



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

SARAH LEYENNE ALVES SALES

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE CONTROLE DO CICLO
CELULAR EM LINHAGEM DE LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA (KG-1):
CARACTERIZAÇÃO DE ALVOS DE UM NOVO FÁRMACO**

FORTALEZA

2022

SARAH LEYENNE ALVES SALES

REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE CONTROLE DO CICLO CELULAR
EM LINHAGEM DE LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA (KG-1): CARACTERIZAÇÃO
DE ALVOS DE UM NOVO FÁRMACO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Área de conhecimento: Ciências Biológicas II

Orientador (a): Prof. Dra. Cláudia do Ó Pessoa.

Coorientador (a): Dra. Cristiana L. Miranda Furtado

Fortaleza

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S155r Sales, Sarah Leyenne Alves.
Regulação da expressão de genes de controle do ciclo celular em linhagem de leucemia mielóide aguda (kg-1): caracterização de alvos de um novo fármaco / Sarah Leyenne Alves Sales. – 2022.
71 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa.

Coorientação: Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado.

1. Ciclo celular. 2. Produtos Biológicos. 3. Leucemias. 4. Expressão gênica. 5. Terapia de alvo molecular. I. Título.

CDD 615.1

SARAH LEYENNE ALVES SALES

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE CONTROLE DO CICLO
CELULAR EM LINHAGEM DE LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA (KG-1):
CARACTERIZAÇÃO DE ALVOS DE UM NOVO FÁRMACO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Área de conhecimento: Ciências Biológicas II

Orientador (a): Prof. Dra. Cláudia do Ó Pessoa.

Coorientador (a): Dra. Cristiana L. Miranda Furtado

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa

Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado

Universidade de Fortaleza – UNIFOR

Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar

Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Karina Bezerra Salomão Xavier

Universidade de São Paulo - USP

Aos que são meu alicerce e meu porto seguro:

Deus e família!

“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu, é sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu...”

Também não é sobre correr contra o tempo pra ter sempre mais, porque quando menos se espera a vida já ficou pra trás”.

(Ana Vilela)

Agradecimentos

A **Deus**, por seu impressionante, infinito e ousado amor. Eu não tenho palavras pra mensurar minha gratidão a ti Senhor, tu me sustentasses e me destes força em todos os momentos, segurou minhas mãos e trilhou todos os caminhos por onde passei até agora, por isso posso dizer “Até aqui nos ajudou o SENHOR” -1 Samuel 7:12.

Aos **meu pais, Leila e Elanio, irmãos, Adielly e Samuel e ao Ícaro (meu amor)**, que foram meu alicerce, minha base e fortaleza durante todos os dias dessa jornada. Sempre estarei aqui por vocês e para vocês, que nunca mediram esforços pra me apoiar em todos os passos e seguiram/seguem de mãos dadas comigo nessa imensa aventura que um dia sonhamos.

Agradeço as minhas chefas, professora **Cláudia Pessoa** e professora **Cristiana Libardi**, que me acolheram em seu laboratório, sempre me incentivando a crescer e oferecendo todo suporte estrutural e científico para o desenvolvimento desse projeto. Gostaria de dizer que vocês são minhas inspirações como professoras, pesquisadoras e como mulher. Saber que existem mulheres com tanto talento, dedicação e amor que lutam e se destacam na pesquisa do nosso país é inspirador, entusiasmante e fascinante. Vocês são incríveis.

Agradeço aos meus amigos do HCS, do HC e da Fanor (**Dandara, Adrielly, Laysla, Kalyne, Géssica e Paulo**) por estarem comigo desde o início partilhando os momentos de alegria, aflição, tristezas e vitórias.

Agradeço aos meu lindo amigos LOEANOS, em especial ao meu irmão de biomol **Renan**, que me acolheu desde o início. Obrigada Renanzinho por partilhar todos os seus conhecimentos comigo, por todos os experimentos juntos, pelas palavras, conselhos e por sua amizade. Aos meus amigos **Celina, Pedro, Neto e Bruno** por toda ajuda, por todas as conversas, por todos os cafés, por tornarem nossa rotina tão leve e fazer a pós graduação um momento único na minha vida. Aos queridos e maravilhosos ICs, em especial a **Marilux e João** que sempre estiveram dispostos e muito competentes em ajudar quando precisei. A nossa técnica maravilhosa, **Silvana** por todo suporte e carinho.

Agradeço minha **banca de qualificação** e minha **banca de defesa** pelas correções, sugestões e toda contribuição que agregaram e foram/serão de grande valia para a escrita final deste trabalho.

Agradeço as agências de fomento **CAPES, CNPq e FUNCAP** por todo apoio, incentivo e contribuição para com o desenvolvimento deste trabalho.

E por fim, sou grata a todos aqueles que durante essa caminhada contribuíram de forma direta ou indireta para o meu crescimento pessoal e profissional para que no final desse sonho eu pudesse concluir minhas metas com êxito.

Regulação da expressão de genes de controle do ciclo celular em linhagem de leucemia mielóide aguda (kg-1): caracterização de alvos de um novo fármaco

Resumo

Alterações no mecanismo de controle do ciclo celular leva a proliferação descontrolada, capacidade de invasão e metástase, características primordiais para o desenvolvimento do câncer. Adicionalmente, a diferenciação anormal durante os ciclos de divisão das células progenitoras/tronco hematopoiéticas é uma característica marcante das oncohematologias, como as leucemias. Quimioterápicos que atuam no controle “negativo” do ciclo celular denominados “fármacos ciclo-específicos” mostram-se efetivos agentes tumorais em células que estão em constante divisão. Os isoflavonoides naturais apresentam importantes atividades biológicas tais como: antifúngicas, antibacterianas, inseticidas e antitumorais. O presente estudo buscou avaliar o perfil citotóxico (*in vitro*) de um isoflavonoides frente a um painel de linhagens leucêmicas e determinar a sua capacidade de modulação da expressão de genes envolvidos no ciclo celular. O perfil antiproliferativo do composto foi avaliado através do método de MTT. O perfil de bloqueio na fase do ciclo celular foi avaliado através da citometria de fluxo e o perfil de expressão genica foi feito através da técnica de PCR em tempo real. O composto avaliado apresentou potencial antiproliferativo em todas as linhagens leucêmicas testadas, onde a CI_{50} variou de 0,41 (EMP \pm 0,13) a 7,51 (EMP \pm 0,29) μ M. As linhagens HL-60 (CI_{50} = 0,41 μ M – EMP \pm 0,13) e KG-1 (CI_{50} = 1,0 μ M – EMP \pm 0,09) apresentaram maior sensibilidade ao composto, respectivamente. O tratamento com o isoflavonoide levou ao bloqueio da divisão celular na fase G2/M em todos os tempos testados (12, 24 e 48h, $p < 0,0001$) quando comparado com o controle negativo sem droga. Além disso, durante todos os tempos de tratamento com o composto foi observado diversas alterações na morfologia das células KG-1, como o aumento do número de vacúolos, redução do conteúdo nuclear e formação de prolongamentos da membrana plasmática “*blebs*”. O resultado da expressão dos genes *CEP55*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20* e *ATM*, após 12 e 24 horas de incubação, mostrou que o composto reduziu de forma significativa a expressão do gene *AURKB* ($p < 0,02$) somente no tempo de 24 horas, quando comparado ao controle negativo sem tratamento. Os resultados apresentados confirmaram que o isoflavonoide avaliado apresentou perfil antiproliferativo e citotóxico, apresentando bloqueio em G2/M, corroborando com outros estudos que já haviam demonstrado seu perfil de parada durante essa fase do ciclo celular. Os isoflavonoides testados parecem atuar na inibição do gene *AURKB*, sem efeitos nos demais genes avaliados. As auroras quinases possuem um papel crítico na divisão celular, atuando nos mecanismos de alinhamento dos cromossomos, formação do fuso mitótico e citocinese. A modulação desse gene representa um importante alvo na terapia anticâncer considerando que o grupo de drogas antimitóticas não tubulinas tem sido amplamente investigado e estão entre a primeira linha de quimioterápicos para um amplo espectro de cânceres.

Palavras chaves: Ciclo celular; produtos Biológicos; leucemias; expressão gênica; terapia de alvo molecular.

Regulation of cell cycle control gene expression in acute myeloid leukemia (kg-1) cell line: target characterization of a new drug

Abstract

Alterations in the cell cycle control mechanism led to uncontrolled proliferation, invasion, and metastasis, which are key features in cancer development. Additionally, abnormal differentiation during the division cycles of hematopoietic stem/progenitor cells is a hallmark of oncohematologies such as leukemias. Chemotherapeutic agents that act on the "negative" control of the cell cycle, called "cyclo-specific drugs", have been shown to be effective tumor agents in cells that are constantly dividing. The natural isoflavonoids present important biological activities such as antifungal, antibacterial, insecticidal and antitumoral. The present study sought to evaluate the cytotoxic profile (*in vitro*) of an isoflavonoid against a panel of leukemic cell lines and to determine its ability to modulate the expression of genes involved in the cell cycle. The antiproliferative profile of the compound was evaluated using the MTT method. The blocking profile in the cell cycle phase was evaluated by flow cytometry and the gene expression profile was done by the real-time PCR technique. The compound showed antiproliferative potential in all leukemic cell lines tested, where the IC₅₀ ranged from 0.41 (EMP ± 0.13) to 7.51 (EMP ± 0.29) μM. The HL-60 (CI₅₀ = 0.41 μM - EMP ± 0.13) and KG-1 (CI₅₀ = 1.0 μM – EMP ± 0.09) strains showed higher sensitivity to the compound, respectively. Treatment with the isoflavonoid led to blockade of cell division in the G2/M phase at all tested times (12, 24 and 48h, p<0.0001) when compared to the drug-free negative control. Furthermore, during all times of treatment with the compound, several changes in the morphology of KG-1 cells were observed, such as an increase in the number of vacuoles, reduction of nuclear content and formation of plasma membrane "blebs". The results of *CEP55*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20* and *ATM* gene expression after 12 and 24 hours of incubation showed that the compound significantly reduced *AURKB* gene expression (p<0.02) only at 24 hours, when compared to the untreated negative control. The results presented confirmed that the isoflavonoide evaluated had an antiproliferative and cytotoxic profile, showing blockade in G2/M, corroborating other studies that had already demonstrated its arrest profile during this phase of the cell cycle. The isoflavonoids tested seem to act in the inhibition of the *AURKB* gene, with no effects on the other genes evaluated. The auroras kinases have a critical role in cell division, acting in the mechanisms of chromosome alignment, mitotic spindle formation, and cytokinesis. The modulation of this gene represents an important target in anticancer therapy considering the widely investigated group of non-tubulin antimitotic drugs are among the first line chemotherapies for a wide spectrum of cancers.

Keywords: Cell cycle; Biological Products; leukemias; gene expression; molecular targeted therapy.

Lista de Figuras

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de cânceres mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma, na população brasileira.	18
Figura 2: Carcinogênese: processo de iniciação, desenvolvimento e progressão do câncer.	19
Figura 3: Características do câncer.	21
Figura 4: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens e mulheres, estimadas para o ano de 2020, segundo Unidade da Federação.	22
Figura 5: Descrição das fases do ciclo celular. A figura mostra o processo de divisão celular de acordo com a ordem de suas fases, onde o genoma é duplicado durante a fase S e dividido em duas cópias originais para as células filhas durante a mitose.	27
Figura 6: Representação de drogas antitumorais que atuam especificamente no ciclo celular (ciclo- celular específicas).	35
Figura 7: Representação dos grupos químicos de pterocarpanos.	36
Figura 8: Desenho experimental descrevendo o fluxo deste trabalho.	40
Figura 9: Curva de ação antiproliferativa do PTC+ em linhagem de leucemia mieloide aguda (KG-1) após incubação por 24 e 72 horas.	47
Figura 10: Imagem da morfologia das células KG-1 após 12 horas de incubação com o composto PTC+, coradas com kit panótico rápido. Células visualizadas por microscopia óptica no aumento de 20X. A figura (A) mostra as células controle negativo. A figura (B) mostra as células tratadas com PTC+ na concentração de 1,5 µM.	47
Figura 11: Imagem da morfologia das células KG-1 após 24 horas de incubação com o composto PTC+, coradas com kit panótico rápido. Células visualizadas por microscopia óptica no aumento de 20X. A figura (A) mostra as células controle negativo. A figura (B) mostra as células tratadas com PTC+ na concentração de 1,5 µM.	48
Figura 12: Imagem da morfologia das células KG-1 após 48 horas de incubação com o composto PTC+, coradas com kit panótico rápido. Células visualizadas por microscopia óptica no aumento de 20X. A figura (A) mostra as células controle negativo. A figura (B) mostra as células tratadas com PTC+ na concentração de 1,5 µM.	48
Figura 13: Influência do PTC+ sobre o ciclo celular das células de linhagem de leucemia mieloide aguda (KG-1) após incubação por 12 horas.	50
Figura 14: Influência do PTC+ sobre o ciclo celular das células de linhagem de leucemia mieloide aguda (KG-1) após incubação por 24 horas.	50

Figura 15: Influência do PTC+ sobre o ciclo celular das células de linhagem de leucemia mieloide aguda (KG-1) após incubação por 48 horas.	51
Figura 16: Efeito do PTC+ (1,5 μ M) sobre as fases do ciclo celular em células de leucemia mieloide aguda (KG-1) após (A)12, (B)24 e (C)48 horas, respectivamente, de incubação, determinado por citometria de fluxo, utilizando iodeto de propídeo.	52
Figura 17: Padrão da expressão dos genes <i>CEP55</i> , <i>AURKB</i> , <i>MAD2</i> , <i>CDC20</i> e <i>ATM</i> em linhagem de leucemia mieloide aguda (KG-1) após incubação com o composto PTC+ nos tempos de 12 e 24 horas, respectivamente (A e B).	54
Figura 18: Resultado da busca no database STRING de redes de interações proteína-proteína PPI associada à <i>AURKB</i> . A espessura da linha indica a força do suporte de dados.....	55

Lista de Tabelas

Tabela 1: Linhagens utilizadas com suas respectivas origens e concentrações de plaqueamento.	41
Tabela 2: Avaliação de inibição da proliferação <i>in vitro</i> do PTC (+) em linhagens tumorais de leucemia humana após 72 horas de incubação. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo deste ensaio.	45
Tabela 3: Avaliação de inibição da proliferação <i>in vitro</i> do PTC (+) em linhagens de leucemia mieloide aguda (KG-1) após 24 horas de incubação. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo deste ensaio.....	46

Lista de Siglas e Abreviaturas

%: Porcentagem

®: Marca registrada

°C: Grau Celsius

µg: Micrograma

µL: Microlitro

µM: Micromolar

5-FU: 5-fluorouracil

ANOVA: Análise de variância (Analysis of variance)

APC: Complexo Promotor de Anáfase

AT: Ataxia telangiectasia

ATM: Serina-treonina quinase mutada

AURKA: Aurora quinase A

AURKB: Aurora quinase B

AURKC: Aurora quinase C

BSA: Albumina de soro bovino (Bovine Serum Albumin)

CCM: Complexo de checagem mitótico

CDC20: Homólogo do ciclo de divisão celular 20

CDKs: Quinases dependentes de ciclina (cyclin dependent kinases)

Céls.: Células

CEP55: Proteína centrossomal de 55 kDa

Chck2: Ponto de checagem quinase 2 (Checkpoint kinase 2)

CTHs: Células tronco hematopoiética

DDR: Resposta a danos no DNA

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNMT3A: DNA methyltransferase 3 alpha

DOX: Doxorrubicina

DRM: Doença residual mínima

DSBs: Quebras na dupla fita de DNA (DNA double strand)

E.P.M: Erro padrão da média

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

ESCRT: Complexo de classificação endossômica requerido para o transporte celular

FDA: Agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos (Food and Drug Administration)

