquinone 5d. To a solution of **5a** (50 mg, 0.165 mmol) in 5 mL of CH_3CN was added NBS (106.5 mg, 0.6 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 24 h. After the reaction was complete, the solvent was evaporated under reduced pressure and ethyl acetate was added. The organic layer was washed with brine, dried over anhyd Na_2SO_4 and concentrated. The crude product was purified by flash chromatography on silica to furnish a yellow solid (36.3 mg, 0.095 mmol) in 57% yield, mp 228 °C.

^1H NMR (CDCl_3) δ 8.2 (m, 2H); 7.8 (m, 2H); 7.4 (d, 1H, $J = 1.97$ Hz); 7.35 (dd, 1H, $J = 8.5$ and 2.14 Hz); 6.85 (d, 1H, $J = 8.45$ Hz) 5.7 (d, 1H, $J = 5.9$ Hz); 4.6 (dd, 1H, $J = 11.3$, 6.0 Hz); 3.8 (t, 1H, $J = 11.0$ Hz); 3.6 (m, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ 183.16 (C); 179.15 (C); 158.0 (C); 157.06 (C); 134.67 (CH); 133.54 (CH); 132.48 (CH); 131.82 (C); 130.6 (C); 127.6 (CH); 126.58 (CH); 117.78 (C); 113.04 (C); 112.43 (C); 112.2 (CH); 73.0 (CH); 66.8 (CH_2); 38.44 (CH); LRMS (EI) m/z 382 (100%), 383, 384, 385, 386.

5.2.2.4. General procedure for reductive thioalkylation. A solution of pterocarpanquinone (0.06 mmol) in 3:1 THF–MeOH (8.0 mL) and Tris–HCl buffer (pH 7.4, 3.0 mL) was degassed for 15 min with dry nitrogen. To this solution was added sodium dithionite (254.04 mg 1.46 mmol) to effect hydroquinone formation, followed by a solution of the thiophenol (24.6 μL , 0.24 mmol) in degassed 3:1 THF–MeOH (2.0 mL). The reaction was stirred at room temperature under nitrogen atmosphere and monitored periodically by TLC. The reaction mixture was extracted by ethyl acetate and the organic layer was washed with brine and dried over sodium sulfate. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography using 9:1 hexane/ethyl acetate as eluant.

5.2.2.5. Reductive thioalkylation of 4a. Treatment of **4a** (21.2 mg; 0.06 mmol) with sodium dithionite and thiophenol following the general procedure furnished **13a** 6.04 mg (0.0132 mmol; 22% yield) of a yellow oil.

^1H NMR (CDCl_3) δ 8.15 (m, 2H); 7.70 (m, 4H); 7.30 (m, 3H); 6.78 (s, 1H); 6.70 (s, 1H); 6.25 (s, 1H); 5.80 (s, 1H); 5.79 (s, 1H); 4.98 (dd, $J = 11.73$, 3.47 Hz; 1H); 4.85 (d, $J = 4.85$ Hz; 1H); 4.64 (s, 1H); 3.62 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ C 14.52 (CH); 30.12 (C); 36.55 (CH); 42.41 (CH); 67.73 (CH_2), 98.62 (CH), 101.53 (CH_2), 106.96 (C), 116.60 (C), 118.05 (C), 119.64 (C); 126.92 (CH), 126.97 (CH), 128.60 (CH); 129.47 (CH); 131.36 (CH), 132.63 (C), 133.68 (CH), 133.90 (CH); 134.74 (CH), 142.08 (C), 147.43 (C), 148.10 (CH); 155.36 (C), 179.55 (C), 183.05 (C).

5.2.2.6. Reductive thioalkylation of 5a. Treatment of **5b** (18.2 mg; 0.06 mmol) with sodium dithionite and thiophenol following the general procedure furnished **13b** 26.5 mg (0.06 mmol; quantitative yield) of a yellow oil.

^1H NMR (CDCl_3) δ 8.15 (m, 2H); 7.70 (m, 4H); 7.30 (m, 3H); 7.0 (m, 2H); 6.70 (m, H); 5.1 (s, 1H); 4.9 (m, 1H); 4.8 (s, 1H); 3.7 (s, 1H).

5.2.2.7. Reductive thioalkylation of 5b. Treatment of **5b** (21 mg; 0.06 mmol) with sodium dithionite and thiophenol following the general procedure furnished **13c** 17.8 mg (0.04 mmol; 67%) as yellow oil.

^1H NMR (CDCl_3) δ 8.15 (m, 2H); 7.75 (m, 4H); 7.35 (m, 3H); 6.45 (m, 3H); 4.98 (m, 2H); 4.7 (s, 1H); 3.65 (s, 1H).

5.2.3. Synthesis of ortho-halophenols 9 and 10

5.2.3.1. ortho-Iodophenol 9. To a stirred 0.1 M solution of organomercurial **8d** in THF at -78 °C was slowly added a 1 M solution of I_2 in THF until the reaction mixture was purple. Immediately was added a solution of NaHSO_3 (20% w/v). The organic layer was extracted with ethyl acetate, dried over anhyd Na_2SO_4 . The solvent was removed under reduced pressure to furnish a dark oil. The product was used in crude form.

^1H NMR (CDCl_3) δ 7.48–7.25 (m, 5H), 7.10 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 5.00 (s, 2H), 3.82 (s, 3H).

5.2.3.2. ortho-Bromophenol 10. To a stirred solution of phenol **7** (920 mg, 4 mmol) in 15 mL of CH_3CN at 0 °C was added NBS (784 mg, 4.4 mmol). After the reaction was complete (10 min) the reaction mixture was extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over anhyd Na_2SO_4 . The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 7:3) on silica to furnish a dark solid in 75% yield.

^1H NMR (CDCl_3) δ 7.50–7.20 (m, 5H), 6.99 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 5.02 (s, 2H), 3.82 (s, 3H).

Acknowledgments

Our research was supported by Grants from FINEP, Programa de Oncobiologia-UFRJ, PRONEX, FAPERJ, CNPq and CAPES. C.D.N. and P.R.R.C. are supported by CNPq fellowship and E.J.S.S. by FAF/FECD fellowship. We are grateful to Dr. Ottilia R. Affonso-Mitidieri for useful suggestions and Central Analítica NPPN-UFRJ for the analytical data.

References and notes

- O'Brien, P. J. *Chem. Biol. Interact.* **1991**, *80*, 1.
- Salas, C.; Tapia, R. A.; Ciudad, K.; Armstrong, V.; Orellana, M.; Kemmerling, U.; Ferreira, J.; Maya, J. D.; Morello, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 668.
- Linardi, M. C. F.; de Oliveira, M. M.; Sampaio, M. R. P. *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 1159.
- Portela, M. P. M.; Stoppani, A. O. M. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *51*, 275.
- Williams, D. A. In *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*; Lemke, T. L., Ed., third ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, 2002; p 924.
- Galm, U.; Hager, M. H.; Lanen, S. G. V.; Ju, J.; Thorson, J. S.; Shen, B. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 739.
- Wolkenberg, S. E.; Boger, D. L. *Chem. Rev.* **2005**, *102*, 2477.
- Gewirtz, D. A. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 727.
- Zhang, G.; Fang, L.; Zhu, L.; Zhong, Y.; Wang, P. G.; Sun, D. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1792.
- Chen, Y.; Hu, L. *Med. Res. Rev.* **2009**, *29*, 29.
- Pink, J. J.; Planchon, S. M.; Tagliarino, C.; Varnes, M. E.; Siegel, D.; Boothman, D. A. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 5416.
- Park, H. J.; Ahn, K. J.; Ahn, S. D.; Choi, E.; Lee, S. W.; Williams, B.; Kim, E. J.; Griffin, R.; Bey, E. A.; Bornmann, W. G.; Gao, J.; Park, H. J.; Boothman, D. A.; Song, C. W. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2005**, *61*, 212.
- Brimble, M. A.; Nairn, M. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2000**, 317.
- Lin, A. J.; Cosby, L. A.; Shansky, C. W.; Sartorelli, A. C. *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 1247.
- Lin, A. J.; Pardini, R. S.; Cosby, L. A.; Lillis, B. J.; Shansky, C. W.; Sartorelli, A. C. *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 1268.
- Moore, H. W.; Czerniak, R. *Med. Res. Rev.* **1981**, *1*, 249.
- Denny, W. A. *Lancet Oncol.* **2000**, *1*, 25.
- de Abreu, F. C.; Lopes, A. C. O.; Goulart, M. O. F. *J. Electroanal. Chem.* **2004**, *562*, 53.
- da Silva, A. J. M.; Netto, C. D.; Costa, P. R. R. *Brazil Chem. Soc.* **2004**, *15*, 979.
- Netto, C. D.; Santos, E. S. J.; Castro, C. P.; da Silva, A. J. M.; Rumjanek, V. M.; Costa, P. R. R. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 920.
- Johnson, L. E.; Dietz, A. *Appl. Microbiol.* **1968**, *16*, 1815.
- Donner, C. D. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8888.
- 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. *Invest. New Drugs* **2009**, doi:10.1007/s10637-009-9231-y.
- da Silva, A. J. M.; Buarque, C. D.; Brito, F. V.; Aurelian, L.; Macedo, L. F.; Malkas, L. H.; Hickey, R. J.; Lopes, D. V. S.; Nöel, F.; Murakami, Y. L. B.; Silva, N. M. V.; Melo, P. A.; Caruso, R. R. B.; Castro, N. G.; Costa, P. R. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2731.
- Horino, H.; Inoue, N. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1976**, 500.
- Emrich, D. E.; Larock, R. C. *J. Organomet. Chem.* **2004**, *689*, 3756.
- Larock, R. C. U.S. Patent. 1998, 5,721,371.