IC₅₀: Concentração inibitória (Inhibitory concentration)

INCA: Instituto Nacional do Câncer (National Cancer Institute)

INCENP: Proteína interna do centrômero (Inner Centromere Protein)

IR: Radiação ionizante

KB: Carcinoma nasofaríngeo humano

LLA: Leucemia linfocítica aguda

LLC: Leucemia linfocítica crônica

LMA: Leucemia mieloide aguda

LMC: Leucemia mieloide crônica

LOE: Laboratório de oncologia experimental

LOE: Laboratório de Oncologia Experimental

mg: Miligrama

mL: Mililitro

mM: Milimolar

MTT: 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio

nL: Nanolitro

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: Solução salina tamponada com fosfato - Phosphate Buffer Solution

PIKKs: Fosfatidilinositol-3 quinase

PLKs: Polo-Like-Kinases

PTC (-): 2,3,9 trimetoxipterocarpano enantiômero negativo

PTC (+): 2,3,9 trimetoxipterocarpano enantiômero positivo

PTC (+/-): 2,3,9 trimetoxipterocarpano mistura racêmica

PTC: 2,3,9 trimetoxipterocarpano

PTC: Pterocarpano

RNA: Ácido ribonucléico

DNA: Ácido desoxirribonucleico

RNA_m: RNA mensageiro

RPM: Rotações por minuto

RUNX1/AML1: Fator de transcrição 1 da família RUNX

SBF: Soro Bovino fetal;

UFC: Universidade Federal do Ceará

UV: Ultravioleta

v/v: Volume per volume

Sumário

1. Introdução.....	18
1.1 Câncer: conceito, estimativa e aspectos gerais da carcinogênese	18
1.2 Leucemia Mieloide Aguda: estimativa, aspectos gerais e tumorigênese	21
1.3 Ciclo celular, carcinogêneses e drogas ciclos específicos	24
1.3.1 Fases, vias bioquímicas de reguladores e pontos de checagem (<i>checkpoints</i>) do ciclo celular	25
1.3.2 Principais genes relacionados ao reparo de danos ao DNA.....	28
1.3.3 Principais genes relacionados ao ponto de checagem mitótico	29
1.3.4 Principais genes relacionados ao fuso mitótico	31
1.3.4.1 Proteína centrossomal de 55 kDa (CEP55).....	31
1.3.4.2 Auroras quinases (AURK).....	32
1.4 Produtos naturais como potenciais moléculas antitumorais.....	33
1.4.1 Pterocarpanos	35
2. Relevância e Justificativa	37
3. Objetivos	38
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos Específicos.....	38
4. Materiais e Métodos	39
4.1 Desenho experimental	39
4.2 Síntese, obtenção e isolamento dos compostos testados no presente estudo.	40
4.3 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	41
4.3.1 Linhagens celulares	41
4.3.2 Manutenção das linhagens celulares	41
4.3.3 Avaliação do efeito citotóxico e seletivo do PTC+ utilizando o ensaio do MTT	42
4.4 Avaliação das alterações morfológicas por coloração com panótico rápido.....	43
4.5 Citometria de fluxo.....	43
4.6 Expressão genica por qPCR	43
4.7 Análise estatística.....	44
5. Resultados	44
5.1 Avaliação da atividade antiproliferativa dos compostos PTC+ em linhagens de células leucêmicas e células não tumorais <i>in vitro</i>	44

5.1.1	Avaliação da atividade antiproliferativa do composto PTC+ em linhagem de leucemia mieloide aguda (KG-1) nos tempos de 24 e 72 horas.	46
5.2	Avaliação das alterações morfológicas da linhagem KG-1 após tratamento com o PTC+47	
5.3	Influência do PTC+ sobre o ciclo celular das células de leucemia mieloide aguda (KG-1). 49	
5.3.1	Influência do PTC+ na modulação da expressão de genes relacionados ao ciclo celular das células de leucemia mieloide aguda (KG-1).....	53
5.3.2	Predição <i>in silico</i> de interações proteicas associados a AURKB.....	54
6.	Discussão.....	55
7.	Perspectivas futuras.....	64
8.	Conclusão.....	64
9.	Referências Bibliográficas	64

1. Introdução

1.1 Câncer: conceito, estimativa e aspectos gerais da carcinogênese

O câncer é uma doença complexa, heterogênea e multifatorial caracterizado principalmente pelo crescimento celular descontrolado e potencial capacidade de invasão à tecidos adjacentes e órgãos distantes (INCA, 2020). De acordo com Instituto Nacional do Câncer (INCA) 2020, existem mais de 100 tipos de câncer com diversas alterações genética e/ou epigenética, com variadas características histológicas e diferentes respostas clínicas que dificultam a compreensão dos mecanismos envolvidos na carcinogênese e na identificação de terapias assertivas (INCA, 2020; DARWICHE N, 2020).

O surgimento de neoplasias malignas tem crescido de forma progressiva, tornando o câncer um problema de saúde pública não só no Brasil, mas também no mundo, sendo uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos e a segunda maior causa em países em desenvolvimento. A mais recente estimativa mundial, do ano de 2018, mostra que ocorreram cerca de 18 milhões de novos casos de câncer e aproximadamente 9,6 milhões de óbitos pela doença (BRAY *et al.*, 2018). Para o Brasil, a estimativa aponta que para cada ano do triênio 2020-2022 ocorrerão 625 mil casos novos de câncer. O câncer de pele não melanoma será o mais incidente na população brasileira (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (Figura 1) (INCA, 2020; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022).

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de cânceres mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma, na população brasileira.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

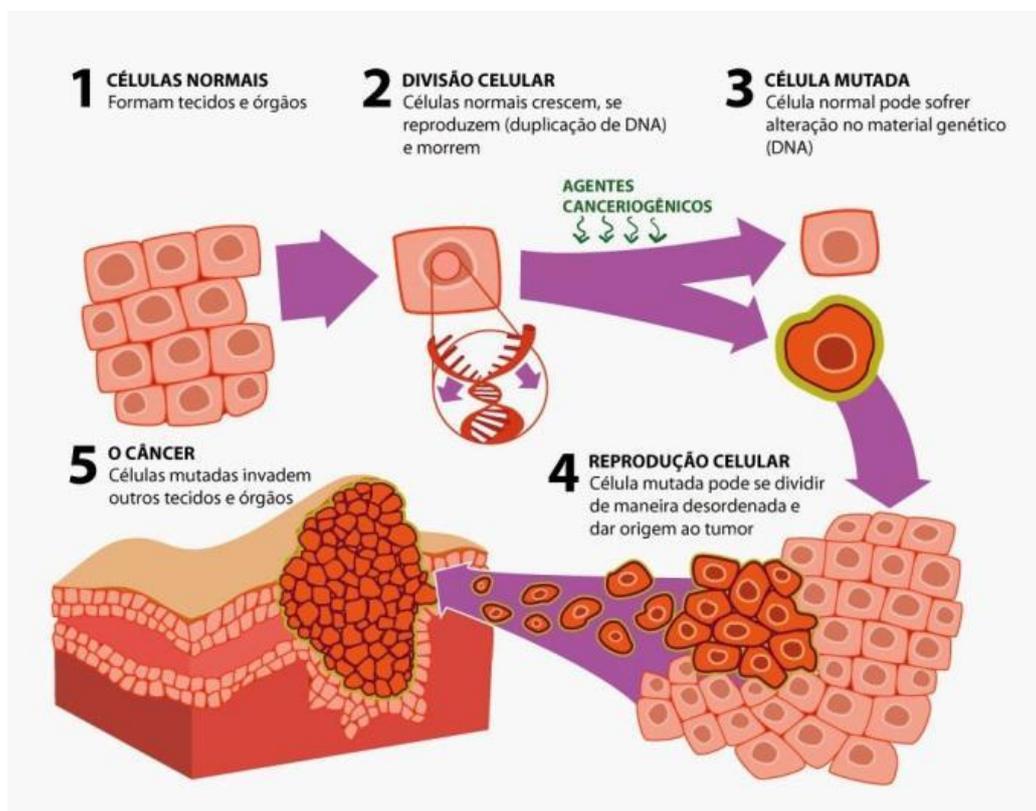
*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2020

O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese ou oncogênese e trata-se de um processo complexo, podendo ser iniciado por uma variedade de eventos, dos

quais os efeitos cumulativos de diferentes agentes cancerígenos ou carcinógenos (radiação ultravioleta – UV ou irradiação, agentes intercalantes de DNA e outros) são os responsáveis pelo início, promoção e progressão do tumor (INCA, 2021). O processo de iniciação da carcinogênese é resultado de alterações genética e/ou epigenéticas que levam a proliferação anormal de uma única célula, devido essa anormalidade ocorre o crescimento de uma população de células tumorais derivadas de um clone inicial (Figura 2). A progressão tumoral se dá devido as mutações adicionais que ocorrem dentro da população de células neoplásicas (Geoffrey M Cooper, 2000). Muitas dessas mutações estão relacionadas aos oncogenes e/ou genes supressores tumorais (Bell Daphne W, 2010). Os Proto-Oncogene ao sofrerem mutações tornam-se oncogenes, os quais são responsáveis por conferir vantagens nos processos de proliferação e sobrevivência da célula tumoral. Diferente dos oncogenes, os genes supressores tumorais atuam principalmente controlando o ciclo celular e o processo de morte celular programada (apoptose). Quando os genes supressores tumorais sofrem mutações permitem que as células cresçam descontroladamente, levando ao aumento da população celular mutada e a migração dessa população para outros tecidos e/ou órgãos ocasionando a metástase celular (Kontomanolis, Emmanuel N. *et al*, 2020).

Figura 2: Carcinogênese: processo de iniciação, desenvolvimento e progressão do câncer.



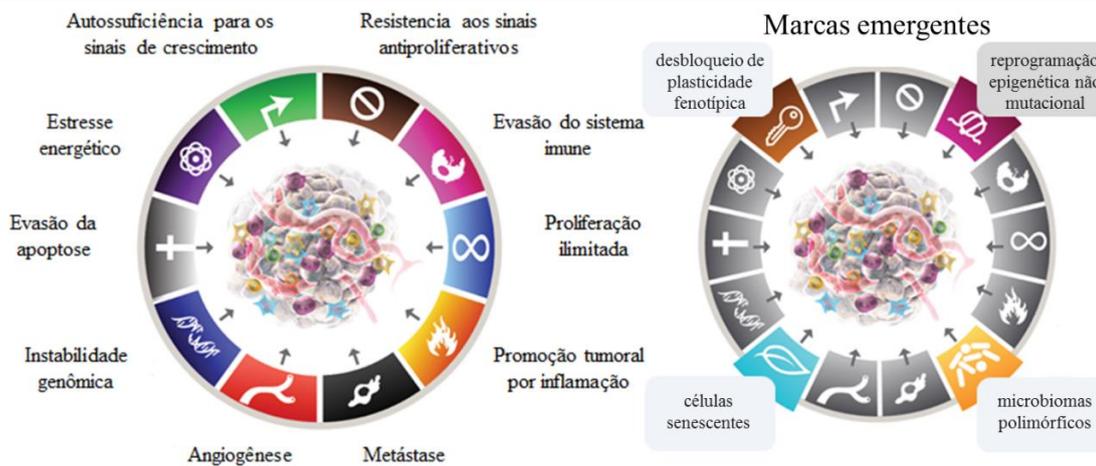
Fonte: Helioangotti.com.br 2018.

As células cancerígenas diferem das células normais em vários aspectos, Hanahan e Weinberg descreveram um conjunto de capacidades funcionais das quais as células neoplásicas adquirem ao longo da sua transformação maligna, essas características são chamadas de “*Hallmarks of cancer*” ou marcas registradas do câncer (Hanahan D., Weinberg RA, 2000).

As “*Hallmarks of cancer*” ou marcas registradas do câncer, foram descritas pela primeira vez em 2000. A princípio Hanahan e Weinberg apontaram seis principais características funcionais adquiridas pelas células à medida que passavam por processos de transformação neoplásicas. Mais tarde em 2011, foram adicionadas outras características consideradas emergentes e/ou habilitantes junto as marcas iniciais do câncer, sendo elas: sustentação da sinalização proliferativa, insensibilidade aos supressores de crescimento, resistência a morte celular, replicação descoordenada, acesso a vasculatura, aumento da invasão celular e metástase, reprogramação do metabolismo celular e fuga da destruição pelo sistema imune (Hanahan D., Weinberg RA, 2000; Hanahan D., Weinberg RA, 2011).

Por mais abrangente e diversa, as “marcas” mencionadas acima, não compreendem completamente a complexidade dos mecanismos moleculares e celulares que estão por trás do processo de evolução das células pré-neoplásicas e sua capacidade de desenvolver os fenótipos aberrantes no curso da doença. Para tal, novos conceitos foram adicionados para descrever as características funcionais e/ou habilitantes que podem, ao longo do tempo, ser incorporados como componentes centrais dessas marcas em células tumorais, sendo elas: desbloqueio da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos e senescência celular. (Figura 3) (Hanahan D., Weinberg RA, 2022).

Figura 3: Características do câncer.



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2022.

1.2 Leucemia Mieloide Aguda: estimativa, aspectos gerais e tumorigênese

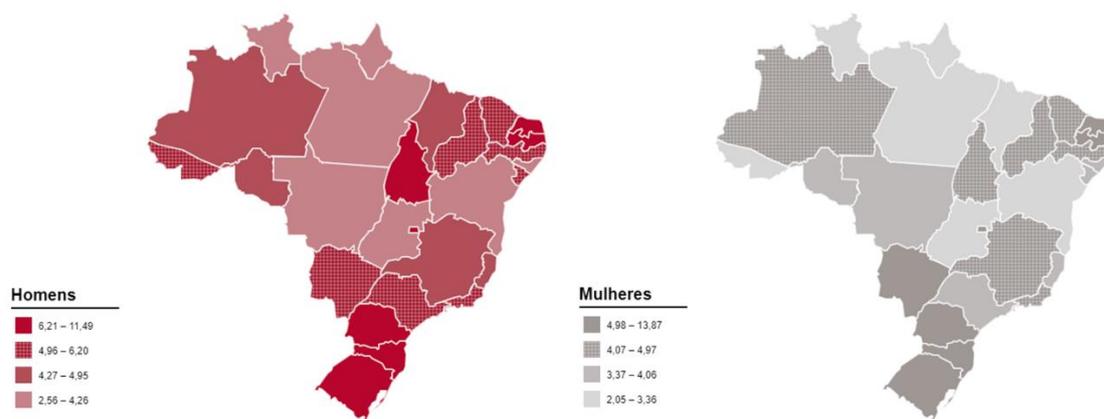
De acordo com o INCA (2022), as leucemias são descritas como uma doença maligna, geralmente, de origem desconhecida e tem como principal característica o acúmulo de células doentes na medula óssea, que substituem as células sanguíneas normais (INCA, 2022). Existem vários tipos de leucemia, que são denominados de acordo com a rapidez de sua evolução e do tipo de célula afetada. Basicamente são classificadas em quatro grupos primários, sendo eles: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA) e leucemia linfocítica crônica (LLC) (INCA, 2022).

Dentre as leucemias, a mieloide aguda (LMA) encontra-se entre as formas mais grave e pior prognóstico. A LMA é a leucemia mais comum na população adulta e representa cerca de 80% de todos os casos de leucemias. Um estudo feito pelo observatório de oncologia (2021) mostrou que foram identificados 63.452 óbitos por leucemia no Brasil. Do total de óbitos, o subtipo mais frequente foi LMA (36%), corroborando com os dados de prevalência global. O INCA aponta que para cada ano, entre 2020 e 2022, sejam diagnosticados 10.810 novos casos de leucemias no Brasil, sendo 5.920 em homens e 4.890 em mulheres (Figura 4) (INCA, 2020).

A LMA é uma doença heterogênea e complexa, caracterizada por uma transformação clonal das células tronco hematopoiéticas que perdem a capacidade de diferenciação e correta hematopoiese, o que resulta no acúmulo de células imaturas (blastos)

com função e proliferação celular anormais (ARBER; ORAZI; HASSERJIAN; THIELE et al., 2016). A transformação maligna da LMA geralmente ocorre nas células-tronco pluripotentes onde o resultado de inúmeras alterações genéticas e epigenéticas se relacionam de forma cumulativa afetando genes que regulam vias importantes para o crescimento e diferenciação celular (VAKITI; MEWAWALLA, 2020). A LMA é caracterizada por citopenias no hemograma da maioria dos pacientes, os quais apresentam fadiga, sangramento, febre e infecções que geralmente estão associados à eritropenia, plaquetopenia e diminuição dos leucócitos funcionais no sangue periférico (LAGUNAS-RANGEL; CHÁVEZ-VALENCIA; GÓMEZ-GUIJOSA; CORTES-PENAGOS, 2017).

Figura 4: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens e mulheres, estimadas para o ano de 2020, segundo Unidade da Federação.



Fonte: INCA, 2021.

A maioria dos casos de LMA são caracterizados pela aquisição de mutações nas célula-tronco hematopoiéticas de etiologia idiopática na maioria dos casos (STROM; OUM; ELHOR GBITO; GARCIA-MANERO et al., 2012), porém, alguns fatores de risco, como exposição à radiação, quimioterapia (ROSNER; GRÜNWARD, 1983), exposição ao Benzeno (CICCONE; MIRABELLI; LEVIS; GAVAROTTI et al., 1993; HAYES; SONGNIAN; DOSEMECI; LINET, 2001) e derivados (LEONE; FIANCHI; PAGANO; VOSO, 2010) podem predispor à doença. A LMA também pode evoluir a partir distúrbios mieloproliferativos (DPM), síndrome mielodisplásica (SMD), hemoglobinúria paroxística noturna e anemia aplástica (HARTMANN; METZELER, 2019).

Devido seu perfil heterogêneo, a investigação molecular através de análise imunofenotípica e citogenética são essenciais para o diagnóstico da LMA e podem prever o prognóstico e estratégias terapêuticas específicas para cada subtipo da doença. Dentre as

alterações cromossômicas, as translocações t(8;21), t(15;17) e t(16;16) e inversão inv(16), são características de melhor prognóstico. Pacientes com deleções/monossomia dos cromossomos 5 e 7, principalmente após uso de agentes alquilantes, possuem prognóstico desfavorável assim como os pacientes com cariótipo complexo, ou seja, três ou mais alterações na mesma metáfase (GRIMWADE; HILLS; MOORMAN; WALKER et al., 2010; GULLEY; SHEA; FEDORIW, 2010; HAFERLACH; ALPERMANN; SCHNITTGER; KERN et al., 2012; SCHWIND; EDWARDS; NICOLET; MRÓZEK et al., 2013).

Demais alterações genéticas, mutações, deleções e polimorfismos em genes que regulam a hematopoese são frequentemente encontradas em pacientes com LMA. O gene *RUNX1*, também conhecido como *AML1*, é um fator de transcrição responsável pelo controle da expressão de diversos genes, e mutações que afetam esse gene estão relacionado com diversos tipos de leucemias, incluindo a LMA. Translocações cromossômicas entre o *RUNX1*, localizado no cromossomo 21 e o gene *ETO*, localizado no cromossomo 8, criam um complexo *AML1-ETO* ou t(8;21) (q22;q22) que é observado em aproximadamente 12% dos casos de leucemia mieloide aguda estando ainda associado a resistência à certos tipos de terapia de indução padrão da doença (HARTMANN; METZELER, 2019).

Além dos fatores descritos acima, a reprogramação epigenética aberrante das células tronco hematopoiéticas (CTHs) também estão entre as causas de LMA e resistência a fármacos convencionais (VAN GILS; DENKERS; SMIT, 2021). Alterações no padrão de metilação do DNA estão entre os mecanismos estudados na patogênese da LMA, os quais atuam ativando ou silenciando genes importantes do controle do crescimento celular e transformação neoplásica (BEJAR; LEVINE; EBERT, 2011; ISSA, 2013). Na LMA, o padrão de metilação apresenta relevância no perfil clínico e prognóstico do paciente (MELNICK, 2010). As alterações relacionadas as enzimas DNA metiltransferases são recorrentes na LMA, sendo identificadas cerca de 6% a 36% de mutações no gene *DNMT3A* resultando em uma enzima truncada ou incompleta pela adição de um códon de parada antes da formação do polipeptídeo funcional (LAGUNAS-RANGEL; CHÁVEZ-VALENCIA; GÓMEZ-GUIJOSA; CORTES-PENAGOS, 2017).

As abordagens terapêuticas para pacientes com LMA vêm avançando com aprovação de novos fármacos incluindo os inibidores de quinase multidirecionado (Imatinibe, Ibrutinib e Cabozantinib) (BHULLAR S, et al., 2018), quimioterapias citotóxicas (Paclitaxel, Docetaxel e Doxorubicina) (XU, Yaohui G. et al., 2020), imunoterapia isolada (Imunoterapia) (WALDMAN, et al., 2020) e conjugada a fármacos (SHORT; RYTTING;

CORTES, 2018). A primeira linha de tratamento referente a LMA é a quimioterapia de indução, que tem como principal objetivo alcançar a remissão completa da doença. O tratamento consiste no que é chamado de “7+3”, onde o paciente recebe uma infusão contínua de citarabina por sete dias junto com antraciclina nos dias 1 a 3. Estudos mostram que essa intervenção é favorável a pacientes mais jovens e pacientes com prognóstico intermédio, porém, pacientes mais velhos que estão sujeitos a diversos tipos de comorbidades estão limitados à terapia intensiva por indução (LAGUNAS-RANGEL; CHÁVEZ-VALENCIA; GÓMEZ-GUIJOSA; CORTES-PENAGOS, 2017; SHORT; RYTTING; CORTES, 2018). Apesar de grandes esforços na busca de marcadores moleculares e na compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da LMA, as alterações nas vias envolvidas na etiologia da doença, bem como a atuação de diferentes medicamentos no combate à doença ainda são campos vastos a serem explorados (FEINBERG, ANDREW P; OHLSSON, ROLF; HENIKOFF, STEVEN, 2006).

A principal problemática das intervenções terapêuticas da LMA é que apesar de muitos pacientes apresentarem a remissão após uma ampla variedade de tratamentos, algumas células neoplásicas residuais ainda permanecem, podendo evoluir para a recorrência e posteriormente metástase (VAN GILS, 2021). Grande parte das causas de recidiva é originada de uma pequena subpopulação de células leucêmicas resistentes à terapia (doença residual mínima, DRM), na qual são consideradas responsáveis pela reinicialização do tumor (VAN GILS, 2021). Outro fator crítico na resistência terapêutica da LMA se refere a expansão ilimitada por meio de uma sequência interminável de ciclos de divisão celular e anulação de pontos de restrição. Uma série de mutações conferem vantagem proliferativa ou de sobrevivência às células blásticas. Dessa forma, interação de vias proliferativas e de diferenciação desreguladas na LMA resulta na instabilidade genética através da perturbação da resposta ao dano do DNA, imprecisões durante a replicação e segregação cromossômica na mitose, o que lhes permite expandir ainda mais rapidamente e se adaptar a um ambiente variável (GHELLI LUSERNA DI RORA, *et al.*, 2017; ALEEM E; ARCECI J, 2015).

1.3 Ciclo celular, carcinogêneses e drogas ciclos específicos

Alterações nos mecanismos de controle do ciclo celular podem levar ao acúmulo e propagação de danos ao DNA devido a perda dos mecanismos de correção de dano e morte celular programada. No câncer o comprometimento das vias de respostas aos danos no DNA e o enfraquecimento aos pontos de verificação aumentam o risco inerente e abrem o caminho

para outras aberrações genéticas que promovem a progressão da doença (Deguchi K & Gilliland DG, 2002).

No decorrer dos últimos anos, inúmeros estudos pré-clínicos têm confirmado a eficácia de diferentes inibidores de *checkpoint* do ciclo celular contra diferentes tipos de tumores hematológicos, como agente único ou em combinação com um grande número de drogas (National Cancer Institute – NCI, 2000). Existe um número considerável de drogas na clínica utilizadas no tratamento do câncer que atuam diretamente sobre o ciclo celular. Estes agentes, denominados “fármacos ciclo-específicos”, mostram-se mais efetivos contra células que estão em constante divisão celular. Dentre eles, encontram-se: os agentes alquilantes (carboplatina, cisplatina e oxaliplatina) que se ligam ao DNA, levando à morte celular por dano ao material genético; os taxanos que atuam na fase de mitose, interferindo na formação do fuso mitótico; o metotrexato e o 5-fluorouracil (5-FU), que interferem na síntese de DNA impedindo a passagem das células pela fase S; e a doxorubicina que atua sobre as topoisomerasas, induzindo parada de ciclo celular na fase G2/M. (NCI, 2000; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; KATZUNG; TREVOR, 2017).

A compressão dos mecanismos moleculares de interferência da maquinaria do ciclo celular das células neoplásicas tem auxiliado na busca por compostos que atuem na inibição da divisão celular, como os agentes antimitóticos, importantes agentes quimioterápicos na terapia contra o câncer.

1.3.1 Fases, vias bioquímicas de reguladores e pontos de checagem (*checkpoints*) do ciclo celular

Nos organismos eucariotos a dinâmica do ciclo celular é extremamente complexa e consiste em quatro eventos distintos, sendo eles: crescimento celular, replicação do DNA, distribuição dos cromossomos duplicados às células filhas e divisão celular (Figura 5). A progressão desses eventos é controlada por uma rede bioquímica que sinaliza suas execuções e a comunicação entre eles. A principal rede de proteínas que impulsionam a progressão do ciclo celular são as quinases dependentes de ciclina (CDKs). (Cooper, M. G, 2000).

A fase G0 (inativa), ou chamada de fase de repouso, é a fase na qual a célula permanece indefinitivamente na interfase, devido a uma alta densidade celular ou falta de agentes mitógenos. Durante essa etapa a célula não está em processo de divisão ou mesmo se preparando para dividir-se (estágio quiescente). A literatura descreve que durante esse

estágio a célula mantém-se efetuando manutenções de suas outras funções (Willians *et al.*, 2012).

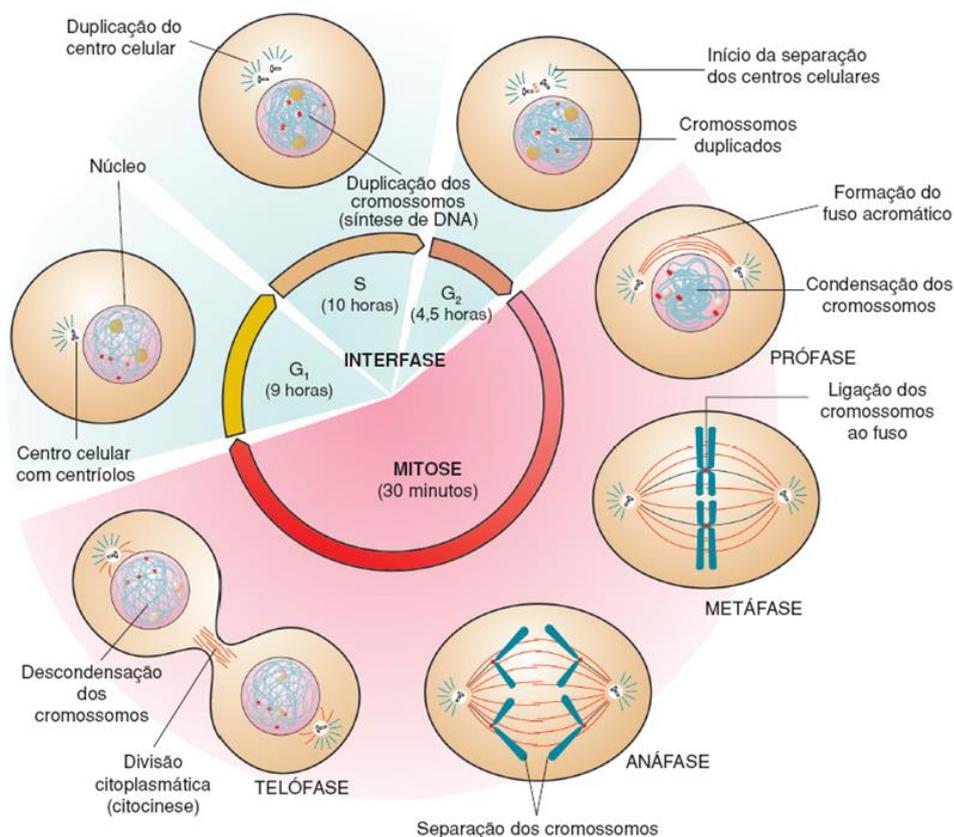
A maioria das células eucarióticas, iniciam o ciclo celular na fase G1 (interfase), caracterizada por ser a de maior durabilidade frente as outras fases. Além disso, durante esse estágio do ciclo celular a célula cresce devido a síntese de biomoléculas, como proteínas e lipídios (mas ainda não o DNA), e quase duplica seu tamanho original (NORBUDY; NURSE, 1992; VERMEULEN *et al.*, 2003).

A fase seguinte do ciclo celular é descrita como fase “S” (fase de síntese), e é durante essa etapa que todo o genoma celular é duplicado. Para tal, a progressão da fase G1 para S depende da atividade das CDKs. A fosforilação da proteína do retinoblastoma (RB) pelo complexo ciclina D/CDK 4/6 e ciclina E/CDK 2, ativa os fatores de transcrição E2F induzindo a transcrição das proteínas da fase S. (OTTO; SICINSKI., 2017; BERTOLI, C *et al.*, 2013). Após o processo de duplicação de DNA, pelo processo de polimerização dirigida pela fita molde durante a fase S, a célula entra na fase G2 (CERVEIRA *et al.*, 2012).

A fase G2 (interfase) é o momento no qual as células se preparam para a subsequente segregação de DNA para as duas células filhas em desenvolvimento, o que chamamos de mitose. Durante essa fase ocorre a síntese de proteínas específicas da referida fase, ou seja, a célula começa a se adaptar para o processo de divisão propriamente dito (mitose) (RUCHAUD, S; CARMENA, M; EARNSHAW, W C., 2007).

A última fase do ciclo celular é a fase M (mitose e citocinese). Essa fase é descrita como o período mais críticos durante o ciclo celular devido ao fato de que a célula precisa separar seu genoma e distribuir uma cópia completa do genoma original para as duas células filhas em desenvolvimento, sendo esse processo coordenado pela citocinese (RUCHAUD, S; CARMENA, M; EARNSHAW, W C., 2007). Essa fase é caracterizada pelas seguintes etapas: condensação cromossômica, formação do fuso mitótico e fixação dos cromossomos aos microtúbulos do fuso; seguidos pela separação das cromátides irmãs para os polos opostos da célula e o reestabelecimento nuclear (Geoffrey M Cooper, 2000; Rieder; Khodjakov, 2003).

Figura 5: Descrição das fases do ciclo celular. A figura mostra o processo de divisão celular de acordo com a ordem de suas fases, onde o genoma é duplicado durante a fase S e dividido em duas cópias originais para as células filhas durante a mitose.



Fonte: Adaptado de Ruchaud *et al*, 2007.

O processo de divisão celular é estritamente regulado para manter a estabilidade cromossômica, e garantir a separação correta dos cromossomos entre duas células filhas (LONDON E BIGGINS, 2014; CHEN E LIU, 2015; CHEN E LIU, 2016). Para tal, existem rigorosos agentes que regulam criteriosamente a progressão desses eventos através do ciclo. Os sinais mitogênicos induzem a entrada das células na fase G₁ do ciclo celular, que por sua vez, ativam os as primeiras vias de sinalização. Pelo menos 9 CDKS (CDK 1– CDK 9) e inúmeras ciclinas (ciclina A–ciclina T) são descritas na literatura. Os complexos CDK/ciclina são ativados por fosforilação.