28. Kiss, L.; Kurtan, T.; Antus, S.; Brunner, H. *Arkivoc* **2003**, 69.
29. Ulgheri, F.; Marchetti, M.; Piccolo, O. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6056.
30. Smith, M. B. In *Organic Synthesis*, 2nd ed.; McGraw-Hill, 2002; pp 1120–1121.
31. Li, C. C.; Xie, Z. X.; Zhang, Y. D.; Chen, J. H.; Yang, Z. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8500.
32. Yadav, J. S.; Reddy, B. V. S.; Reddy, P. S. R.; Basak, A. K.; Narsaiah, A. V. *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 77.
33. Carreño, M. C.; Ruano, J. L. G.; Sanz, G.; Toledo, M. A.; Urbano, A. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5328.
34. Eaton, P. E.; Martin, R. M. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2728.
35. da Silva, A. J. M. M.Sc. Dissertation, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil, 1993.
36. Chau, T. P.; Shiah, S. G.; Don, M. J.; Kuo, M. L. *Free Radical Biol. Med.* **1998**, *24*, 660.
37. Nagai, F.; Kato, E.; Tamura, H. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 492.
38. Rumjanek, V. M.; Trindade, G. S.; Wagner-Souza, K.; de-Oliveira, M. C.; Marques-Santos, L. F.; Maia, R. C.; Capella, M. A. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2001**, *73*, 57.
39. Trindade, G. S.; Capella, M. A.; Capella, L. S.; Affonso-Mitidieri, O. R.; Rumjanek, V. M. *Photochem. Photobiol.* **1999**, *69*, 694.
40. Mülder, H. S.; Lankelma, J.; Dekker, H.; Broxterman, H. J.; Pinedo, H. M. *Int. J. Cancer* **1994**, *15*, 275.
41. Lehmann, T.; Köhler, C.; Weidauer, E.; Taeye, C. *Toxicology* **2001**, *5*, 59.
42. Balkwill, F.; Mantovani, A. *The Lancet* **2001**, *357*, 539.
43. Balkwill, F. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2002**, *13*, 135.
44. Luo, J. L.; Maeda, S.; Hsu, L. C.; Yagita, H.; Karin, M. *Cancer Cell* **2004**, *6*, 297.
45. Yan, C.; Kepa, J. K.; Siegel, D.; Stratford, I. J.; Ross, D. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 1657.
46. Buryanovskyy, L.; Fu, Y.; Boyd, M.; Ma, Y.; Hsieh, T.; Wu, J. M.; Zhang, Z. *Biochem.* **2004**, *43*, 11417.
47. Bantscheff, M.; Eberhard, D.; Abraham, Y.; Bastuck, S.; Boesche, M.; Hobson, S.; Mathieson, T.; Perrin, J.; Rida, M.; Rau, C.; Reader, V.; Sweetman, G.; Bauer, A.; Bouwmester, T.; Hopf, C.; Kruse, U.; Neubauer, G.; Ramsden, N.; Rick, J.; Kuster, B.; Drewes, G. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 994.
48. Torkey, A. R.; Stehfest, E.; Viehweger, K.; Taeye, C.; Foth, H. *Toxicology* **2005**, *207*, 437.
49. Zaman, G. J.; Versantvoort, C. H.; Smit, J. J.; Eijndems, E. W.; de Haas, M.; Smith, A. J.; Broxterman, H. J.; Mulder, N. H.; de Vries, E. G.; Baas, F. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 1747.
50. Mocellin, S.; Rossi, C. R.; Pilati, P.; Nitti, D. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2005**, *16*, 35.
51. Szlosarek, P. W.; Charles, K. A.; Balkwill, F. R. *Eur. J. Cancer* **2006**, *42*, 745.
52. Wu, W.; Yamaura, T.; Murakami, K.; Ogasawara, M.; Hayashi, K.; Murata, J.; Saiki, I. *Oncol. Res.* **1999**, *11*, 461.
53. Shin, K. Y.; Moon, H. S.; Park, H. Y.; Lee, T. Y.; Woo, Y. N.; Kim, H. J.; Lee, S. J.; Kong, G. *Cancer Lett.* **2000**, *159*, 127.
54. Szlosarek, P. W.; Balkwill, F. R. *Lancet Oncol.* **2003**, *4*, 565.

LQB-118, a pterocarpanquinone structurally related to lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone]: a novel class of agent with high apoptotic effect in chronic myeloid leukemia cells

Raquel C. Maia · Flavia C. Vasconcelos · Thiago de Sá Bacelar ·
Eduardo J. Salustiano · Luis Felipe R. da Silva · Débora L. Pereira ·
Arthur Moellman-Coelho · Chaquip D. Netto · Alcides J. da Silva ·
Vivian M. Rumjanek · Paulo R. R. Costa

Received: 21 January 2010 / Accepted: 7 May 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Summary Despite the relevant therapeutic progresses obtained with imatinib, clinical resistance to this drug has emerged and reemerged after cytogenetic remission in a group of patients with chronic myeloid leukemia (CML).

R. C. Maia · F. C. Vasconcelos · L. F. R. da Silva · D. L. Pereira
Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular,
Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular,
Instituto Nacional de Câncer (INCA),
Rio de Janeiro, RJ, Brazil

R. C. Maia · F. C. Vasconcelos · L. F. R. da Silva · D. L. Pereira ·
A. Moellman-Coelho
Serviço de Hematologia, Hospital do Câncer I, INCA,
Rio de Janeiro, RJ, Brazil

T. de Sá Bacelar · E. J. Salustiano · V. M. Rumjanek
Laboratório de Imunologia Tumoral, Instituto de Bioquímica
Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ),
Rio de Janeiro, RJ, Brazil

C. D. Netto
Laboratório de Química Orgânica, Instituto de Química,
UFRJ, Campus,
Macaé, Brazil

A. J. da Silva · P. R. R. Costa
Laboratório de Química Bioorgânica (LQB), Núcleo de Pesquisas
de Produtos Naturais (NPPN), Centro de Ciências da Saúde,
UFRJ,
Rio de Janeiro, RJ, Brazil

R. C. Maia (✉)
Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular,
Hospital do Câncer I, Instituto Nacional de Câncer,
Praça da Cruz Vermelha 23, 6º andar, Centro,
Rio de Janeiro, RJ, Brazil 20230-130
e-mail: rcmaia@inca.gov.br

Therefore, novel treatment strategies are needed. In this study, we evaluated the anti-CML activity and mechanisms of action of LQB-118, a pterocarpanquinone structurally related to lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone]. LQB-118 treatment resulted in an important reduction of cell viability in cell lines derived from CML, both the vincristine-sensitive K562 cell line, and the resistant K562-Lucena (a cell line overexpressing P-glycoprotein). In agreement with these results, the induction of caspase-3 activation by this compound indicated that a significant rate of apoptosis was taking place. In these cell lines, apoptosis induced by LQB-118 was accompanied by a reduction of P-glycoprotein, survivin, and XIAP expression. Moreover, this effect was not restricted to cell lines as LQB-118 produced significant apoptosis rate in cells from CML patients exhibiting multifactorial drug resistance phenotype such as P-glycoprotein, MRP1 and p53 overexpression. The data suggest that LQB-118 has a potent anti-CML activity that can overcome multifactorial drug resistance mechanisms, making this compound a promising new anti-CML agent.

Keywords Chronic myeloid leukemia · Pterocarpanquinone LQB-118 · Multidrug resistance · IAPs · ABC transporter proteins

Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is a hematopoietic stem cell disease which is hallmarked by the presence of an

abnormal Philadelphia (Ph) chromosome which results from a translocation between the long arms of chromosomes 9 and 22 [1]. This translocation fuses the BCR gene on chromosome 22 to the ABL gene on chromosome 9. The resulting hybrid gene, *Bcr-Abl*, encodes for a fusion protein with tyrosine kinase activity, which mediates signal transduction pathways, leading to uncontrolled cell growth [2].

Imatinib, a first-class of tyrosine kinase inhibitor, is the major advancement in the treatment of CML and has been evaluated for use in different CML phases (chronic, accelerated, and blastic) [3]. Imatinib prevents tyrosine kinase activity, resulting in the control of the cell cycle and leading to apoptosis [4]. Despite the molecular and cytogenetic responses to this drug, the long-term success rates of imatinib are still unclear. Furthermore, primary and secondary resistances to imatinib have been observed and are considered a major problem in the treatment of patients with CML [5–7].

Mutations in the BCR-ABL kinase domain are the most common mechanism responsible for imatinib-resistance. However, it is well known that the presence of a BCR/ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance [8]. CML cells may acquire resistance to chemotherapy by a wide spectrum of other different mechanisms including BCR-ABL gene amplification, low OCT-1 activity [9], loss of functional p53 [10], and multidrug resistance (MDR) phenotype associated with the enhanced expression of *MDR1/Pgp* [11]. In addition, several lines of evidence have shown that functional interactions between apoptosis-promoting factors and anti-apoptotic factors play important roles in the control of cell growth and cell death. The inhibitor apoptosis proteins (IAPs) survivin and XIAP have been shown to inhibit apoptosis by blocking the activation of specific caspases. Various authors have documented the overexpression of IAPs in leukemias. However, the impact of this overexpression in the prognosis of CML is still unknown [12].

Recently, nilotinib and dasatinib, second-class of tyrosine kinase inhibitors active against most BCR-ABL kinase domain mutations, have proved to induce good responses in imatinib-resistant patients [13]. However, nilotinib, as well as imatinib, is a substrate of the MDR gene product, P-glycoprotein (Pgp) [14, 15]. Therefore, potent new agents that might overcome heterogeneous classical or non-classical MDR phenotype might lead towards more effective pharmacotherapies for CML.

Pterocarpanquinones, resulting from molecular hybridization of pterocarpan and the naphthoquinone with anti-tumoral activity lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone], were shown to be effective against MDR leukemia cell lines [16]. Recently, it was possible to obtain the synthesis of new pterocarpanquinones, and one such molecule, known as LQB-118, was shown to be effective

against leukemic cell lines displaying low toxicity towards peripheral blood mononuclear cells from healthy donors [17]. Although the mode of action of this pterocarpanquinone is still unknown, the *para*-quinone moiety present in the structure of LQB-118 can participate in the redox cycle in the cell, acting as a precursor of reactive oxygen species and leading to oxidative stress. Alternatively, LQB-118 can be activated in situ by reduction, leading to conjugated intermediates, which are powerful alkylating agents [17].

Therefore, the mechanisms involved in the anti-tumoral effect of LQB-118 still remain to be elucidated, and the present work approached this question showing that it inhibited the proliferation and induced apoptosis of both K562 and K562-Lucena, a cell line that displays several MDR characteristics [18, 19]. The compound inhibited the expression of Pgp, and the anti-apoptotic proteins survivin and XIAP. Furthermore, LQB-118 induced the activation of caspases-3 (central executors of the apoptotic process). The relevant results obtained against MDR CML cell lines have prompted the interest for the study of this drug in cells from CML patients where it was observed that LQB-118 induced apoptosis in leukemic cells obtained from patients with different Sokal score, despite having a negative or positive multifactorial MDR phenotype.

Patients, materials and methods

Cell lines

The human erythroblastoid CML K562 cell line and its vincristine-resistant derivative K562-Lucena were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) at 37°C in humidified atmosphere with 5% CO₂. K562-Lucena cell line was maintained in the presence of 60 nM vincristine. K562-Lucena cell line was developed by continuous exposure of K562 cells to increasing levels of vincristine. This cell line displays Pgp/ABCB1, is also resistant to oxidative stress, and has a high content of catalase [18, 19]. Cell viability was estimated by trypan blue exclusion. Cell suspensions with viability below 90% were excluded from this study.

As positive controls for p53 expression, we used the human tumor cell lines Raji and Namalva (Burkitt's lymphoma); for multidrug resistance-associated protein-1 (MRP1) expression, we used GLC-4-ADR (small cell lung carcinoma); for Pgp expression and efflux pump Rhodamine-123 (Rho-123) assay we used the K562-Lucena cells. As negative controls for MRP1 and Pgp we used K562 cell line. Peripheral blood mononuclear cells from healthy donors were used as negative control for p53, XIAP, and survivin expressions.

Patients

Fresh peripheral blood or bone marrow samples taken from 13 CML previously untreated patients were used in this study. The institutional review board of the Ethics Committee approved this study. Informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki. Diagnosis of CML was based on the conventional criteria, a typical blood and bone marrow picture, and the presence of Philadelphia chromosome. Patients were categorized according to Sokal score system [20], which is calculated using peripheral blood blast number, platelet count, spleen size, and age in low-intermediate- or high-risk groups at the time of diagnosis. A low Sokal score (<0.8) was observed in five patients, an intermediate Sokal score (0.8–1.1) in four, and a high Sokal score (>1.1) in four patients. All patients were adults and belonged to the chronic phase at the moment of this study.

Cell samples

Peripheral blood or bone marrow cells from CML patients were isolated through density gradient centrifugation by Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Collected cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and were kept in culture medium consisting of RPMI-1640 medium and 10% FCS.

Drugs

The synthesis of pterocarpanquinone LQB-118 occurred in the Laboratory of Bioorganic Chemistry, NPPN, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil. The compound was prepared in two steps from commercially available lawsone and *ortho*-iodophenol [16]. The key step in the synthesis is the oxy-arylation reaction in the presence of catalytic amounts of palladium acetate.

Imatinib mesylate (imatinib) was provided by Novartis Brazil. Stock solution was prepared at 1 mM and 10 mM in distilled water and was stored at 4°C.

Analysis of cell viability

Growth inhibition of CML K562 and K562-Lucena cell lines was determined by the colorimetric MTT cell viability/proliferation assay (MTT, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) [21]. Briefly, 0.5×10^6 cells/well were incubated for 24 h at 37°C in the presence or absence (control) of LQB118 or imatinib. MTT (20 μ l/well) was added to each well and plates were incubated for another 4 h. The colored formazan product was then dissolved using 150 μ l of dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Plates were read using the microtiter plate

reader (*SpectraMAX® 190 Microplate Reader*; Molecular Devices) at 570 nm. The percentage of growth inhibition seen in cells treated with different concentration of imatinib or LQB-118 (read as optical density, OD) was normalized comparing to the OD obtained with untreated controls. All of the assays were performed in triplicate.

Analysis of apoptosis rate

CML patients cells 0.5×10^6 /well were cultured at 37°C in 96-well culture plates in RPMI supplemented with 10% FCS in the presence of LQB-118 or imatinib for 24 h, 48 h and 72 h. The percentage of apoptotic cells was assessed using the Annexin V assay (Genzyme Diagnostics, Cambridge, MA, USA). Cells were stained with FITC-labeled Annexin V as described previously by our group [22]. Briefly, cells were harvested and washed in PBS. The pellets were incubated with 5 μ g/ml Annexin V, 5 μ g/ml propidium iodide (PI), and binding buffer for 15 min in the dark, on ice. The Annexin V and PI fluorescences were measured by flow cytometry using a CyAn ADP Analyzer (Dako, USA). PI was used to avoid necrotic cell detection (Annexin V–/PI+). Spontaneous apoptosis was analyzed in cells cultured in the absence of the drug. Drug-induced apoptotic index was calculated as percentage of apoptosis in the presence of the drug subtracting apoptosis in the absence of the drug (spontaneous apoptosis).

Determination of MDR activity

MDR activity was analyzed using Rho-123 (Sigma-Aldrich, ST. Louis, USA) efflux assay as previously described by our group [23]. Briefly, 5×10^5 cells were resuspended in RPMI-1640 or medium containing 200 ng/ml cyclosporin A (CSA; Novartis, Switzerland) and incubated with 200 ng/ml Rho-123 for 45 min at 37°C. Cells were washed in cold PBS after incubation. Medium or medium plus CSA were added and cells were incubated for a further 45 min at 37°C in the absence of Rho-123. After the second incubation, cells were analyzed by flow cytometry using Summit v4.3 software (Dako, USA). Cells without Rho-123 or CSA were used to define fluorescence thresholds. Results were expressed as the ratio of mean fluorescence intensity (MFI) of cells with Rho-123 plus CSA subtracting mean fluorescence intensity of cells with Rho-123 only. The positivity cut-off was MFI ratio >1.1 [23].

Sample analysis by flow cytometry

Leukemic cells were gated by forward and side scatter characteristics. Dead cells were eliminated by propidium iodide staining (50 μ g/ml) and the choice of MFI ratio

analysis was based on the French drug resistance network experience [24]. To avoid an arbitrary choice of threshold for positivity, we analyzed K562 (Pgp negative) and K562-Lucena (Pgp positive) and GLC-4 (MRP1 negative) and GLC-4 ADR (MRP1 positive) cell lines. Taking into account that K562 is an MDR negative cell line [25] we defined MDR negative samples as a MFI ratio <1.1 based on experiments performed by other authors [26] and our previous works [22, 23]. The same cut-off (<1.1 =MDR negative; >1.1 =MDR positive) was used for the analysis of both function and expression of MDR molecules.

Determination of Pgp expression

In studies using the cell line K562-Lucena, cells (2×10^4 cells/ml) were cultured for 3 days with 1.5 mM LQB-118. After 24, 48, and 72 h cells were harvested and washed with PBS plus 5% FCS. Cell suspensions were incubated with 5 μ l of FITC-conjugated monoclonal antibody mouse-anti-human Pgp (BD Pharmingen, San Diego CA, USA) for 30 min at room temperature. Cells were washed twice with PBS plus 5% FCS and fluorescence assessed by flow cytometry.

In studies using cells obtained from patients, the cells were incubated with PE-conjugated monoclonal antibody against Pgp (clone UIC2, Coulter, USA) for 30 min, washed and then analyzed by flow cytometry. Results were expressed as the ratio of MFI of cells incubated with UIC2 divided by MFI of untreated cells. The cut-off of positivity was MFI ratio >1.1 [23].

Determination of MRP1 and p53 expression by flow cytometry

To measure the expression of p53 and the intracellular epitope of MRP1, cells were permeabilized using a FACS lysing solution (Becton Dickinson, New Jersey, USA). Cells were washed in 0.5% Tween-20/PBS and incubated with 1% bovine serum albumin (BSA). FITC-conjugated anti-MRP1 (Becton Dickinson, New Jersey, USA) and PE-conjugated anti-p53 (clone DO-7, Becton Dickinson, USA) monoclonal antibodies were added and were incubated for 30 min at room temperature. After washing, cells were analyzed using flow cytometry. Results were expressed as ratio of MFI of MRP1 or p53. Samples were considered p53 positive when MFI ratio ≥ 1.4 [27], and were considered MRP1 positive when MFI ratio ≥ 1.1 [23].

Determination of caspase-3 expression

This experiment was performed incubating K562 and K562-Lucena cells for 24 h in the presence of various concentrations of LQB-118 (0.15, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0 μ M).

Cells were then permeabilized using a FACS lysing solution, washed in 0.5% Tween-20/PBS, and incubated with 1% BSA (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Direct measurements of caspase-3 expression were performed after incubation for 30 min with PE-conjugated monoclonal antibody anti-caspase-3 (Becton Dickinson, New Jersey, USA), according to manufacture's recommendations. Cells were analyzed using flow cytometry and the results were expressed the percentage of caspase-3 positivity compared to untreated cells.

Determination of procaspase-3, survivin, XIAP and pCrkL

For procaspase-3, survivin, XIAP and pCrkL detection, leukemic cell lines were incubated, or not, with different concentrations of LQB-118 or imatinib at different time intervals. After that, pellets of 2×10^6 cells were washed thrice with PBS and lysed in resuspension buffer (40 mM Tris-HCl; 40 mM EDTA; pH 7.5) and SDS (sodium dodecyl sulfate, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 10% for 15 min at 100°C. Protein concentration was determined by the Lowry method [28] and 80 μ g of lysates were subjected to SDS-PAGE onto 15% polyacrylamide gels (Acrylamide/Bis-Acrylamide 30%; 25% H₂O; 115 mM Tris-HCl buffer pH 8.8; Temed; APS). After electrophoresis, proteins were transferred to Hybond-P membranes, which were subsequently stained with Ponceau red to assure equal protein loading and transfer. The blots were blocked for 1 h at room temperature with 5% nonfat dry milk TBS containing 0.2% Tween-20 before incubation with antibodies against procaspase-3 (1:500 dilution, R&D System, USA), survivin (1:1000 dilution, R&D Systems, USA), XIAP (1:500 dilution R&D System, USA) and pCrkL (1:2000 dilution, Cell Signaling, USA) or β -actin (1:1000 dilution, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) for 1 h in the same solution. Secondary antibodies comprised horseradish peroxidase (HRP)-labelled anti-mouse antibody (1:1000 dilution; Amersham Biosciences, USA) or anti-rabbit antibody (1:1000 dilution; Amersham Biosciences, USA). Blots were exposed for 1 h, before four washing steps of 10 min each with TBS-Tween. Antibody complexes were visualized by the ECL detection system (Amersham Biosciences, USA) and band intensities were quantified using the VisionWorks software. The expression of procaspase-3, survivin, XIAP and pCrkL were normalized with respect to β -actin. As a negative control for survivin, XIAP, and pCrkL expressions, lymphocytes were collected from healthy individuals and isolated on a Ficoll-Hypaque gradient.