A regulação por esses complexos é específica de cada etapa: ciclina D e E é sintetizada durante a fase G₁; altos níveis de ciclina A encontram-se durante a fase S; enquanto a ciclina B tem seus níveis celulares presentes durante as fases G₂/M. As principais CDKs envolvidas durante as etapas de regulação são representadas pelas CDK1, CDK2, CDK4 e CDK 6, as quais são ativadas formando um complexo com as ciclinas A, B, D e E.

Além destes, estão presentes os inibidores de quinase dependentes de ciclina (CKIs), que são reguladores negativos de CDKs (ALBERTS et al., 2010; ALEEM; ARCECI, 2015; OTTO; SICINSKI, 2017; WEINBERG, 2013; OTTO; SICINSKI., 2017). No geral, os níveis de CDKs permanecem relativamente constantes ao longo do ciclo celular, porém, sua atividade e de suas proteínas alvos mudam à medida que os níveis das ciclinas aumentam e/ou diminuem. Quando os agentes mitógenos sinalizam a entrada em G1 através da via RAS/RAF/MAPK ocorre à produção do complexo ciclina D/CDK 4/6 que fosforila o retinoblastoma (Rb) na qual ativa os fatores de transcrição E2F, esse por sua vez transcreve as proteínas da fase S (OTTO; SICINSKI, 2017; WEINBERG, 2013). O complexo CDK2/ciclina A regula a progressão através da fase S e o complexo CDK1/ciclina A regula a progressão através da fase G2 em preparação para a mitose (ALEEM E; ARCECI J, 2015).

Além destas vias bioquímicas de reguladores, a progressão ordenada através do ciclo também é composta pelos pontos de controle ou “*checkpoints*”. Os pontos de verificação atuam como sinalizadores que dão ao ciclo celular sua notável fidelidade e garantem o desenvolvimento normal e a homeostase do tecido. (Hartwell; Weinert, 1989). Existem vários pontos de checagem, mas os três mais importantes são: ponto de checagem em G1 é referente ao crescimento, potenciais limitações espaciais e integridade do genoma (ocorre durante a transição G1/S); o ponto de checagem em G2 garante a duplicação correta do material genético original (ocorre durante transição G2/M); e o último ponto de checagem é referente ao fuso mitótico, no qual ocorre o monitoramento da ligação e a segregação cromossômica durante a mitose (ocorre durante a transição de metáfase para anáfase) (Falck J et al., 2001; Mailand N et al., 2000; Xiao Z et al., 2003).

1.3.2 Principais genes relacionados ao reparo de danos ao DNA

Em resposta a uma serie diversificada de lesões ao DNA, as células montam uma rede de resposta a danos no DNA (DDR) visando manter a integridade do genoma (JACKSON & BARTEK, 2009). As lesões ao DNA, como quebra de fita dupla, são eventos chaves que ativam as DDRs, que por sua vez ativam uma rede de sinalização celular de reparo ao DNA, pontos de verificação do ciclo celular e aumento da modulação de genes e vias metabólicas celulares (CICCIA & ELLEDGE, 2010).

Codificada pelo gene *ATM*, a ataxia telangiectasia (AT) serina-treonina quinase mutada (ATM), é uma serina/treonina quinase e um dos seis membros das quinases relacionadas à fosfatidilinositol-3 quinase (PIKKs). A ATM é o transdutor primário de

resposta ao dano de quebra de fita dupla do DNA. Uma vez ativa, a ATM é capaz de fosforilar vários substratos que estão envolvidos no *checkpoint* do ciclo celular, no reparo de DNA e em diversos processos celulares (Paull, 2015).

Alterações no ATM acarreta na predisposição de doenças, como sua perda funcional na doença Ataxia Telangiectasia (AT), também conhecida como síndrome de *Louis-Barr*, causada por mutações hereditárias no gene *ATM*. A síndrome de *Louis-Barr* é uma doença autonômica recessiva rara caracterizada por deficiência imunológica, hipersensibilidade à radiação ionizante (IR) (Perlman S, Sara B e Richard A, 2003). Reed WB e colaboradores (1966) observou que pacientes com síndrome AT tem uma maior predisposição para adquirir malignidades hematológicas, sendo a causa mais frequente de mortes de pacientes portadores de AT (PERLMAN S, *et al.*, 2003). Outro estudo indicou que os alelos *ATM* defeituosos têm uma relação direta em uma variedade de casos de câncer de mama familiar e câncer colorretal (PROKOPCOVA J, *et al.*, 2007; GAO Y, *et al.*, 2011).

É importante ressaltar que a maquinaria de checagem do ciclo celular juntamente com os mecanismos e vias de reparo à danos no DNA são importantes para preservar a informação genética e transmitir informações genéticas intactas para as gerações subsequentes. Em contrapartida, a persistência de danos no DNA aumenta a taxa de possíveis mutações podendo levar a ativação de vias de morte celular programada, como a apoptose (Hoeijmakers, 2001). O uso de moléculas que inibem o reparo de DSBs, vem ganhando destaque na comunidade científica, na busca por drogas com potencial alvo específicos ou terapias coadjuvantes (KHALIL S, *et al.*, 2012). Atualmente os inibidores de ATM, tem se tornado inovadores, na tentativa de melhorar a atividade antitumoral de terapias indutoras de dano ao DNA (radioterapia). A primeira molécula inibidora de ATM (M3541), encontra-se em estudo clínico de fase I em conjunto com radioterapia, entretanto, o estudo de moléculas que inibem proteínas das vias de reparo é extremamente arduo por envolver várias vias sobrepostas, de modo que a inibição de qualquer elemento (como ATM) pode ser compensada por outras proteínas efetoras/mediadoras, sendo necessário um melhor entendimento dessas vias (WAQAR, Saiama N. *et al.*, 2022).

1.3.3 Principais genes relacionados ao ponto de checagem mitótico

Importantes genes e proteínas estão envolvidos na regulação dos pontos de checagem durante a mitose, sendo que o aumento ou diminuição da expressão dessas

moléculas leva à danos nas vias de checagem, podendo contribuir para a instabilidade cromossômica (SCHUYLER et al, 2012).

O Complexo Promotor de Anáfase (APC), tem um papel fundamental na regulação do ciclo celular eucariótico, seu principal mecanismo é desencadear a transição da metáfase para a anáfase durante a divisão celular (VANGENDEREN C, *et al.*,2020). A ativação do APC é através da proteína CDC20 (homólogo do ciclo de divisão celular 20), que permite a ligação do APC aos seus substratos, tais como securina e ciclina B, consecutivamente levando à anáfase (SCHUYLER et al, 2012; WANG et al, 2013).

O *CDC20* é um gene essencial para progressão da divisão celular e quando o ponto de checagem é ativado a atividade do APC é inibida, impedindo a transição da metáfase para a anáfase (SCHUYLER *et al.*, 2012; HEINRICH *et al.*; 2013). A ativação do ponto de checagem do fuso mitótico inibe as funções do APC através da inativação do CDC20 pelo complexo de checagem mitótico (CCM), constituído pelas proteínas MAD2, BUB1 e BUB3 (SCHUYLER et al, 2012; LONDON E BIGGINS, 2014; FAESEN et al, 2017). Esse mecanismo acontece quando não há ligação dos microtúbulos aos cinetócoros correspondentes, dessa forma, os cinetócoros desalinhados leva ao recrutamento de proteínas CCM e mudança conformacional de MAD2 (forma fechada, C-MAD2), permitindo a formação do complexo de checagem mitótico que sequestra CDC20 levando à parada mitótica, devido a produção contínua de um sinal que ativa o mecanismo de *checkpoint* (BARFORD D, 2019). Quando o último cinetócoro se liga aos microtúbulos, a sinalização bioquímica desse complexo CDC20 - MAD2 (aberto, forma, O-MAD2), é desfeita e o CDC20 volta a se ligar ao APC resultando na sua ativação e progressão do ciclo celular através da entrada em anáfase (LI, Jianquan *et al.*, 2017).

O *CDC20* é descrito na literatura como sendo um oncogene. Tanto a superexpressão gênica como o aumento de proteínas tem sido correlacionadas com mau prognóstico e instabilidade genética em vários tipos de câncer, incluindo as leucemias (QIAO, Renping *et al.*, 2016). Em paralelo a isto, SOTILLO e colaboradores 2007, observou que a superexpressão proteína MAD2, responsável por induzir a instabilidade e rearranjos cromossômicos é suficiente para o início da tumorigênese em vários tipos de tecidos (SOTILLO, Rocío *et al.*, 2007). Devido os inúmeros achados relacionados ao complexo CDC20 - MAD2, inúmeros estudos têm sido realizados em busca do desenvolvimento de moléculas alvos específicos (WANG et al, 2015).

1.3.4 Principais genes relacionados ao fuso mitótico

1.3.4.1 Proteína centrossomal de 55 kDa (CEP55).

As proteínas centrossomais auxiliam no controle do ciclo celular, regulando tanto o fuso mitótico quanto a organização dos microtúbulos e, portanto, são críticas para a progressão da divisão celular (KUMAR, Ambuj *et al.*, 2013). O CEP55 (proteína centrossomal de 55 kDa), é uma proteína centrossomal (coiled-coil), que atua como um regulador indispensável da citocinese, estágio final da divisão celular que resulta na separação física de duas células filhas (FABBRO, Megan *et al.*, 2005).

O CEP55 interage diretamente com dois componentes do complexo de classificação endossômica requerido para o transporte celular (ESCRT), através de sua região dimérica atípica α -helicoidal. Uma vez recrutado através do CEP55, o complexo ESCRT ordena os eventos de reprogramação da membrana que levam à separação física das duas células filhas durante a citocinese (Zhao *et al.*, 2006; Ettinger *et al.*, 2011; Kuo *et al.*, 2011). Além de sua função na citocinese, o CEP55 também tem um papel central de manutenção através da interação com complexos do fuso central (composto por MKLP1 e MgcRacGAP) por contato direto com MKLP1 (Zhao *et al.*, 2006; IWAMORI *et al.*, 2010; JEFFERY *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2013). Esse processo acontece durante a anáfase, quando o CEP55 é fosforilado por PLK1, impedindo a interação do CEP55 com o MKLP1 e, portanto, limitando o acúmulo de CEP55 (BHUTTA; MCINERNY; GOULD, 2014; CHANG *et al.*, 2012; JEFFERY *et al.*, 2016; NETO; GOULD, 2011).

A nível celular as alterações relacionadas ao CEP55 e suas vias de regulação podem gerar uma instabilidade cromossômica podendo causar letalidade ou proporcionar às células vantagens malignas, como resistência a medicamentos (SINHA *et al.*, 2019). Em outro estudo, JEFFERY, J (2016) mostrou diversas associações da superexpressão de *CEP55* correlacionando-se com aneuploidia, resistência a drogas e proliferação celular, caracterizando um perfil de prognóstico ruim em diversos tipos de cânceres (ZHOU, Wen *et al.*, 2013). Outros achados da literatura relataram que a superexpressão de *CEP55* em um modelo de camundongo causa alta incidência de tumorigênese espontânea com um amplo espectro de tumores altamente proliferativos e metastáticos (SINHA, Debottam *et al.*, 2020). Nos últimos anos, estudos que visem abordagens na função CEP55 nas células tumorais vem ganhando destaque, por se apresentar como uma nova opção de estratégia terapêutica para atingir vários tipos de cânceres (IWAMORI *et al.*, 2010).

1.3.4.2 Auroras quinases (AURK)

A família Auroras quinases ser/Thr (AURKA, AURKB e AURKC), surgiu como reguladores cruciais de processos essenciais que vão desde a entrada mitótica até a citocinese (Carmena, Mar *et al.*, 2009). As funções das Auroras A/B estão associadas com a estabilidade cromossômica, monitoramento dos pontos de checagem e formação do fuso mitótico (GOLDENSON e CRISPINO, 2014; HEREDIA *et al.*, 2014). O estudo das quinases tem ganhado destaque nos últimos anos devido seu papel na progressão do ciclo celular (Vagnarelli P & Earnshaw W. C, 2004).

Durante a divisão celular a aurora B (AURKB), tem um importante papel no controle da citocinese, o alinhamento dos cromossomos e o monitoramento do ponto de checagem mitótico. (KITZEN *et al.*, 2010; AFONSO *et al.*, 2016; Goldenson, B & Crispino J. D, 2015). A ativação da AURKB surge de várias etapas regulatórias, incluindo sua interação com proteína interna do centrômero (INCENP), borealina e survivina, formando um complexo. Assim, a ativação de AURKB se assemelha à de muitas outras quinases, pois requer interação com uma proteína parceira e fosforilação (ADAMS, R. R. *et al.*, 2000). Durante a prófase, a AURKB localiza-se ao longo de todo o cromossomo, tendo maior concentração no interior da região central dos centrômeros, durante a prometáfase e metáfase, e no início da anáfase, ocorre a migração para a região central do fuso para participar da citocinese (VAGNARELLI e EARNSHAW 2004; BOLANOS-GARCIA 2005).

A contribuição da AURKB na regulação mitótica se dá pelo direcionamento da conexão entre o cinetócoro e microtúbulos através da fosforilação de proteínas presentes na cromatina. Além disso, a AURKB atua na bi-orientação dos cromossomos, e enquanto esse mecanismo não estiver ocorrendo de forma correta, o complexo promotor da anáfase permanece desativado, sendo liberado apenas após a correta reorganização cromossômica, possibilitando a progressão para a anáfase (VADER E LENS, 2008; KITZEN *et al.*, 2010; GOLDENSON E CRISPINO, 2015).

Defeitos durante os processos de alinhamento dos cromossomos e ponto de checagem mitótico resulta na formação de células defeituosas. Um estudo feito com células nocaute de *AURKB*, mostraram a presença de erros durante a segregação devido a falhas no alinhamento dos cromossomos e erros na citocinese resultando na formação de células binucleadas (HÉGARAT, Nadia *et al.*, 2011). Em contrapartida, a literatura descreve que a superexpressão de *AURKB* está correlacionada com uma ampla variedade de cânceres,

incluindo várias formas de leucemias. Um estudo mostrou que os blastos (células maduras) na LMA superexpressam *ARKB* quando comparados as células controle (CD34+). Além disso, o mesmo estudo mostrou que essa superexpressão está associada a anormalidades citogenéticas que torna o prognóstico da doença desfavorável (YANG, Jing *et al.*, 2013; YE, Dongjiu *et al.*, 2009).

Sabendo que as alterações da expressão das auroras quinases estejam relacionados aos processos de instabilidade cromossômica, alterações citogenéticas e progressão tumoral em diversos tumores hematológicos, como a LMA, novas intervenções que busquem melhor compreender essa via merecem destaque. A pesquisa com inibidores de AURKB adicionados a terapias tradicionais vem ganhando espaço na comunidade científica, com objetivo de aumentar a eficácia e melhorar o prognóstico terapêutico do câncer (Borah, N. A., & Reddy, M. M. 2021).

1.4 Produtos naturais como potenciais moléculas antitumorais

Os produtos naturais são utilizados desde a antiguidade de maneira empírica como fonte farmacológica no tratamento de doenças (Lahlou, 2013). Diversas plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são fontes de importantes substâncias biologicamente ativas. A maioria dos fármacos em uso clínico são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais (Baker D, 2007). Ainda hoje, mais de 50% dos fármacos disponíveis são derivados de ou inspirados em produtos naturais (Newman DJ, Gordon MC, 2020).

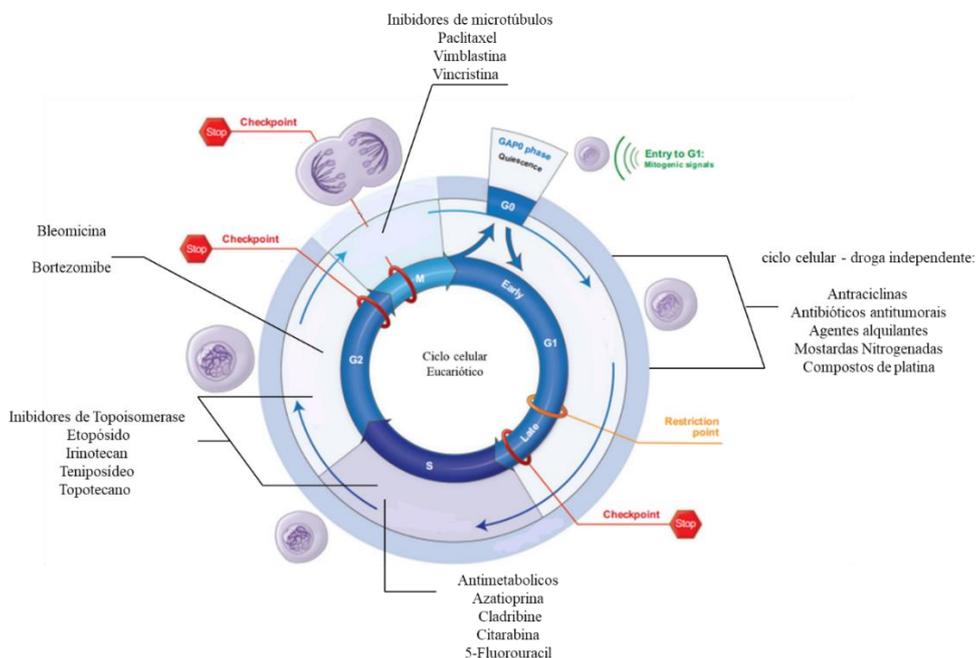
O primeiro produto natural comercial introduzido para uso terapêutico é a morfina, que foi inicialmente isolada entre 1803 e 1805 pelo farmacêutico alemão Friedrich Sertürner (Veeresham C. 2012). No final de 1800, a produção em larga escala de ácido salicílico para o tratamento de dor e febre foi iniciada pela Heyden Chemical Company na Alemanha, sendo considerado o primeiro medicamento semi-sintético puro, baseado em um produto natural inserido no mercado comercial (Science History Institute, 2009; Montinari MR. *et al.*, 2019). Dessa forma, a química ativa de produtos naturais permitira a descoberta de uma vasta gama de metabólitos secundários bioativos de fontes terrestres e marinhas que posteriormente tornaram-se candidatos a medicamentos (Veeresham C. 2012; Dias DA. *et al.*, 2012).

Os primeiros medicamentos anticancerígenos aprovados pela FDA e derivados de produtos naturais (extratos de plantas) foram os alcalóides da vinca (vincristina em 1963 e vinblastina em 1965), que foram isolados de plantas de pervinca de Madagascar encontradas

crescendo na Jamaica e nas Filipinas (Marty M *et al.*, 1978). Nos últimos anos, houve um avanço na descoberta desses produtos naturais com potencial antitumoral que tem sido utilizado para o manejo da quimioterapia do câncer (Newman DJ & Cragg GM, 2016). Alguns exemplos de drogas antitumorais derivadas da natureza é o composto Paclitaxel (Taxol), que é um taxano diperteno presente no extrato bruto da casca de *Taxus brevifolia* Nutt; a Curcumina (diferuloilmetano), composto polifenólico derivado da cúrcuma (açafraão-da-terra) que possui diversos efeitos farmacológicos, incluindo anti-inflamatórios, antioxidantes e anticarcinogênicos (Cragg & Newman, 2005; KINGHORN *et al.*, 2009). Além destas, diversos outros compostos derivados de fontes naturais são utilizados no combate ao câncer como os derivados da camptotecina, topotecan e irinotecan e o etoposido derivado da podofilotoxina (KINGSTON, 2005; RAHIER *et al.*, 2005).

Os fármacos utilizados no tratamento do câncer advindos de fontes naturais atuam por diversos mecanismos de ação que incluem a inibição do crescimento de células cancerígenas, atividade quimioprotetora e imunomoduladora, indução de apoptose de células cancerígenas e supressão de metástases de células cancerígenas (Nuzzo, Genoveffa, *et al.*, 2022; ISMAIL, Nor Isnida *et al.*, 2019; AHMED, Kanwal *et al.*, 2019; SU, Pengfei *et al.*, 2018; Falah, R. R., Talib, W. H., & Shbailat, S. J. 2017). Muitos dos compostos em estudo como agentes antitumorais atuam em múltiplas etapas do ciclo celular, sendo os derivados naturais uma classe bastante explorada que atua por esse mecanismo, conhecidos como ciclo-celular específicas (figura 6). O paclitaxel atua diretamente na polimerização dos microtúbulos; baixas concentrações de taxol reduzem a instabilidade dinâmica dos microtúbulos sem aumentar sua polimerização causando bloqueio da mitose na transição da metáfase/anáfase (Jordan & Wilson, 2004). A podofilotoxina atua diretamente na inibição da polimerização dos microtúbulos e também na inibição da topoisomerase II (Srivastava *et al.*, 2005). Os alcalóides da vinca, vincristina e vimblastina atuam inibindo a polimerização de microtúbulos, bloqueando a formação do fuso mitótico, resultando na parada do processo de mitose na metáfase (Jordan & Wilson, 2004).

Figura 6: Representação de drogas antitumorais que atuam especificamente no ciclo celular (ciclo-celular específicas).

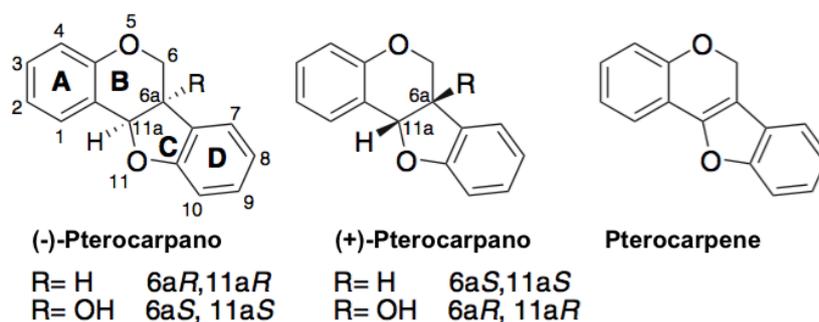


Fonte: Adaptado de Ferry I *et al*, 2018; Gragg; Grothaus; Newman; 2009; Meijer, 2003.

1.4.1 Pterocarpanos

Os pterocarpanos são um grupo de compostos naturais extraídos das famílias vegetais *Fabaceae* (Leguminosae, Papilionaceae e Bituminaria). Esses compostos compreendem o segundo maior grupo de isoflavonóides e desempenhando um papel importante como fitoalexinas. Os pterocarpanos são metabólitos secundários derivados da isoflavona e possuem um sistema de núcleos tetracíclico de anéis de benzofurano-benzopirano (DANIEL; PURKAYASTHA, 1995). Sua principal estrutura contém dois centros quirais em posições 6a e 11a que determinam a estereoquímica da molécula (Figura 7) (JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, *et al.*, 2008; TESAURO C, *et al.*, 2010).

Figura 7: Representação dos grupos químicos de pterocarpanos.



Os pterocarpanos tem sido uma classe amplamente estudada devido suas inúmeras propriedades biológicas, tais como: atividade antiviral, antimicrobiana (Engler et al., 1993), antifúngica (Macias et al., 1999) e anticâncer (Chaudhuri et al., 1995). De maior importância para este trabalho desenvolvido, compostos do grupo dos pterocarpanos atuam, em sua grande maioria, como citotóxicos em várias linhagens de células tumorais (*in vitro*). O composto (\pm)-3,4-diidroxi-8,9-metilenodioxipterocarpano, sintetizado por NETTO e colaboradores 2009, apresentou atividade citotóxica contra cinco linhagens diferentes de células de leucemia, incluindo algumas já resistentes aos fármacos atualmente utilizados (NETTO et al., 2009). Outro estudo mostrou que três pterocarpanos isolado da planta *Petalostemon Purpureos*, apresentou atividade em carcinoma nasofaríngeo humano (KB) com IC₅₀ variando de 0,9 a 5,6 $\mu\text{g/mL}$ (CHAUDHURI, Swapan K. *et al.*, 1995). Pesquisas seminais realizadas em exemplos importantes de pterocarpanos, com atividade citotóxica contra células tumorais, mostraram efeitos em modelos de linhagem de células do câncer de mama (NGUYENet al., 2009), cólon, pulmão e de cérvix (Liet al., 2008a); câncer de pâncreas (AWALEet al., 2008); carcinoma cervical humano (LI et al., 2008b), e de fígado (WÄTJENet al., 2007).

Dessa forma, o laboratório de oncologia experimental (LOE) vem investido no estudo dessa classe de moléculas com objetivo de caracterizar um novo composto com potencial antitumoral. O pterocarpano sintético (PTC+), derivado da família *Platymiscium floribundim* vem se mostrando um excelente candidato para uma droga antitumoral devido seu potencial citotóxico nas em diversas linhagens tumorais, tais como leucemia (HL- 60 e CEM), mama (MCF-7), colón (HCT-8), melanoma (B16) e ovário (OVCAR) (MILITÃO et al 2006; MILITÃO et al, 2007; FARIAS et al, 2020), com ação na modulação do fuso mitótico, desorganização dos fragmentos de actina e parada no ciclo celular em G2/M

(MILITÃO et al., 2006; MILITÃO et al., 2007; MILITÃO et al., 2014; MEIRA, 2016; FARIAS et al., 2020; Farias et al., 2021).

2. Relevância e Justificativa

Dados levantados pelo observatório de oncologia (2021) mostrou que foram identificados 63.452 óbitos por leucemia no Brasil. Do total de óbitos, o subtipo mais frequente foi LMA (36%). A média de sobrevivência desta doença oncohematológica é de 8,5 meses com a quinta pior sobrevida global de 5 anos de todos os cânceres (SHALLIS et al., 2019).

A LMA apresenta uma série de alterações citogenéticas e molecular, cuja etiologia está relacionada a alterações na diferenciação das células-tronco/progenitoras hematopoiéticas que levam a diferenciação aberrante e proliferação de células com hematopoiese alterada (Schnerch D, *et al.*, 2012; Medinger; Passweg, 2017).

A principal terapia aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) consta na terapia de indução de remissão seguida de terapia de consolidação. A terapia de indução consiste na infusão contínua de citarabina em combinação com 3 dias consecutivos de tratamento com antraciclina (Chen, Kent TJ, *et al.*, 2019). No entanto, novos esforços têm sido concentrados na busca de novos compostos para os casos não responsivos e resistentes ao tratamento convencional. Entre os vários novos agentes existem inibidores de tirosina kinase, inibidores do *checkpoint* imunológico, agentes pró-apoptóticos, moléculas “ciclo-específicos”, no qual inúmeros fármacos derivados de produtos naturais vêm ganhando espaço (WANG et al, 2015).

As vias de controle do ciclo celular, como os *checkpoints*, a formação do fuso e demais importantes eventos da divisão celular têm sido utilizados como importantes alvos moleculares na terapia anticâncer, chamados de drogas antimetabólicas. Dentre esses compostos, os isoflavonoides, em especial os pterocarpanos tem sido estudado pelo nosso grupo, os quais apresentam atividade antiproliferativa em diversas linhagens tumorais, incluindo células leucêmicas (HL- 60, KG-q, Kasumi-1 e CEM), de ovário (OVCAR) e próstata (PC-3), com ação sobre a modulação do fuso mitótico, desorganização dos fragmentos de actina e parada no ciclo celular na fase G2/M (FARIAS; DA COSTA; MEIRA; DINIZ-FILHO et al., 2020; MILITAO; BEZERRA; PESSOA; DE MORAES et al., 2007; MILITÃO; DANTAS; PESSOA; FALCÃO et al., 2006). Apesar do seu potencial

antitumoral e antimitótico, as vias e genes envolvidos na ação desse composto ainda não foram elucidadas, assim como seu papel na inibição do crescimento de células leucêmicas.

O avanço no estudo do potencial de ação e dos potenciais alvos moleculares de fármacos tem sido conhecidos como abordagem farmacogenômica na terapia alvo dirigida. Nesse sentido, o potencial de ação do derivado isoflavonoide pterocarpano (PTC+) na modulação da expressão de genes envolvidos no ciclo celular pode auxiliar na compreensão dos mecanismos de ação desse composto e controle da divisão celular como agente antimitótico. Ainda a avaliação do seu potencial antiproliferativo em linhagens de leucemias (*in vitro*), visto que é cada vez mais evidente a importância de estudos que busquem definir uma estratégia de tratamento eficaz e potencialmente direcionadas através dos mecanismos celulares e moleculares, em doenças complexas e com padrões altamente heterogêneos como as leucemias, como estratégias inovadoras na busca de novas drogas para o combate à doença.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de um derivado de isoflavonoide, o pterocarpano (PTC+) em linhagens leucêmicas, bem como seu papel na regulação da expressão de genes envolvidos no controle do ciclo celular.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar o perfil citotóxico do PTC+ em linhagens de leucemia promielocítica aguda (HL-60), leucemia mielóide crônica (K-562), leucemia mieloide aguda (KG-1) e leucemia mieloblástica aguda (KASUMI-1).
- Determinar o perfil seletivo do PTC+ frente a linhagem de leucemia mieloide aguda (KG-1).
- Determinar alterações morfológicas causadas pelo PTC+ em linhagem de leucemia mieloide aguda (KG-1).
- Determinar a progressão do ciclo celular das células de leucemia mieloide aguda (KG-1) tratadas com o PTC+.

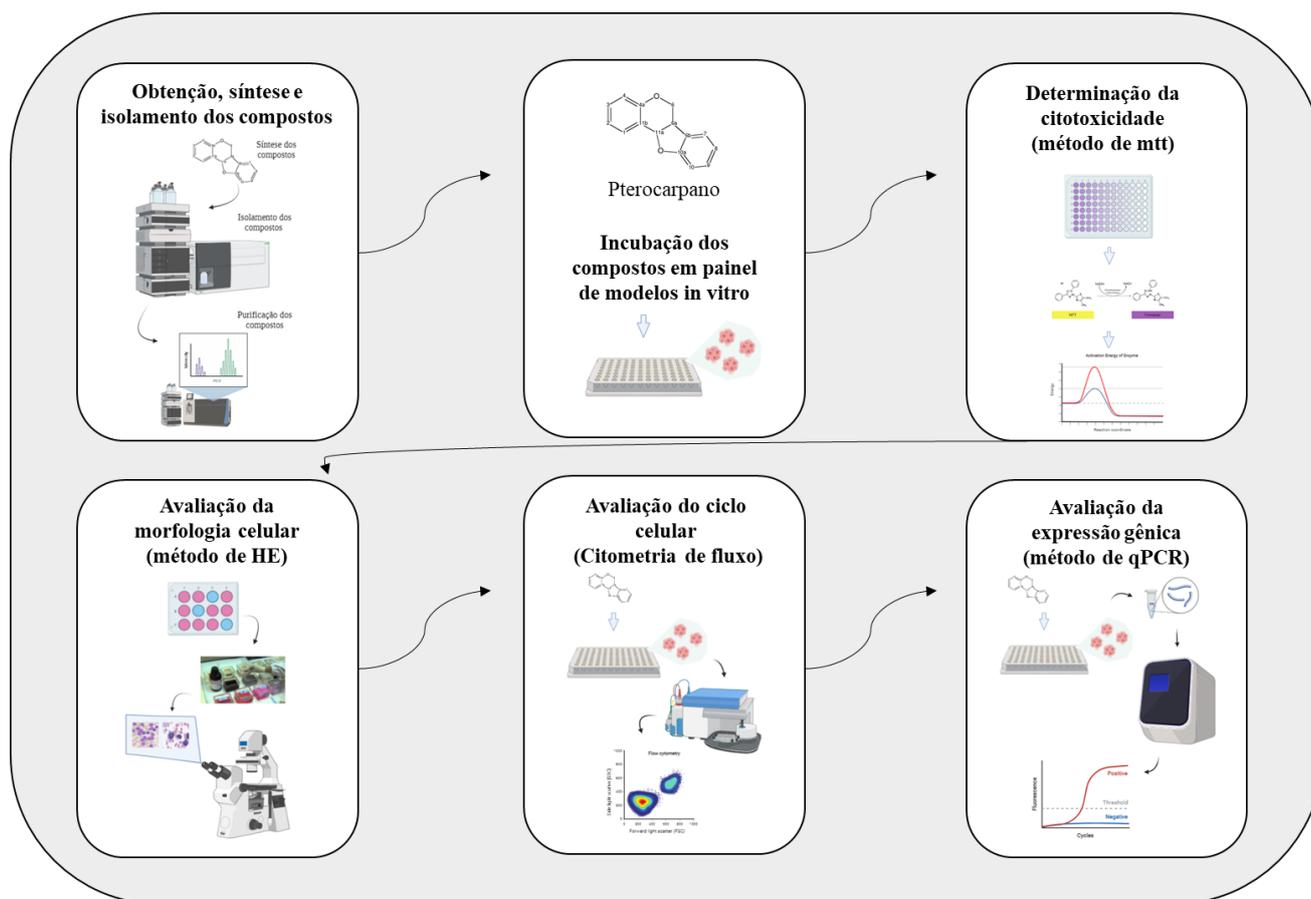
- Determinar o efeito do PTC+ na expressão dos genes *CEP55*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20* e *ATM*, relacionados a regulação do ciclo celular das células de leucemia mieloide aguda (KG-1) após 12 e 24 horas de incubação.