Statistical analysis

Statistical and graphical information of Pgp inhibition was determined using the GraphPad Prism software (GraphPad

Software Incorporated). Statistically significant differences were calculated using the two-tailed paired *t*, test and *p* values were reported at 95% confidence intervals. The Wilcoxon nonparametric test was used for differences between groups of samples from patients analyzed by apoptosis index using two different LQB-118 concentrations. A *p* value of <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Effect of LQB-118 and imatinib on the viability of K562-sensitive and K562-Lucena-resistant CML cell lines

CML sensitive K562 and resistant K562-Lucena cell lines (2×10^5 cells/ml) were incubated with various concentrations of LQB-118 (1.5, 3.0, 6.0, 12.0 and 24.0 μ M) for 24 h, and viability was evaluated using the MTT assay. LQB-118 reduced cell viability in a dose-dependent manner in both sensitive and resistant CML cell lines.

At the lowest concentration (1.5 μ M), the viability was suppressed in sensitive K562 cells (approximately 40%; Fig. 1a). This effect was less marked in K562-Lucena cells (approximately 25%; Fig. 1b) but this difference was not

statistically significant ($p > 0.05$). However, in both sensitive and resistant CML cell lines, the viability was significantly and successively reduced with increasing concentrations of LQB-118 (Fig. 1-a and b) reaching a plateau at the 6.0 μ M concentration, with less than 30% of remaining viable cells.

Imatinib at the lowest concentration (0.5 μ M) inhibited cell viability after 24 h incubation in a similar way in both cell lines. However, the viability was slightly more suppressed in the K562 cell line as compared to K562-Lucena after 24 h incubation at 1.0 μ M and 2.5 μ M concentrations (30% versus 15% and 40% versus 30%, respectively). There was also some difference after 48 h incubation at the same 0.5, 1.0 and 2.5 μ M concentrations: 65% versus 40%, 70% versus 40% and 75% versus 50%, respectively. Nevertheless, this difference was not observed after 72 h of incubation with imatinib when both resistant and sensitive cell lines were similarly affected (Fig. 1-c and d).

Effect of LQB-118 on apoptosis of K562-sensitive and K562-Lucena-resistant CML cell lines

Apoptosis index was identified and quantified by flow cytometry using the Annexin V assay. Cell lines were studied after 24, 48, and 72 h incubation with five different

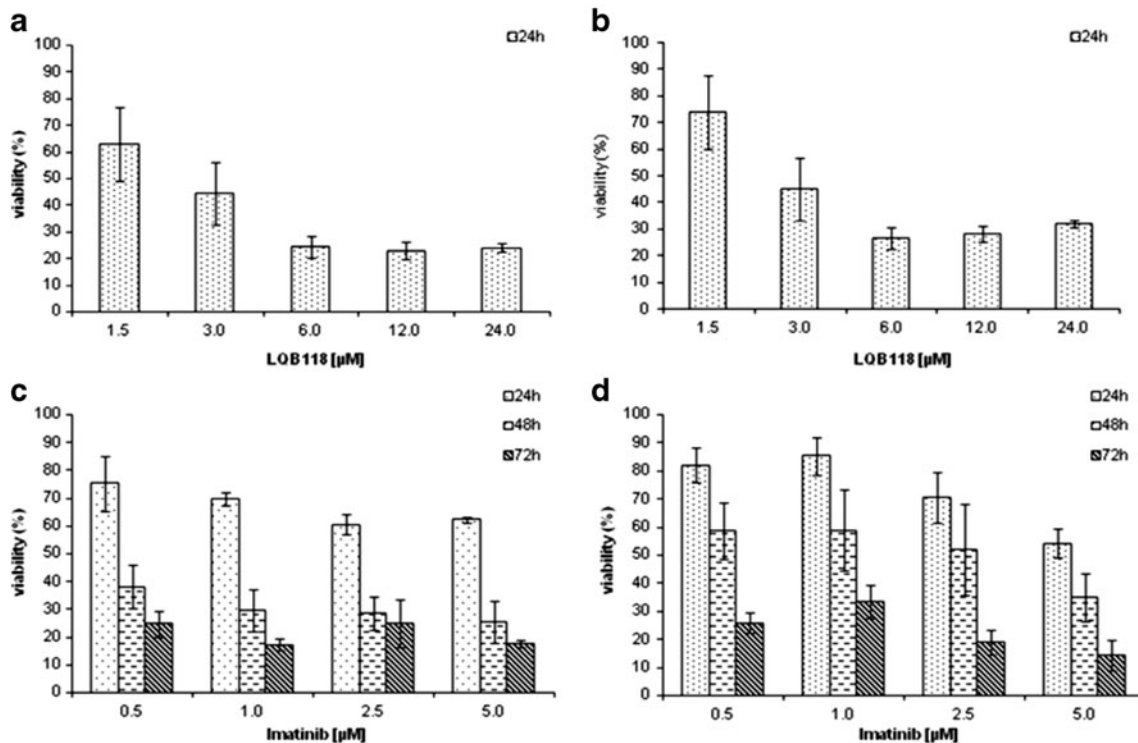


Fig. 1 Viability of CML K562 (sensitive) and K562-Lucena (resistant) cell lines induced by LQB-118 and by imatinib determined by MTT assay. K562-sensitive (a) and K562-Lucena-resistant (b) cell lines were incubated with different concentrations of LQB-118 (1.5, 3.0, 6.0, 12.0 24.0 μ M) for 24 h. The same cell lines

K562 (c) and K562-Lucena (d) were incubated with 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 μ M concentrations of imatinib at different periods (24, 48 and 72 h). Cell viability was expressed as percentage. Error bars represent \pm standard error of the mean of three independent experiments performed in triplicate

concentrations (0.15, 0.75, 1.5, 3.0 and 6.0 μM) of LQB-118. This compound was capable of inducing apoptosis in a time- and dose-dependent manner. At 24 h, LQB-118 induced apoptosis in approximately 70% cells when the sensitive K562 cells were exposed to 3.0 μM (Fig. 2a). This result was comparable to the MTT assay. On the other hand, resistant K562-Lucena cells were less sensitive (less than 50%) when exposed for 24 h to the same concentration (3.0 μM) (Fig. 2b). Almost the same picture was observed when the cells were incubated with 6.0 μM (Fig. 2-a and b). Our results show that no advantage was observed if K562 cells were exposed for longer periods of time. On the other hand, resistant K562-Lucena cells were less sensitive to LQB-118 at 24 h, but their apoptotic index increased when cells were analyzed at later times reaching apoptotic levels of 60%. A significant statistical difference between K562 and K562-Lucena cell lines ($p=0.0167$) was observed when both cell lines were incubated with 1.5 μM LQB-118 for 24 h and 48 h.

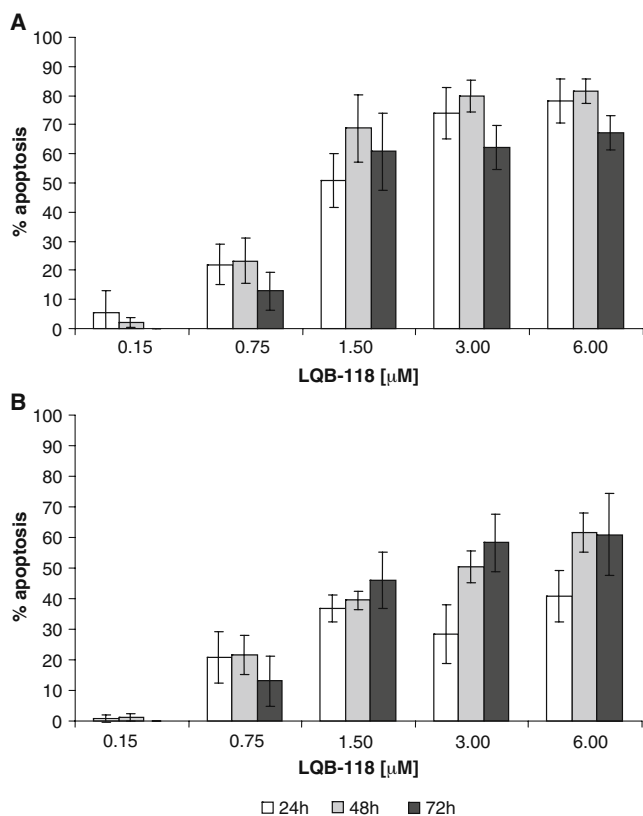


Fig. 2 Apoptosis of CML sensitive K562 and resistant K562-Lucena cell lines induced by LQB-118 determined by the Annexin V assay using flow cytometry. Cell lines K562 (a) and K562 Lucena (b) were incubated with different concentrations of LQB-118 (0.15, 0.75, 1.5, 3.0 and 6.0 μM) for different periods of time (24, 48 and 72 h). After incubation, cells were stained with Annexin-V and propidium iodide for early and late apoptosis detection by flow cytometry. Leukemic cells incubated without LQB-118 were used as control of spontaneous apoptosis. Values are mean \pm of three independent experiments performed in triplicate

Apoptosis induced by imatinib in K562 sensitive and K562-Lucena-resistant CML cell lines