4. Materiais e Métodos

4.1 Desenho experimental

Os compostos estudados no presente trabalho, foram sintetizados, isolados e purificados pelo Prof. Paulo Roberto Costa da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A atividade citotóxica destes compostos foi determinada pelo método de MTT. Após a identificação da atividade antiproliferativa dos compostos foi realizado o estudo de caracterização de mecanismos de ação envolvidos na atividade do PTC+, através do ensaio morfológico por HE por microscopia óptica, o estudo do ciclo celular pelo método de citometria de fluxo e avaliação da modulação da expressão genica pelo método de qPCR. A figura 8 apresenta o desenho experimental onde está descrito resumidamente todas as etapas deste trabalho.

Figura 8: Desenho experimental descrevendo o fluxo deste trabalho.



Fonte: Própria.

4.2 Síntese, obtenção e isolamento dos compostos testados no presente estudo.

O composto PTC+ foi cedido pelo Prof. Paulo Roberto Costa da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O PTC+ foi sintetizada como descrito por (FARIAS; DA COSTA; MEIRA; DINIZ-FILHO et al., 2020) e a sua estrutura confirmada usando espectroscopia de ^1H e ^{13}C NMR. A mistura do racêmico a HPLC quiral foi preparada utilizando um semi-preparador Daicel CHIRALPAK®IA 250 mm 20 mm, coluna de $5\ \mu\text{m}$ e 7:3 v/v iso-propanol/hexano como solvente eluente (caudal de 8 mL/min) permitiu a sua resolução para os enantiômeros constituintes. As formas (+)- e (-)- de PTC assim obtidas eram espectroscopicamente idênticas, exceto pelas suas rotações específicas, sendo estas de magnitude essencialmente igual mas sinal oposto. A pureza enantiomérica de cada fração foi medida por análise cromatográfica.

4.3 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

4.3.1 Linhagens celulares

As linhagens de células tumorais foram doadas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US-NCI, do inglês United States – National Cancer Institute) e utilizadas neste trabalho para avaliar a citotoxicidade dos compostos. Para avaliação da citotoxicidade sobre células não tumorais células mononucleadas de sangue periférico (CMSP) obtidas de voluntários sadios, sob aprovação do comitê de ética em pesquisa em humanos (protocolo 4.505.895) (Tabela 1).

Tabela 1: Linhagens utilizadas com suas respectivas origens e concentrações de plaqueamento.

Linhagem celular	Tipo histológico	Origem	Conc. De plaqueamento (cél. /ml)
HL-60 (Leucemia promielocítica aguda)	Promieloblasto	Humano	0.3 x 10 ⁶ céls/mL
K-562 (Leucemia mielóide crônica)	Linfoblasto	Humano	0.3 x 10 ⁶ céls/mL
KG-1 (Leucemia mielóide aguda)	Mieloblasto	Humano	0.3 x 10 ⁶ céls/mL
KASUMI-1 (Leucemia mieloblástica aguda)	Mieloblasto	Humano	0.1 x 10 ⁶ céls/ mL
CMSP (Células mononucleadas do sangue periférico)	Mononucleados	Humano	0.1 x 10 ⁶ céls/ mL

*Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.2 Manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas de cultura de células de 25 cm² com volume de 50 mL ou de 75 cm² com volume de 250 mL em meio RPMI 1640 (Gibco) ou DMEM (Gibco), dependendo da linhagem, ambos suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). As linhagens celulares foram manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical (VECO, modelo Biosafe 12, classe II) e mantidas em incubadora a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (NUAIRE, modelo TS Autoflow). A manutenção foi feita sempre que as células atingiam

aproximadamente 70% de confluência. O crescimento das linhagens foi acompanhado diariamente por microscópio invertido (ZEISS, modelo Axiovert 40C).

Para a manutenção de células aderidas, o meio foi retirado e a garrafa lavada 2x com PBS (do inglês Phosphate Buffer Solution) estéril. Em seguida, foi adicionada tripsina-EDTA 0,5% (Gibco) diluída 10X em solução tampão (PBS), a fim de suspender as células. Depois de suspensas, a ação da tripsina foi inibida pela adição de meio suplementado com SBF. Parte das células foi removida da garrafa e o volume preenchido com meio completo. Para manutenção de células suspensas, apenas foi realizada a troca do meio.

4.3.3 Avaliação do efeito citotóxico e seletivo do PTC+ utilizando o ensaio do MTT

O ensaio do MTT é um método colorimétrico quantitativo indireto que tem como objetivo quantificar a atividade mitocondrial por meio da redução do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT), de cor amarela, com consequente formação de cristais de formazan, de cor púrpura, em células metabolicamente ativas, sendo a quantificação realizada por absorbância em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983). As células em suspensão foram plaqueadas em placas de 96 cavidades, sendo a concentração de plaqueamento determinada de acordo com as linhagens a serem testadas, descritas na Tabela 1. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C a 5% CO₂, foi adicionado 100 µL de PTC+ diluído em meio completo, em concentrações variaram de 100 a 0,3 µM, e as placas foram novamente incubadas por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo, com concentrações que variaram de 5 a 0,04 µM. Ao final do período de incubação, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min e, em seguida, o sobrenadante foi retirado. Foi adicionado em cada poço 150 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL), diluído em meio RPMI 1640, e as placas foram reincubadas por 3 horas. As placas foram, então, novamente centrifugadas a 3000 rpm por 10 min e o sobrenadante retirado. Para realização da leitura em espectrofotômetro de placa (Beckman Coulter Inc., modelo DTX-880), utilizando comprimento de onda de 595 nm, o formazan foi ressuspensão em 150 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) adicionado em cada poço. Para leitura foi utilizado o programa Multimode Detection Software (Beckman Coulter Inc.). Para a análise do efeito tempo-dependente, este método também foi realizado após 24 e 72 horas de tratamento com PTC+ apenas na linhagem KG-1.

4.4 Avaliação das alterações morfológicas por coloração com panótico rápido

A coloração com kit panótico rápido (Laborclin®) permite a visualização das características morfológicas das células por meio da coloração diferenciada da membrana celular, do citoplasma e do núcleo, sendo possível observar, por exemplo, alterações morfológicas que caracterizam diferentes processos de morte celular (GURR, 1971). As células KG-1 foram plaqueadas na concentração de 0.3×10^6 células/mL em placas de 24 poços e posteriormente, foram tratadas com PTC+ (1,5 μ M), onde foram incubadas por 24 e 72 horas em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo (DMSO). Após os períodos de incubação, as células foram fixadas com solução de triarilmetano a 0,1%, coradas com solução a 0,1% de xantenos e com solução de 0,1% de tiazinas (Laborclin®) para coloração de núcleo e citoplasma. Os poços foram lavados para remover o excesso de corante e, em seguida, as células foram visualizadas em microscópio óptico e fotografadas no aumento de 200x (Olympus, Tokyo, Japan).

4.5 Citometria de fluxo

Para os experimentos realizados no citômetro de fluxo, as células KG-1 foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de 0.3×10^6 células/mL. O tratamento com a molécula PTC+ foi de 1,5 μ M. O Monastrol (50 μ M) foi utilizado como controle positivo a fim de evidenciar a parada do ciclo em G2/M. Os tratamentos duraram 12, 24 e 48 horas. As células do controle negativo receberam a mesma concentração do veículo que a maior concentração da substância testada. Após transcorridos os respectivos tempos de tratamento, as células foram transferidas para tubos eppendorfs e centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de PBS. As células foram analisadas utilizando o citômetro BD FACSVerse®. Para todos os parâmetros avaliados, um total de 10.000 eventos foram levados em consideração por cada replicata de cada amostra. Os debris foram omitidos das análises. Cada experimento foi realizado por pelo menos duas vezes em triplicata.

4.6 Expressão gênica por qPCR

As análises de expressão genica foram realizadas através de transcrição reversa associada a PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Inicialmente, as células KG-1

foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de 0.3×10^6 células/mL. O tratamento com a molécula de estudo PTC+ foi de 1,5 μ M durante 12 e 24 horas. Posteriormente, as células tratadas foram submetidas à extração de RNA utilizando o kit comercial *ReliaPrep™ miRNA Cell and Tissue Miniprep System* (Promega) seguindo as instruções do fabricante. O DNA complementar (cDNA) de cada amostra foi sintetizado usando o SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen®) com adição de oligonucleotídeos d(T) para captura de mRNA. À análise da expressão gênica foi realizada utilizando o sistema de detecção CFX96 e os alvos foram amplificados utilizando TaqMan PCR mastermix (Applied Biosystems®). As sondas TaqMan foram utilizadas para os genes *CEP55* (Hs01070181_m1), *AURKB* (Hs00945858_g1), *MAD2* (Hs01554513_g1), *CDC20* (Hs00426680_mH) e *ATM* (Hs00175892_m1). Para os genes de referência foi utilizado os genes *B2M* (Hs00187842_m1) e *GAPDH* (Hs02786624_g1). Os valores de Cq (Quantification Cycle) foram determinados e a média dos Cqs dos genes de referência foram utilizados na normalização da expressão gênica. A expressão relativa dos genes alvos foi avaliada pelo método 2-ddCq (Livak e Schmittgen, 2001), utilizando a linhagem leucêmica RAJI (Linfoma de Burkitts) como amostra referência.

4.7 Análise estatística

Para os ensaios de MTT os valores das absorbâncias foram transformados em porcentagem de inibição, baseado na média da absorbância do controle negativo. A concentração inibitória média (CI₅₀) com os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foi obtida por regressão não linear. O índice de seletividade (IS) dos compostos testados foi calculado a partir da razão entre o valor de CI₅₀ para linhagens não tumorais e para linhagens tumorais (IS= CI₅₀ de células não tumorais/ CI₅₀ de células tumorais) (BAGLA et al., 2014).

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M) nos quais foram comparados por análise de variância (ANOVA - One Way) seguida por teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software *GraphPad Prism* versão 8.0. (*GraphPad Software, San Diego, CA, EUA*) considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. Resultados

5.1 Avaliação da atividade antiproliferativa dos compostos PTC+ em linhagens de células leucêmicas e células não tumorais *in vitro*.

O efeito da atividade antiproliferativa do composto PTC+ (*in vitro*) foi avaliado frente a um painel de linhagens leucêmicas e linhagens de células não tumorais através do método de MTT. O índice de seletividade (IS) é a relação entre citotoxicidade do composto para células não tumorais e sua atividade citotóxica. Foi calculado a partir da razão entre a citotoxicidade das células não tumorais e a atividade contra células tumorais (CI_{50}). A doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo deste ensaio. Os valores de CI_{50} após 72 horas de tratamento estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Avaliação de inibição da proliferação *in vitro* do PTC (+) em linhagens tumorais de leucemia humana após 72 horas de incubação. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo deste ensaio.

LINHAGENS	CI_{50} (μ M) ERRO PADRÃO DA MÉDIA (EPM)		ÍNDICE DE SELETIVIDADE	
	PTC+	DOX	Índice de seletividade (IS)	
TUMORAIS	HL-60	0,41 \pm 0,13	0,026 \pm 0,01	390,24
	K-562	7,51 \pm 0,29	0,49 \pm 0,01	21,30
	KG-1	1,0 \pm 0,09	0,11 \pm 0,04	160
	KASUMI-1	4,14 \pm 1,03	0,13 \pm 0,007	38,64
	CMSP	>160	0,14 \pm 0,04	-

*Os dados estão apresentados em valores de IC_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) estão apresentados em μ M. O erro padrão da média (EPM) foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em triplicata pelo método do MTT após 72 horas de incubação. Os valores foram calculados a partir de regressão não linear, utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0.

O resultado de citotoxicidade mostra que o PTC+ apresentou atividade antiproliferativa em todas as linhagens leucêmicas (Tabela 2). A CI_{50} variou de 0,41 a 7,51 μ M, sendo as linhagens de leucemia promielocítica aguda (HL-60) e leucemia mieloide aguda (KG-1) as mais sensíveis, respectivamente. Já nas células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP) o composto PTC+ não apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas (CI_{50} >160 μ M). Além disso, o perfil de citotoxicidade do PTC+ em linhagens não tumorais foi comparado por meio do cálculo do índice de seletividade (IS). Foi possível observar um efeito citotóxico cerca de cento e sessenta vezes maior para as linhagens de leucemia promielocítica aguda (HL-60) e leucemia mieloide aguda (KG-1) quando comparadas as linhagens não tumorais. O índice de seletividade variou de 21 a 390

sendo considerado mais seletivo para as linhagens HL-60 (IS= 390) e KG-1 (IS= 160), respectivamente.

A leucemia mieloide aguda encontra-se entre as formas mais grave e pior prognóstico dentro da heterogeneidade das oncohematologias. Com isso, considerando nossos achados de citotoxicidade do PTC+ frente a linhagem de leucemia mieloide aguda (KG-1) seguimos os demais ensaios com essa linhagem.

5.1.1 Avaliação da atividade antiproliferativa do composto PTC+ em linhagem de leucemia mieloide aguda (KG-1) nos tempos de 24 e 72 horas.