The profile of sensitivity to LQB-118 compound was compared to the recently and extensively used imatinib in pre-clinical studies and in CML patients. Apoptosis was measured in both K562 and K562-Lucena cell lines incubated with imatinib in parallel to the incubation with LQB-118. The concentrations of imatinib were chosen according to our previous work [29] and based on similar concentrations used in the clinical scenario. The index of apoptosis induced by imatinib was time- and dose-dependent in sensitive K562 as well as in resistant K562-Lucena cell lines. Imatinib was capable of inducing 20% of apoptosis index at 24 h incubation with 0.5 and 1.0 μM concentration (Fig. 3a). However, the highest rate of apoptosis was seen when sensitive K562 was incubated with imatinib 5.0 μM at 24 h (almost 70% apoptosis) or when these cells were incubated with 1.0 μM imatinib after 72 h. On the other hand, imatinib was less effective in resistant K562-Lucena cells at 0.5, 1.0 and 5.0 μM concentrations tested after 24 h of exposure (Fig. 3b). An almost similar percentage of apoptosis was observed at 48 and 72 h when cells were exposed to 5.0 μM , despite the fact that at 24 h incubation there was nearly 20%

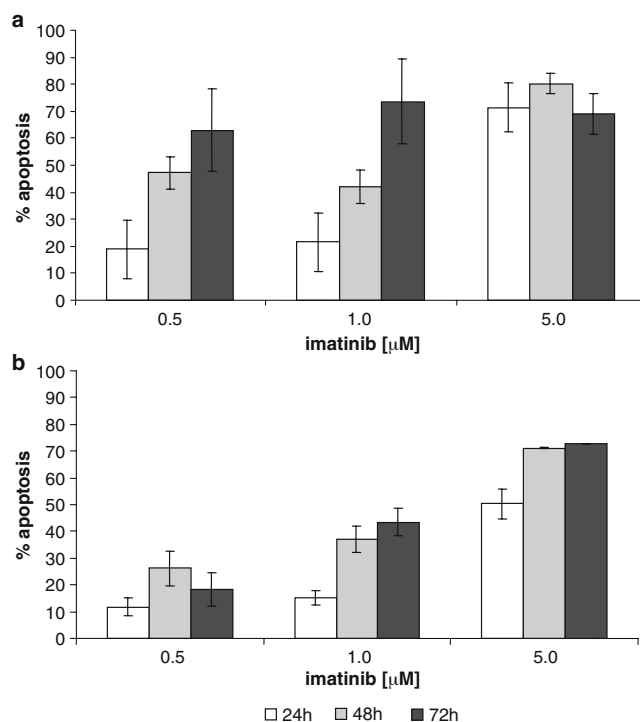


Fig. 3 Apoptosis induced by imatinib in sensitive K562 (a) and resistant K562-Lucena (b) cell lines. Both cell lines were incubated with different concentrations of imatinib (0.5, 1.0 and 5.0 μM) for different periods (24, 48 and 72 h). After incubation, cells were stained with Annexin-V and propidium iodide for early and late apoptosis detection by flow cytometry. Values are mean \pm of three independent experiments performed in triplicate

more apoptotic cells in sensitive K562 cells compared to resistant K562-Lucena cells (Fig. 3b). Nevertheless, no significant statistical difference was observed when both cell lines were compared at each concentration, or time incubation, with imatinib ($p > 0.05$).

Caspase-3 and procaspase-3 levels in response to LQB-118 in CML sensitive K562 and resistant K562-Lucena cell lines

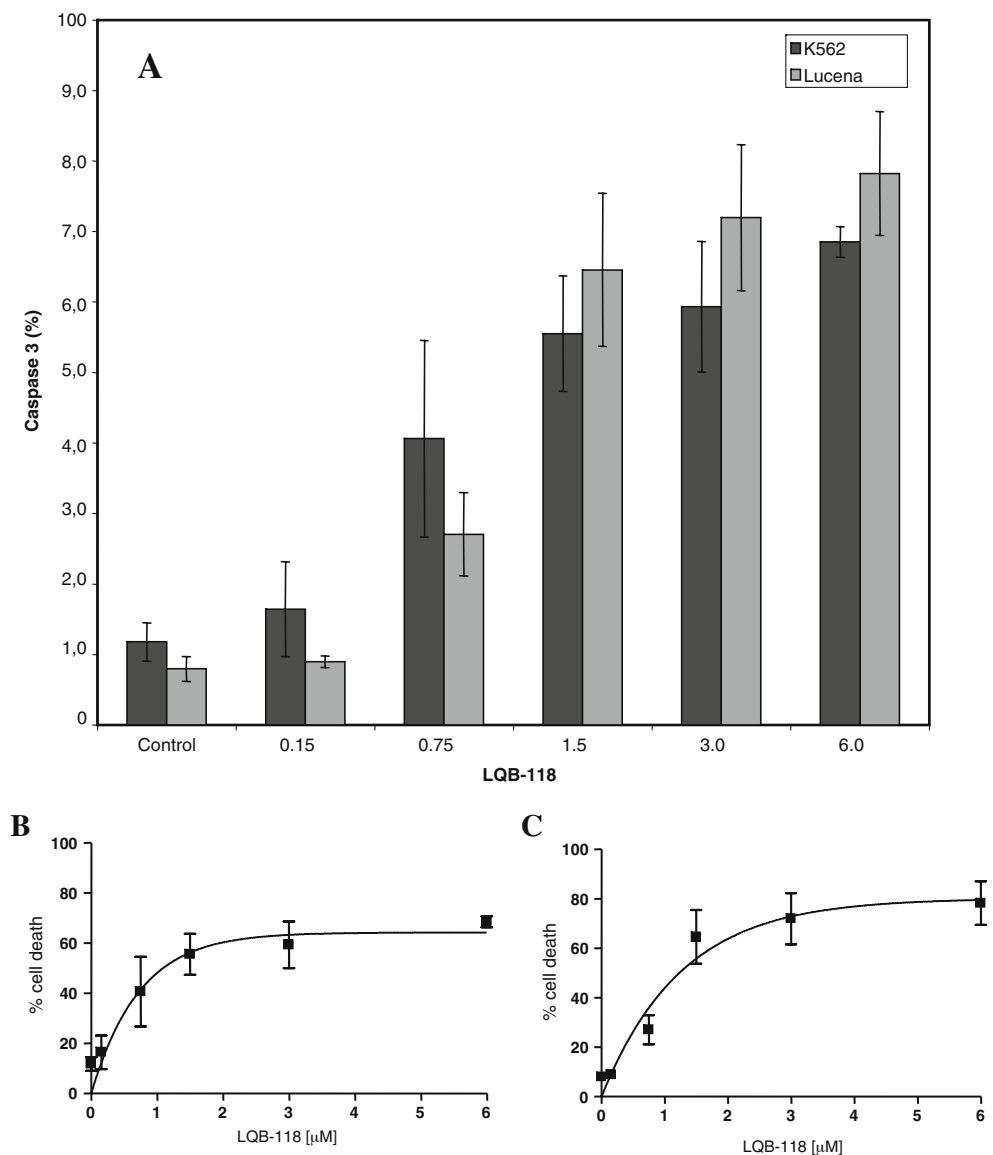
Treatment of sensitive K562 and resistant K562-Lucena cell lines with 0.15, 0.75, 1.5, 3.0 and 6.0 μM LQB-118 for 24 h resulted in a significant dose-dependent increase in the activation of caspase-3, whereas untreated (controls) cell lines showed a low percentage of spontaneous activation of this caspase (Fig. 4a). When EC₅₀ was calculated for apoptosis induction, K562 cells had an EC₅₀ of 1.09 (Fig. 4b) and K562-Lucena cells had an EC₅₀ of 1.23

(Fig. 4c), which was in accordance with what is observed with caspase-3 activation. Furthermore, levels of procaspase-3, analyzed by Western blot showed a dramatic decrease following 24 h of incubation with 3.0 and 6.0 μM LQB-118 in both sensitive (Fig. 5a) and resistant (Fig. 5b) cell lines, suggesting mediation of the apoptotic process by caspase-3.

Effect of LQB-118 on the expressions of survivin and XIAP in CML sensitive K562 and resistant K562-Lucena cell lines

Other possible molecular targets affected by LQB-118 and leading to apoptosis were also investigated. We focused on two important inhibitory apoptotic proteins, survivin and XIAP. Their levels were analyzed by Western blot before and after treatment with the drug. Both sensitive and

Fig. 4 Activation of caspase 3 by LQB-118 and determination of the effective concentration (EC₅₀) capable of inducing cell death in K562 sensitive and K562 Lucena resistant cells. (a) Cells were treated with the indicated concentration of LQB-118 for 24 h and caspase-3 activation was analyzed by flow cytometry as described in Patients, material and methods. High caspase-3 activation was progressively observed using increasing LQB-118 concentrations. EC₅₀ value found for K562 cells (b) was 1.09 and for K562-Lucena (c) was 1.23, after 24 h of incubation with LQB-118



resistant cell lines treated with LQB-118 exhibited a decrease of both proteins. Marked downregulation of survivin and XIAP expression was seen in sensitive K562 (Fig. 5a) and resistant K562-Lucena (Fig. 5b) cells after 24 h incubation with 1.5 μ M LQB-118.

Phosphorylation of CrkL in response to LQB118 and imatinib

The adaptor protein CrkL is the major tyrosine-phosphorylated protein detected in BCR-ABL expressing cells [30]. Indirect measurement of BCR-ABL kinase activity may be performed through analysis of phosphorylated CRKL (pCrKL) levels and used as a tool to assess BCR-ABL status and the abrogation of CrkL by imatinib in CML cells. It is a parameter to evaluate imatinib-sensitive or resistant CML cells [31]. In our work, K562 cells were incubated with imatinib at different concentrations (0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μ M) for 2 h (Fig. 6a) or LQB-118 at different

concentrations (0.15, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0 μ M) for 24 h (Fig. 6b) to analyze its effect on BCR-ABL activity. Thus, we compared both LQB-118 and imatinib in an effort to observe if they had a similar mechanism of action. As expected, pCrkL was inhibited, by imatinib, in a dose-dependent fashion (Fig. 6a). However, this effect was not observed when cells were incubated with LQB-118, suggesting that this is not the mode of action of the drug. It is possible, however that this reflects the different incubation period.

Inhibition of Pgp expression by LQB-118

One of the problems of imatinib treatment is that in some patients, resistance is due to the development of increased expression of Pgp [11]. In the present work, K562-Lucena cells (that overexpress Pgp) were exposed to 1.5 μ M LQB-118 for three days and these cells displayed a reduced expression of Pgp at the end of this period. A significant

Fig. 5 Levels of procaspase-3, survivin, and XIAP in response to increasing concentrations of LQB-118 in K562 sensitive (a) and K562-Lucena resistant (b) cell lines. Western blotting analysis of pro-caspase 3, survivin and XIAP expression in K562 CML cells (a) treated or not with LQB-118 for 24 h. Treatment with LQB-118 decreased pro-caspase, survivin, and XIAP levels compared to untreated cells in both cell lines. β -actin was used to evaluate protein loading. Changes in pro-caspase, survivin and XIAP levels induced by LQB-118 were expressed as the densitometric ratio of the expression of the protein being analyzed and β -actin. The blots shown are representative of three independent experiments

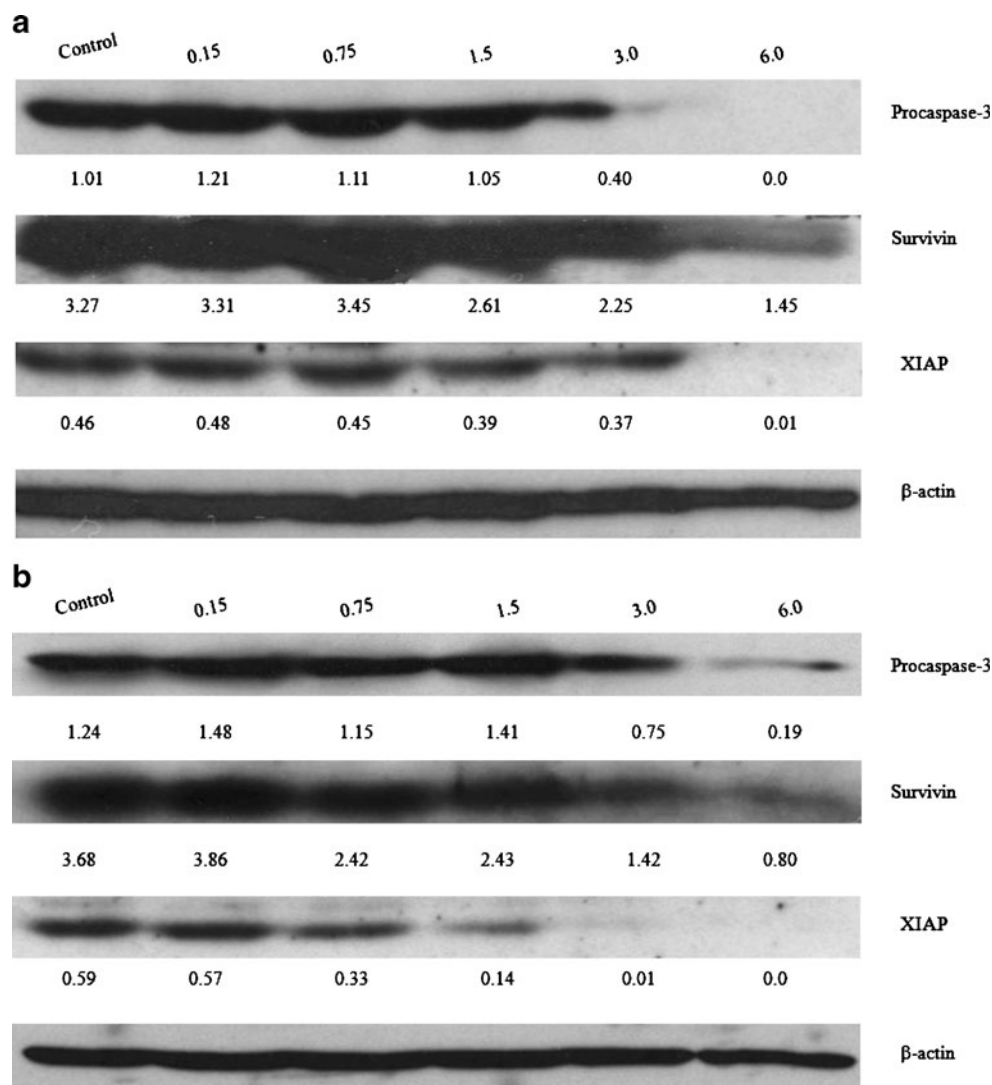
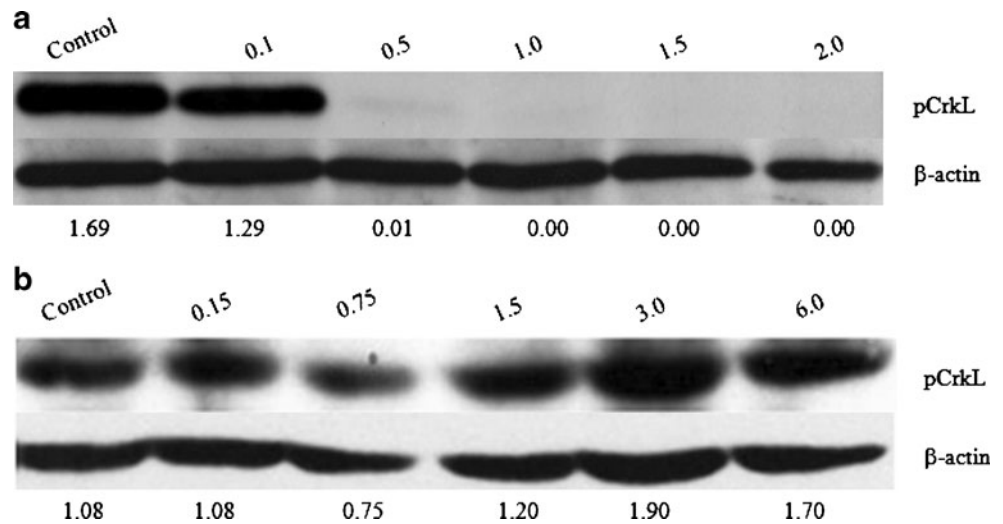


Fig. 6 Western blot demonstrating pCrkL levels in CML K562 cells exposed to increasing concentrations of imatinib and LQB-118. pCrkL was inhibited by imatinib in a dose-dependent fashion (a) but not with LQB-118 (b). β -actin controls are shown in the bottom to ensure equal loading of each lane. Data are from one of three independent experiments with similar results



decrease was observed at 72 h ($p=0.04$), whereas no changes were seen at 24 or 48 h (Fig. 7a and b). These data indicate that the inhibition of Pgp by LQB-118 is a late process but might contribute to the sensitivity of resistant cells to apoptosis induced by this drug.

Effect of LQB-118 on the apoptosis rate of cells obtained from CML patients

We compared the apoptosis rate of CML cells from 13 patients exposed to LQB-118 to that of unexposed cells

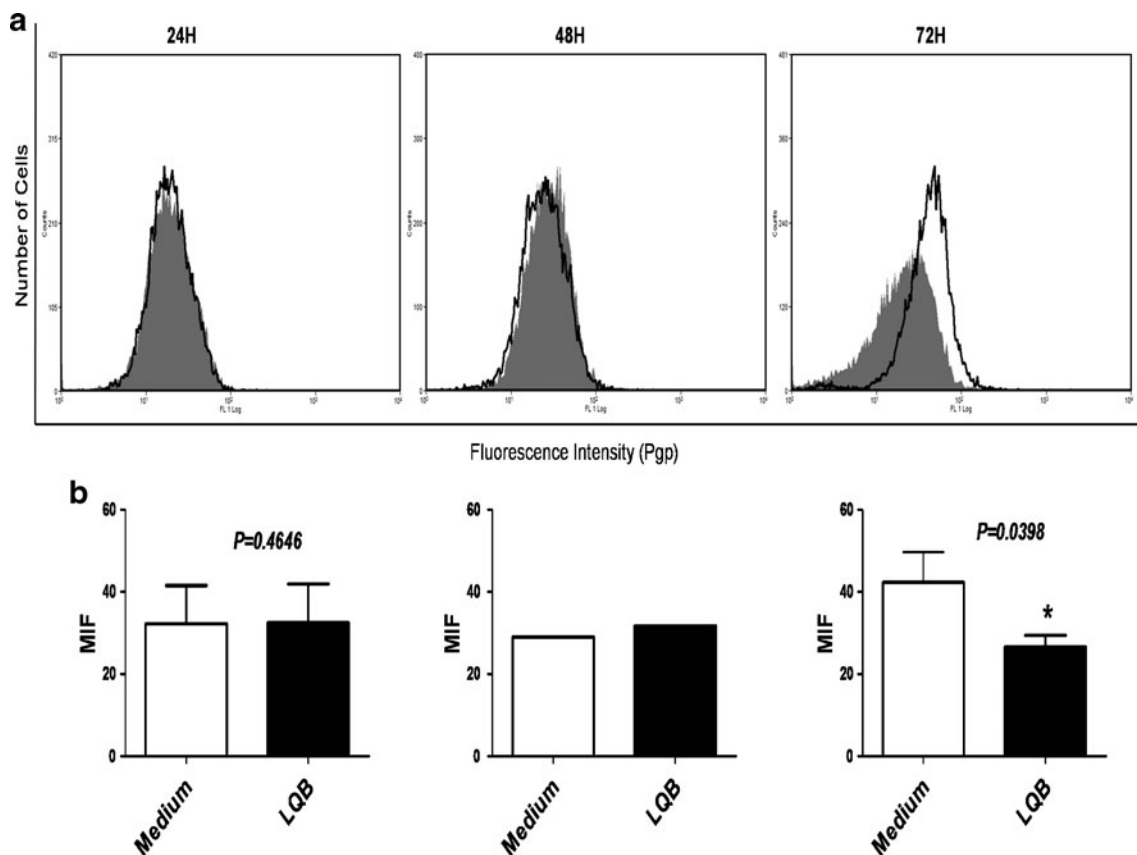


Fig. 7 Inhibition of P-glycoprotein (Pgp) expression following LQB-118 treatment. The expression of Pgp in the resistant K562-Lucena cell line, was analyzed by flow cytometry after culture of these cells for 24, 48, and 72 h in the presence of 1.5 μ M LQB-118. (a) Histograms comparing the mean fluorescence intensity (MFI) of Pgp expression in samples not treated with the drug (black line) or after

being cultured with LQB-118 (gray area). (b) Empty columns represent the MIF of untreated K562-Lucena cells and black columns after treatment with 1.5 μ M LQB-118. Significant statistical difference ($p=0.0398$) was observed in Pgp expressions comparing K562-Lucena treated or untreated with LQB-118

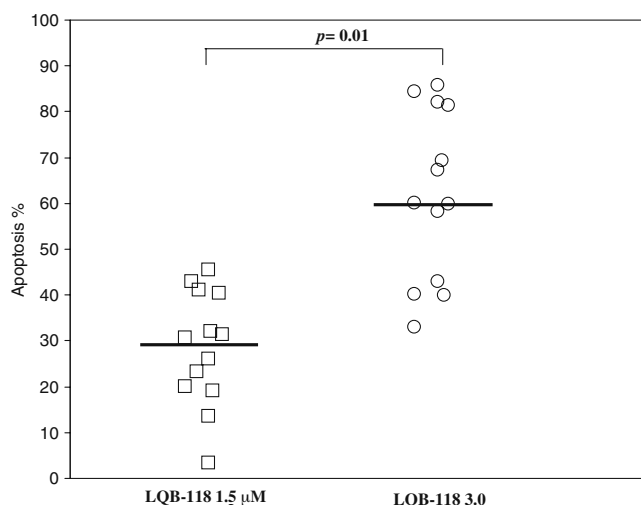


Fig. 8 Apoptosis induced by LQB-118 in CML cells from patients.