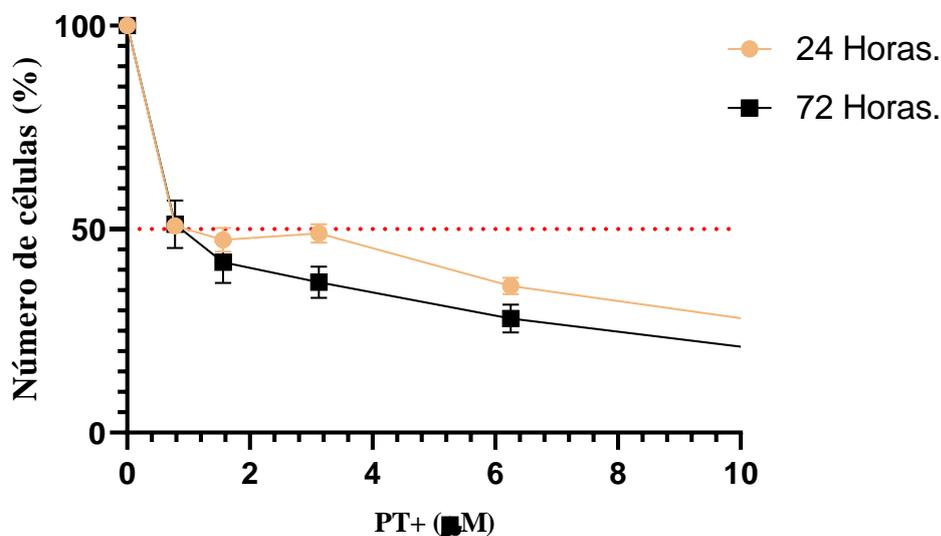
Os resultados apresentados anteriormente mostraram o potencial citotóxico do composto PTC+ frente a linhagem de leucemia mieloide aguda (KG-1) no tempo de 72 horas. Com isso, objetivamos realizar a avaliação do composto de forma temporal, utilizando concentrações de diluição seriada afim de determinar os valores de CI_{50} após 24 horas de tratamento. A doxorrubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo deste ensaio. Os valores de CI_{50} após 72 horas de tratamento estão apresentados na tabela 3. A figura 9 apresenta a curva de crescimento celular das células KG-1 a concentração de PTC+ no tempo de incubação de 24 e 72 horas.

Tabela 3: Avaliação de inibição da proliferação *in vitro* do PTC (+) em linhagens de leucemia mieloide aguda (KG-1) após 24 horas de incubação. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo deste ensaio.

Linhagens / Tempo	CI_{50} (μ M) INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%		ÍNDICE DE SELETIVIDADE
	PTC+	DOX	Índice de seletividade (IS)
KG-1	24 Horas	1,5 (1,5 - 1,9)	1,877 (0,1 - 0,2) 106,66
	72 Horas	1,0 (0,8 - 1,2)	0,11 (0,01 - 0,04) 160

*Os dados estão apresentados em valores de IC_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) estão apresentados em μ M. O intervalo de confiança de 95% (IC 95%) foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em triplicata pelo método do MTT após 24 horas de incubação. Os valores foram calculados a partir de regressão não linear, utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0.

Figura 9: Curva de crescimento da linhagem de leucemia mieloide aguda (KG-1) após incubação por 24 e 72 horas com o compost PTC+.



*Os dados estão apresentados em valores de IC₅₀ (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) estão apresentados em µM. O intervalo de confiança de 95% (IC 95%) foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em triplicata pelo método do MTT após 24 horas de incubação. Os valores foram calculados a partir de regressão não linear, utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0.

5.2 Avaliação das alterações morfológicas da linhagem KG-1 após tratamento com o PTC+

As células KG-1 são mieloblastos, caracterizados por sua morfologia imatura, com alta relação núcleo/citoplasma, apresentando a cromatina frouxa, nucléolo evidente e citoplasma agranular (apresentadas nos índices “A” das figuras 10,11 e 12). As células foram tratadas com o PTC+ e incubadas por 12, 24 e 48 horas (Figura 10, 11 e 12, respectivamente). A análise morfológica das células tratadas com PTC+ foi realizado utilizando microscopia óptica.

Figura 10: Imagem da morfologia das células KG-1 após 12 horas de incubação com o composto PTC+, coradas com kit panótico rápido. Células visualizadas por microscopia óptica no aumento de

20X. A figura (A) mostra as células controle negativo. A figura (B) mostra as células tratadas com PTC+ na concentração de 1,5 μM .

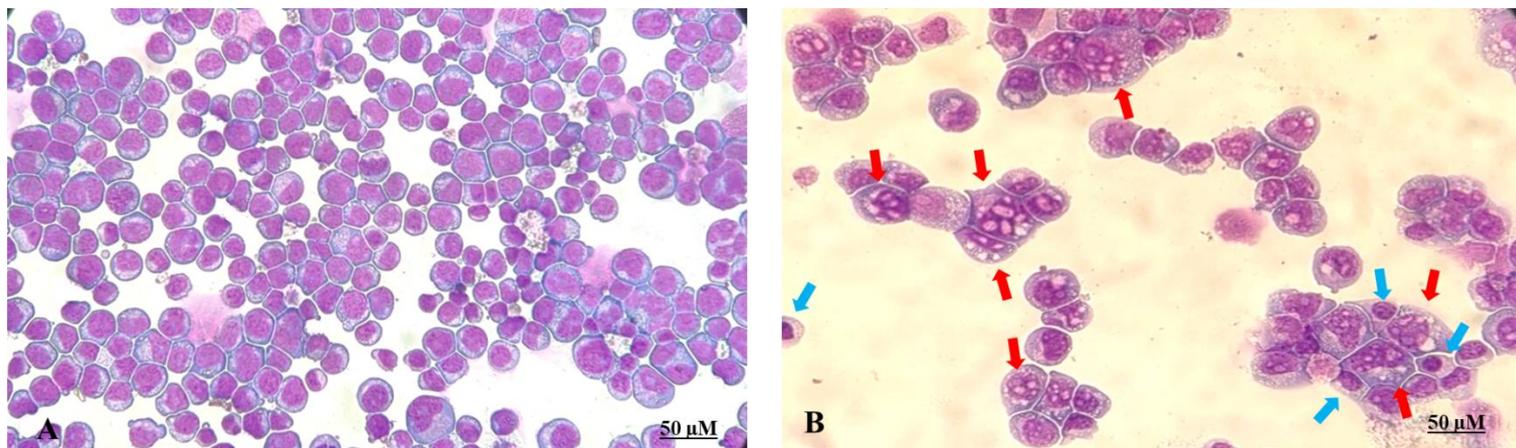


Figura 11: Imagem da morfologia das células KG-1 após 24 horas de incubação com o composto PTC+, coradas com kit panótico rápido. Células visualizadas por microscopia óptica no aumento de 20X. A figura (A) mostra as células controle negativo. A figura (B) mostra as células tratadas com PTC+ na concentração de 1,5 μM .

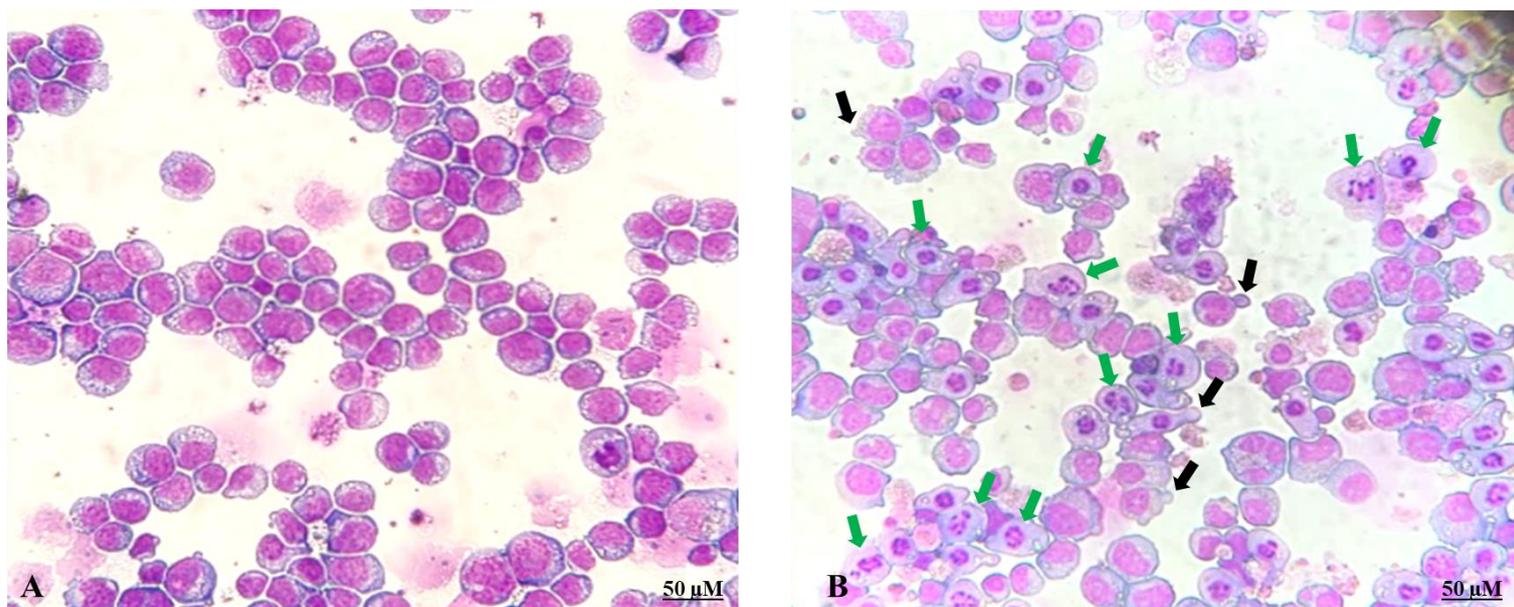
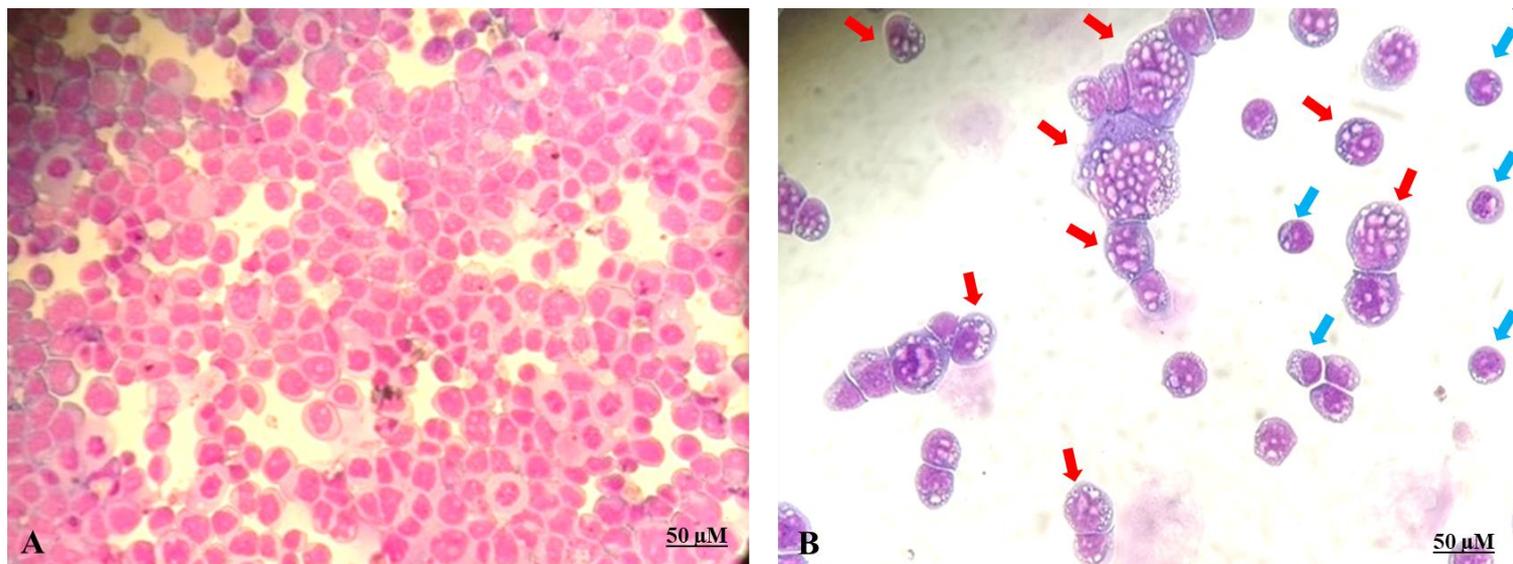


Figura 12: Imagem da morfologia das células KG-1 após 48 horas de incubação com o composto PTC+, coradas com kit panótico rápido. Células visualizadas por microscopia óptica no aumento de

20X. A figura (A) mostra as células controle negativo. A figura (B) mostra as células tratadas com PTC+ na concentração de 1,5 μM .



*Células com aumento de tamanho do vacúolo estão representadas pelas setas vermelhas; as células com diminuição do conteúdo nuclear estão representadas pelas setas azuis; as células com sugestiva de parada em mitose estão representadas pelas setas verdes; células com projeções citoplasmáticas “*Blebs*” estão representadas pelas setas pretas.

Nas figuras 10A, 11A e 12A respectivamente, compõe o grupo dos controles negativos nos tempos de 12, 24 e 48 horas, onde as células não receberam nenhum tratamento. Nessas figuras é possível observar que as células apresentam características bem representativas de um mieloblasto, alta relação núcleo/citoplasma, a cromatina frouxa e nucléolos em evidencia.

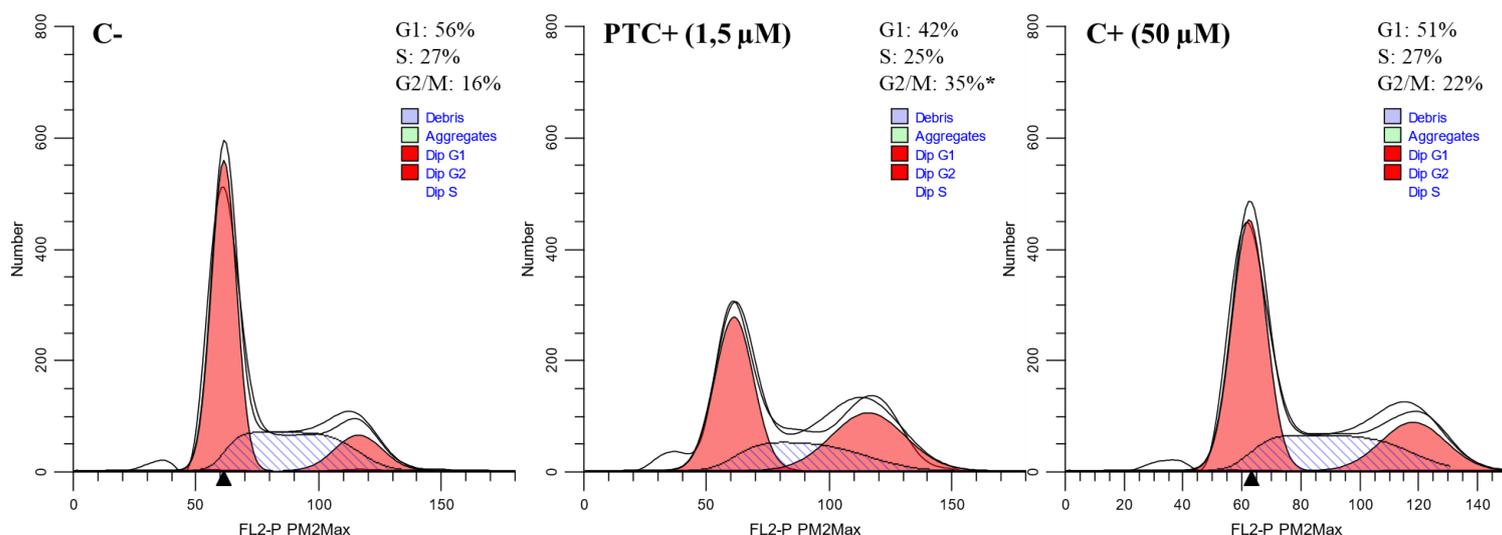
Nas figuras 10A, 11A e 12A, dos grupos tratados em diferentes tempos foi possível visualizar um aumento do número e do tamanho dos vacúolos em todos os tempos de tratamento na concentração de 1,5 μM . Foi observado que a partir do tempo de 24 horas as células apresentavam uma característica nuclear de parada em mitose devido a redução do conteúdo nuclear. Além disso, a partir desse tempo também foi possível observar algumas alterações morfológicas de membrana, como a formação de prolongamentos da membrana plasmática “*blebs*”, o que pode indicar o início de um processo de apoptose, embora essas características tenham sido pouco observadas.