The percentage of apoptosis (early + late apoptosis), after 48 h exposure to LQB-118, in CML cells from thirteen patients was obtained by the percentage of apoptosis induced by LQB-118 minus apoptosis of untreated cells (spontaneous apoptosis). The median of apoptosis induced by 1.5 μM LQB-118 was equal to 30% and by 3.0 μM LQB-118 was equal to 60%. This difference was statistically significant ($p=0.01$)

(controls). The apoptotic rate induced by 1.5 μM LQB-118 at 24 h of incubation ranged from 12.6% to 37.7% (median: 23.53%). This rate increased after 48 h of incubation (median: 30.74%; range: 3.36 to 45.59%). As seen in Fig. 8, the concentration of 3.0 μM of LQB-118 after 48 h of incubation was capable of inducing a marked index of apoptosis (median of 60.18%; range: 40.09% to 85.86%). The apoptotic rate analyzed in samples when cells were incubated with two different concentrations (1.5 and

3.0 μM) at the same exposure time (48 h) showed that there was a statistically significant difference ($p=0.01$) between the two concentrations. In four samples from CML patients it was possible to observe more than 80% apoptosis rate. The highest LQB-118 concentration tested (6.0 μM) at 48 h of incubation did not seem to induce an increased cell death compared to 3.0 μM concentration. As a whole, we observed that the best condition for apoptosis induction by LQB-118 was the concentration of 3.0 μM at 48 h. Although only a small number of CML patient samples were analyzed, this result is in accordance to what was found in sensitive and resistant cell lines.

LQB118-induced apoptosis in cells from CML patients exhibiting clinical and biological MDR characteristics

We investigated the association of Sokal prognostic score with the apoptosis index induced by LQB-118. In our study, there was a wide variation in the apoptosis rate induced by 3 μM of LQB-118 following 48 h incubation among the 13 CML samples studied. However, it was clear that LQB-118 was able to induce apoptosis at low-risk as well as intermediate- and high-risk Sokal scores.

In our group of patients, there was a marked interpatient variability regarding overexpression of drug-resistant proteins. However, our study shows that in this cohort, expression as well activity of efflux pumps is a frequent feature of CML patients upon presentation. Interestingly, LQB-118 was able to induce apoptosis independently of positive or negative MDR efflux pump activity or Pgp and MRP1 expressions, similar to what was observed using cell lines presenting these features. Besides, this drug was also capable of inducing a high rate of apoptosis on CML cells

Table 1 Clinical and biological characteristics of CML patients

Patient number	Age/gender	Sokal score	MDR activity	Pgp	MRP1	p53	LQB-induced apoptosis %
1	39/F	High	–	+	+	+	81.47
2	34/F	Inter	+	+	+	+	82.08
3	29/F	High	+	+	–	+	43.07
4	22/M	High	–	+	–	–	40.32
5	17/M	Low	+	–	+	–	58.29
6	31/M	Inter	+	+	+	–	33.11
7	81/F	High	+	+	+	–	40.08
8	45/M	Low	+	+	+	–	60.20
9	31/M	Low	+	+	+	–	69.40
10	39/M	Low	–	+	+	+	67.30
11	50/F	Low	–	+	+	+	85.86
12	26/M	Inter	–	+	+	–	59.84
13	47/M	Inter	+	+	+	+	84.53

MDR = multidrug resistance; Pgp = P-glycoprotein; F = female; M = male; Inter = intermediate; LQB = LQB-118 3 μM

exhibiting p53 overexpression and in patients co-expressing these MDR proteins (Table 1).

Discussion

Imatinib treatment in CML patients represents a fundamental change to contemporary hematology practice. Nevertheless, resistance to imatinib has been consistently associated with BCR-ABL mutations, but other mechanisms might contribute, operating individually and collectively, to drug resistance at the clinical scenario [32]. Among these alternative mechanisms, the clinical resistance of CML patients to imatinib can also be attributed to the overexpression of ABC transporters, such as Pgp [11], which was responsible for the efflux of drugs and, therefore, reducing their clinical efficacy. The present study examined in the CML cell line K562 and its multidrug resistant counterpart K562-Lucena [18, 19], the effect of a new compound, the pterocarpanquinone LQB-118 [17].

The compound LQB-118 induced, in both cell lines, a decrease in metabolic activity, probably reflecting cell death. An increase in phosphatidyl serine externalization was observed using Annexin V. This is a characteristic of apoptosis and further evidence was obtained by measuring pro-caspase 3 levels and caspase-3 activation following LQB-118 treatment. Caspase-3, the executioner caspase, is one the most commonly involved in the downstream execution of apoptosis in various cell types [33]. The effective concentration of LQB-118 and imatinib were of the same order of magnitude.

The possibility that LQB-118 was cytotoxic by acting as a precursor of reactive oxygen species leading to oxidative stress seemed unlikely, as K562 and K562-Lucena are extremely resistant to oxidative stress [17]. The oxidative stress sensitive leukemic cell HL-60 has been shown to be more sensitive than K562 [18]. To investigate if LQB-118 had an effect by inhibiting phosphorylation of BCR-ABL and its downstream targets, as reported for imatinib [32], phosphorylation of Crkl was measured.

As expected, imatinib reduced the production of the phosphorylated form of Crkl (pCrkl) in K562 cells. Reduction of pCrkl is indicative of BCR-ABL kinase inhibition as has been reported by others in CML cells [32]. On the other hand, although LQB-118 was able to produce a similar rate of apoptosis in both sensitive and resistant K562 cell lines, this compound was not able to inhibit pCrkl. This finding suggests that the mechanism of action of LQB-118 does not involve inhibition of BCR-ABL phosphorylation.

Other pathways may induce, or prevent, cell death. In the present study, it was observed that both cell lines, K562 and MDR K562-Lucena, overexpress the IAPs survivin and

XIAP, conferring to these cells additional inhibitory mechanisms against apoptosis.

Inhibition of both survivin and XIAP was obtained with LQB-118. Other authors [34] have described that imatinib significantly decreased survivin expression and cell viability in sensitive KBM5 cells but much less in imatinib-resistant KBM5 subline. In the present work, both K562 and the MDR K562-Lucena showed a decreased XIAP and survivin expression. Survivin, a potent anti-apoptotic protein, has been extensively studied in several types of cancer [35]. It has been shown that survivin in the nucleus is related to cell proliferation and in the cytoplasm acts as an antiapoptotic protein [36]. Using immunocytochemistry assay, it was possible to observe that the parental K562 as well as the MDR cell line displayed nuclear and cytoplasmic survivin expression (data not shown). The observation that LQB-118 was capable of decreasing survivin and XIAP levels to a higher degree in a Pgp-positive cell line compared to a negative one, suggests a relationship between Pgp and IAPs.

Treatment with LQB-118 did not lead to increased resistance. In fact, it was possible to demonstrate that Pgp overexpression was markedly inhibited by LQB-118 in the MDR K562-Lucena cell line. In support to our findings, a recent publication has also demonstrated that survivin mRNA expression was influenced by Pgp. In that report, survivin mRNA expression was significantly suppressed after the Pgp inhibition by verapamil, a well-known MDR modulatory agent [37].

We further extended our study on the effect of LQB-118 towards CML cells obtained from patients, in order to verify if our findings, using cell lines, could be extended to cells from CML patients. Of special interest in our results was the fact that LQB-118 was capable of inducing a high apoptosis rate in patients overexpressing Pgp and MRP1, individually or simultaneously, as well as having MDR activity analyzed by Rho-123 assay. Despite some controversy regarding the ideal fluorochrome, Rho-123 assay has been widely used for MDR activity analysis and it is a good test for MDR activity detection in CML samples, as previously shown by our group [23]. Interestingly, a high apoptosis rate was also observed in patients expressing MDR proteins with no MDR activity. The presence, but not the activity, of these ABC proteins can indicate their additional roles, besides the extrusion xenobiotics. As reported previously, an anti-apoptotic action of Pgp is the inhibition of caspase activation [38, 39].

The knowledge that LQB-118 was capable of overcoming not only one among the more well-known drug resistance mechanisms, such as Pgp overexpression, but also MRP1, might be of great clinical utility. Co-expression of efflux pumps has not been addressed by others studies but has already been observed in a group of CML patients

in our previous work [23]. Functional simultaneous ABC transport proteins can reduce the possibility of drugs reaching their intracellular target, however, in the present work this was not the case for LQB-118.

In our study, we found an elevated percentage of p53 expression in our group of CML patients at the chronic phase, and LQB-118 induced apoptosis in these cells overexpressing p53 associated or not with MDR efflux pumps. This suggests that the apoptosis induced by LQB-118, is a p53-mediated independent pathway.

When, clinical status was taken into account, LQB-118 incubated for 48 h at a concentration of 3.0 μM was able to induce high apoptotic levels in low-, intermediate-and high Sokal scores, indistinctly. The Sokal score system has demonstrated a good relationship between CML in all phases and clinical outcome in patients treated with alfa-interferon alone [40] as well as imatinib [41].

In conclusion, this study provided different spectra of biologic parameters that may have implications in the understanding of the LQB-118 response in cells presenting the multifactorial MDR phenotype. LQB-118 was capable of inhibiting Pgp, survivin and XIAP expression in an MDR CML Ph⁺ cell line and inducing a high rate of apoptosis. In addition, this anti-apoptotic effect was observed in resistant cells from patients also exhibiting simultaneous Pgp, MRP1, and p53 overexpression. This finding also suggests that IAPs and Pgp inhibition can be a common molecular target pathway reached by LQB-118.

Acknowledgements This work was supported by grants from FINEP, FAPERJ-PensaRio, INCT, CNPq and Swissbridge Foundation.

References

- Rowley JD (1973) Letter: a new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243:290–293
- Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON (1990) Tyrosine kinase activity and transformation potency of BCR-ABL oncogene products. *Science* 247:1079–1082
- Druker BJ (2008) Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* 112:4808–4817
- Gambacorti-Passerini CB, Gunby RH, Piazza R, Galiotta A, Rostagno R, Scapozza L (2003) Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. *Lancet* 4:75–85
- Melo JV, Chuah C (2007) Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. *Cancer Lett* 249:121–132
- Baccarini M, Saglio G, Goldman JM, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum E et al (2006) Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia. Recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemia-net. *Blood* 108:1809–1820
- Volpe G, Panuzzo C, Uliciani S, Cilloni D (2009) Imatinib resistance in CML. *Cancer Lett* 274:1–9
- Krorashad JS, Anabd M, Marin D, Saunders S, Al-Jabary T, Iqbal A et al (2006) The presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to imatinib. *Leukemia* 20:658–663
- Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M (2004) Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood* 104:3739–3745
- Wendel HG, de Stanchina E, Cepero E, Ray S, Emig M, Fridman JS et al (2006) Loss of p53 impedes the antileukemic response to BCR-ABL inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:7444–7449
- Illmer T, Schaich M, Platzbecker U, Freiberg-Richter J, Oelschlägel U, von Bonin M et al (2004) P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. *Leukemia* 18:401–408
- Wrzesień-Kuś A, Smolewski P, Sobczak-Pluta A, Wierzbowska A, Robak T (2004) The inhibitor of apoptosis protein family and its antagonists in acute leukemias. *Apoptosis* 9:705–715
- Deremer DL, Ustun C, Natarajan K (2008) Nilotinib: a second-generation tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leucemia. *Clin Ther* 30:1956–1975
- Mahon F-X, Hayette S, Lagarde V, Belloc F, Turcq B, Nicolini F et al (2008) Evidence that resistance to nilotinib may be due to BCR-ABL, Pgp, or Src kinase overexpression. *Cancer Res* 68:9809–9816
- Mahon F-X, Belloc F, Lagarde V, Chollet C, Moreau-Gaudry F, Reiffers J et al (2003) MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* 101:2368–2373
- Netto CD, Santos ES, Castro CP, da Silva AJ, Rumjanek VM, Costa PR (2009) (+/-)-3, 4-Dihydroxy-8, 9-methylenedioxypterocarpan and derivatives: cytotoxic effect on human leukemia cell lines. *Eur J Med Chem* 44:920–925
- Netto CD, Silva AJ, Salustiano EJ, Rica IG, Cavalcante MC, Rumjanek VM et al (2010) New Pterocarpanquinones: synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF- α modulation in human PBMC cells. *Bioorg Med Chem* 18:1610–1616
- Trindade GS, Capella MA, Capella LS, Affonso-Mitidieri OR, Rumjanek VM (1999) Differences in sensitivity to UVC, UVB and UVA radiation of a multidrug-resistant cell line overexpressing P-glycoprotein. *Photochem Photobiol* 69:694–699
- Rumjanek VM, Trindade GS, Wagner-Souza K, de-Oliveira MC, Marques-Santos LF, Maia RC et al (2001) Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. *An Acad Bras Cien* 73:57–69
- Sokal JE, Cox EB, Baccarini M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE et al (1984) Prognostic discrimination in “good-risk” chronic granulocytic leukemia. *Blood* 63:789–799
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 65:55–63
- Vasconcelos FC, Gattass CR, Rumjanek VM, Maia RC (2007) Pomolic acid-induced apoptosis in cells from patients with chronic myeloid leukemia exhibiting different drug resistance profile. *Invest New Drugs* 25:525–533
- Vasconcelos FC, Cavalcanti GB Jr, Silva KL, de Meis E, Kwee JK, Rumjanek VM et al (2007) Contrasting features of MDR phenotype in leukemias by using two fluorochromes: implications for clinical practice. *Leuk Res* 31:445–454
- Huet S, Marie J-P, Gualde N, Robert J (1998) Reference method for detection of P-gp mediated multi-drug resistance in human hematological malignancies: a method validated by the laboratories of the French Drug Resistance Network. *Cytometry* 34:248–256
- Legrand O, Simonin G, Perrot J-Y, Zittoun R, Marie JP (1998) Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 91:4480–4488

26. Hu XF, Slater A, Kantharidis P, Rischin S, Juneja S, Rossi R et al (1999) Altered multi-drug resistance phenotype caused by anthracycline analogues and cytosine arabinoside in myeloid leukemia. *Blood* 93:4086–4095
27. Cavalcanti GB Jr, Vasconcelos FC, Pinto GF, Scheiner MA, Dobbin JA, Klumb CE et al (2004) Coexpression of p53 protein and MDR functional phenotype in leukemias: the predominant association in chronic myeloid leukemia. *Cytometry* 61B:1–8
28. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
29. Kwee JK, Luque DG, Ferreira ACS, Vasconcelos FC, Silva KL, Klumb CE et al (2008) Modulation of reactive oxygen species by antioxidants in chronic myeloid leukemia cells enhances imatinib sensitivity through survivin downregulation. *Anticancer Drugs* 19:975–981
30. Oda T, Heaney C, Hagopian JR, Okuda K, Griffin JD, Druker BJ (1994) CrkL is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *J Biol Chem* 269:22925–22928
31. White D, Saunders V, Lyons AB, Branford S, Grigg A, Bik To L et al (2005) In vitro sensitivity to imatinib-induced inhibition of ABL kinase activity is predictive of molecular response in patients with de novo CML. *Blood* 106:2520–2526
32. Bixby D, Talpaz M (2009) Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 461–476
33. Zörnig M, Hueber A-O, Baum W, Evan G (2001) Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1551:F1–F37
34. Carter BZ, Mak DH, Schober WD, Cabreira-Hansen M, Beran M, McQueen T et al (2006) Regulation of survivin expression through Bcr-Abl/MAPK cascade: targeting survivin overcomes imatinib resistance and increases imatinib sensitivity in imatinib-responsive CML cells. *Blood* 107:1555–1563
35. Duffy MJ, O'Donovan N, Brennan DJ, Gallagher WM, Ryan BM (2007) Survivin: a promising tumor biomarker. *Cancer Lett* 249:49–60
36. Mahotka C, Liebmann J, Wenzel M, Suschek CV, Schmitt M, Gabbert HE et al (2001) Differential subcellular localization of functionally divergent splice variants. *Cell Death Differ* 9:1334–1342
37. Feng L, Xie Z-H, Cai G-P, Jiang Y-Y (2007) The effect of survivin on multidrug resistance mediated by P-glycoprotein in MCF-7 and its adriamycin resistant cells. *Biol Pharm Bull* 30:2279–2283
38. Johnstone RW, Cretney E, Smyth MJ (1999) P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death. *Blood* 93:1075–1085
39. Tainton KM, Smyth MJ, Jackson JT, Tanner JE, Cerruti L, Jane SM et al (2004) Mutational analysis of P-glycoprotein: suppression of caspase activation in the absence of ATP-dependent drug efflux. *Cell Death Differ* 11:1028–1037
40. Binifazi F, de Vivo A, Rosti G et al (2001) Chronic myeloid leukemia and interferon α : a study of complete cytogenetic responders. *Blood* 98:3074–3081
41. Castagnetti F, Palandri F, Amabile M, Testoni N, Luatti S, Soverini S et al (2009) Results of high-dose imatinib mesylate in intermediate Sokal risk chronic myeloid leukemia patients in early chronic phase: a phase 2 trial of the GINEMA CML Working Party. *Blood* 113:3428–3434

Curriculum Vitae

Nome: Thiago de Sá Bacelar

Nascimento: 05/10/1984

Naturalidade: Rio de Janeiro

➤ **Formação Acadêmica**

Faculdade de Ciências Biológicas Modalidade Médica - pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, agosto de 2008

Mestrado em Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica - Universidade Federal do Rio de Janeiro

➤ **Comunicação em Congresso**

12 comunicações em congressos locais

3 comunicações em congressos nacionais

➤ **Publicações**

Salustiano, Eduardo J. S., Netto, Chaquip D., Fernandes, Renata F., Silva, Alcides J. M., **Bacelar, Thiago S.**, Castro, Carolina P., Buarque, Camilla D., Maia, Raquel C., Rumjanek, Vivian M., Costa, Paulo R. R. (2010). Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, a-lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. *Investigational New Drugs*. 28:139 - 144.

Netto, Chaquip D., da Silva, Alcides J.M., Salustiano, Eduardo J.S., **Bacelar, Thiago S.**, Riça, Ingrid G., Cavalcante, Moises C.M., Rumjanek, Vivian M., Costa, Paulo R.R. (2010). New pterocarpanquinones: Synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF- α modulation in human PBMC cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 18:1610 - 1616.

Maia, Raquel C., Vasconcelos, Flavia C., **Sá Bacelar, Thiago**, Salustiano, Eduardo J., Silva, Luis Felipe R., Pereira, Débora L., Moellman-Coelho, Arthur, Netto, Chaquip D., Silva, Alcides J., Rumjanek, Vivian M., Costa, Paulo R. R. (2010). LQB-118, a pterocarpanquinone structurally related to lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone]: a novel class of agent with high apoptotic effect in chronic myeloid leukemia cells. *Investigational New Drugs*.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)