5.3 Influência do PTC+ sobre o ciclo celular das células de leucemia mieloide aguda (KG-1).

Muitos agentes antineoplásicos inibem a proliferação e induzem morte celular de células tumorais por meio da inibição do ciclo celular. Com isso, foi avaliado o perfil de

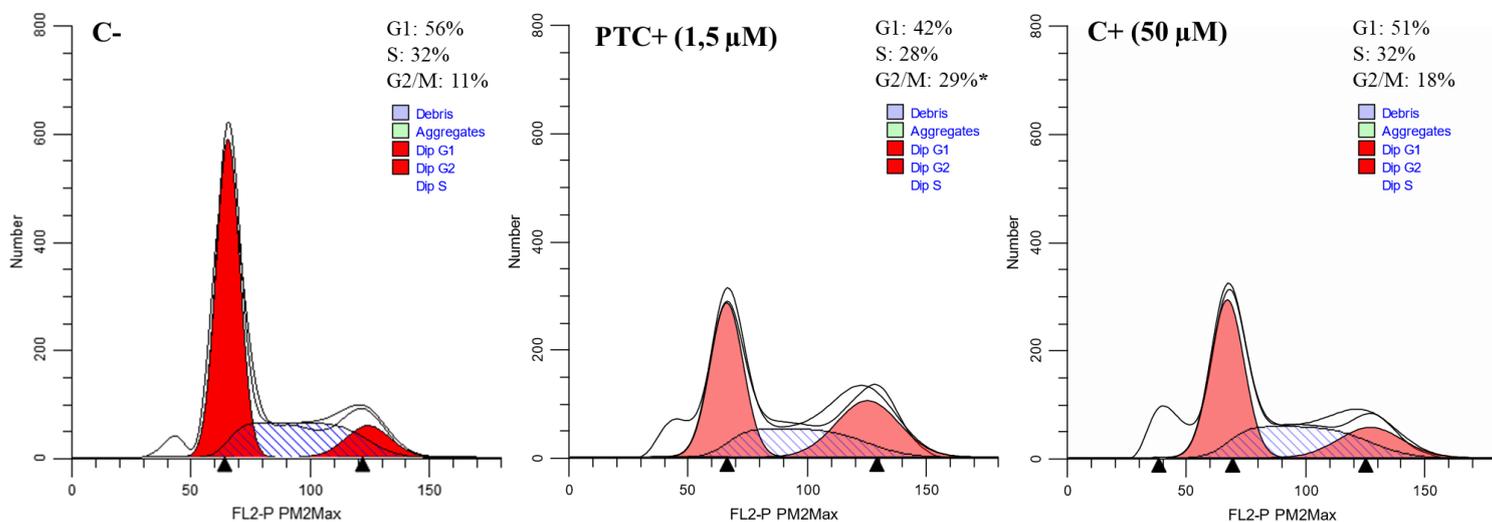
parada do ciclo celular do PTC+ frente as células KG-1, após o tratamento temporal em 12, 24 e 48 horas de incubação (Figura 13, 14, 15 e 16). As concentrações utilizadas nesses testes basearam-se no valor de CI_{50} obtido pelo teste do MTT após os respectivos tempos de incubação. Assim as células foram tratadas com o veículo (controle negativo), monastrol 50 μM (controle positivo) e PTC+ na concentração de 1,5 μM .

Figura 13: Influência do PTC+ sobre o ciclo celular das células de linhagem de leucemia mieloide aguda (KG-1) após incubação por 12 horas.



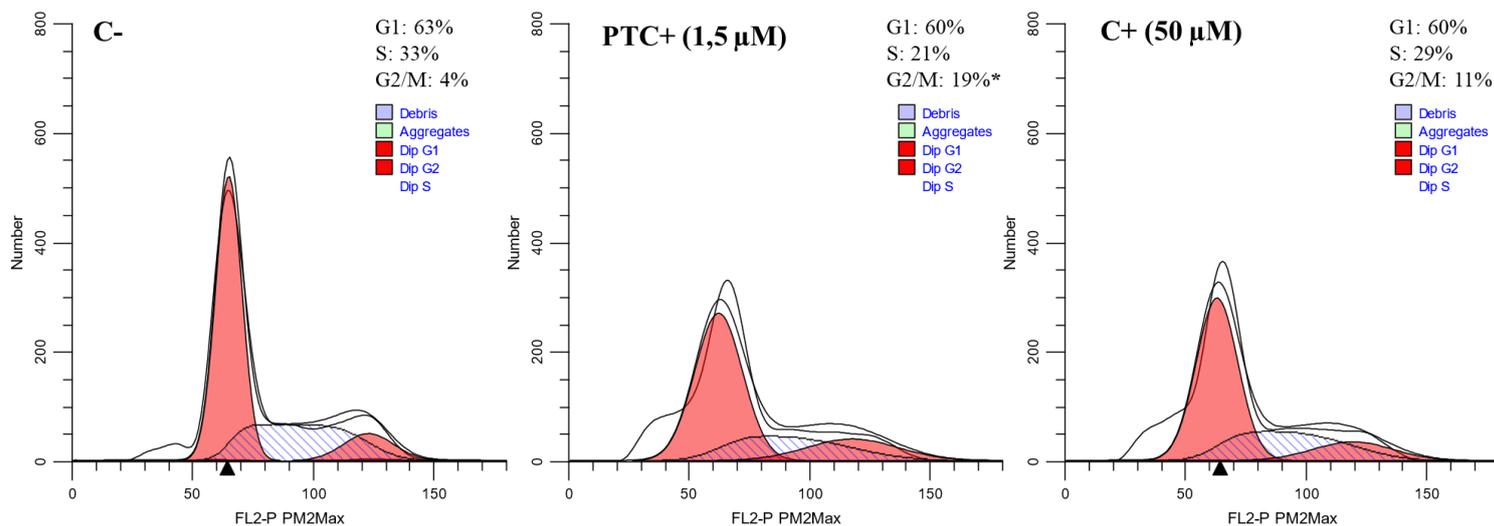
O controle negativo (C-) foi tratado com o veículo (DMSO) utilizado para diluir as substâncias testadas. O monastrol a 50 μM foi utilizado como controle positivo (C+). O composto PTC+ foi utilizada na concentração de 1,5 μM . Os gráficos apresentados foram obtidos utilizando o programa ModFit LT. *, $p < 0,0001$ quando comparados ao C+. Os dados foram analisados utilizando ANOVA – ONE WAY seguido de teste de Turkey.

Figura 14: Influência do PTC+ sobre o ciclo celular das células de linhagem de leucemia mieloide aguda (KG-1) após incubação por 24 horas.



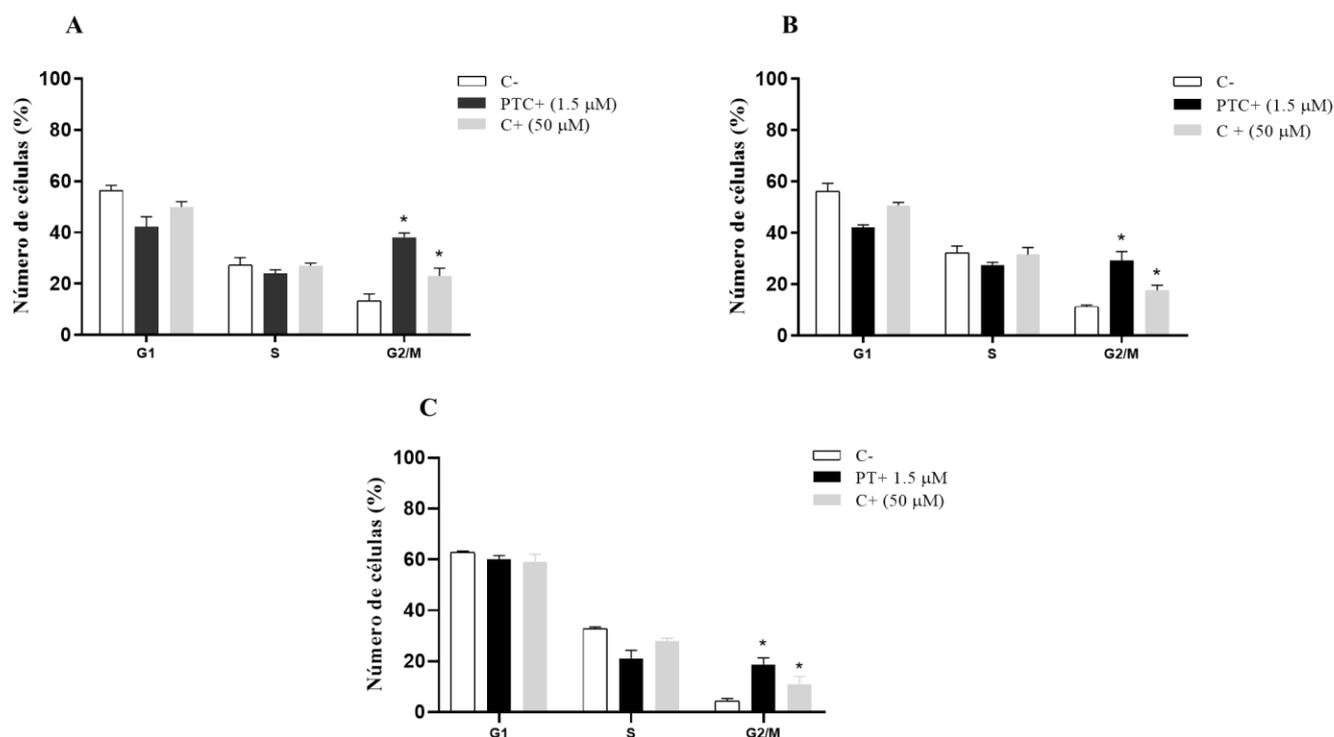
O controle negativo (C-) foi tratado com o veículo (DMSO) utilizado para diluir as substâncias testadas. O monastrol a 50 μM foi utilizado como controle positivo (C+). O composto PTC+ foi utilizada na concentração de 1,5 μM . Os gráficos apresentados foram obtidos utilizando o programa ModFit LT. *, $p < 0,0001$ quando comparados ao C+. Os dados foram analisados utilizando ANOVA – ONE WAY seguido de teste de Turkey.

Figura 15: Influência do PTC+ sobre o ciclo celular das células de linhagem de leucemia mieloide aguda (KG-1) após incubação por 48 horas.



O controle negativo (C-) foi tratado com o veículo (DMSO) utilizado para diluir as substâncias testadas. O monastrol a 50 μM foi utilizado como controle positivo (C+). O composto PTC+ foi utilizada na concentração de 1,5 μM . Os gráficos apresentados foram obtidos utilizando o programa ModFit LT. *, $p < 0,0001$ quando comparados ao C+. Os dados foram analisados utilizando ANOVA – ONE WAY seguido de teste de Turkey.

Figura 16: Efeito do PTC+ (1,5 μ M) sobre as fases do ciclo celular em células de leucemia mieloide aguda (KG-1) após (A)12, (B)24 e (C)48 horas, respectivamente, de incubação, determinado por citometria de fluxo, utilizando iodeto de propídeo.



O controle negativo (C-) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. A monastrol (C+) 50 μ M foi utilizado como controle positivo. O composto PTC+ foi utilizada na concentração de 1,5 μ M. Os dados estão apresentados como valores de média \pm SEM, obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicatas. *, $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido de teste de Bonferroni. (GraphPad Prism versão 8.0). Um total de 10.000 eventos foi adquirido em cada experimento. Dados analisados com ModFit LT 5.0 Software (Verity software house).

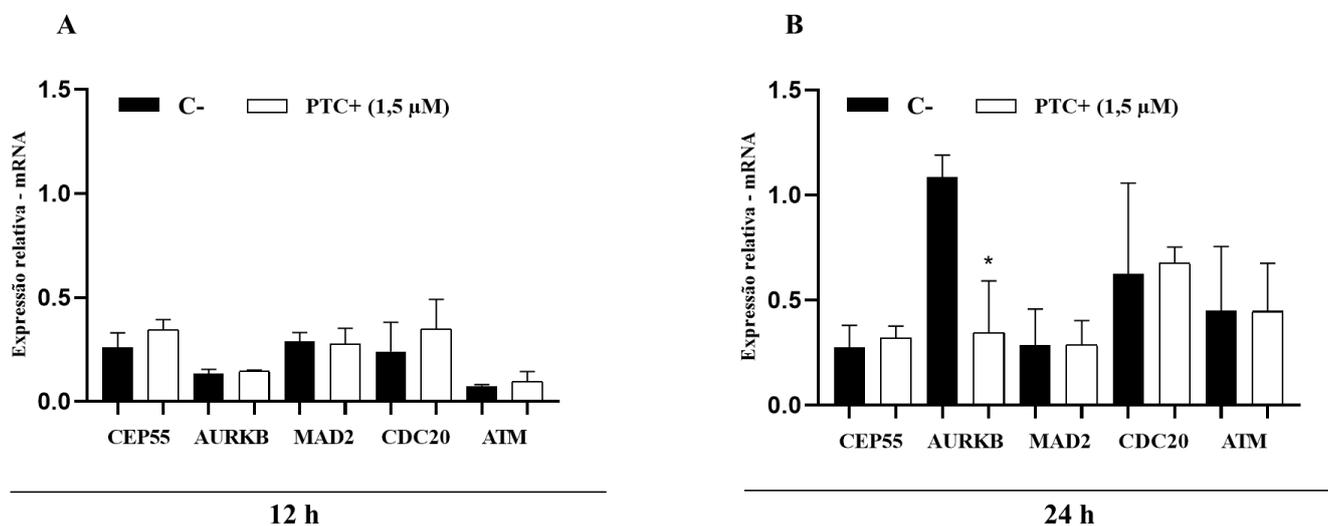
A figura 13 descreve a avaliação do conteúdo de DNA das células KG-1 tratadas com PTC+ após 12 horas de incubação. Foi observado um aumento de células na fase G₂/M quando tratadas com o composto PTC+ e comparado ao controle negativo ($p < 0,0001$). O ciclo das células do controle negativo foi caracterizado por 56% ($\pm 1,0$) das células em G₁, 27% ($\pm 2,0$) das células na fase S e 16% ($\pm 2,0$) das células em fase de G₂/M. Nas células tratadas com PCT+ após 12 horas de incubação foi possível observar que 35% ($\pm 2,0$) das células encontravam-se em G₂/M. Na análise das células tratadas com PTC+ após 24 horas de incubação (figura 14) foi possível observar que a célula se manteve com o perfil de parada em mitose (G₂/M) quando comparado ao controle negativo ($p < 0,0001$). O ciclo das células do controle negativo foi caracterizado por 56% ($\pm 3,0$) das células em G₁, 32% ($\pm 2,0$) das células na fase S e 11% (± 0) das células em fase de G₂/M. Nas células tratadas com PCT+ após 24 horas de incubação foi possível observar que 29% ($\pm 2,0$) das células encontravam-se em G₂/M. Após 48 horas de incubação com o composto PTC+ é possível observar que as células se mantem paradas em na transição G₂/M ($p < 0,0001$) quando comparadas ao controle negativo (figura 15). O ciclo das células do controle negativo foi caracterizado por 63% (± 0) das células em G₁, 33% (± 0) das células na fase S e 4% (± 1) das células em fase de G₂/M.

Nas células tratadas com PTC+ após 48 horas de incubação foi possível observar que 19% (± 2.0) das células encontravam-se em G₂/M. A maior parte das células tratadas com o composto monastrol, utilizado como controle positivo do experimento (C+), testado na concentração de 50 μ M, estavam na fase de G₂/M em ambos os tempos de tratamento. A figura 16 descreve os dados de citometria de fluxo nos tempos de (A)12, (B)24 e (C)48 horas, em que foi observado um bloqueio na fase de transição em G₂/M em todos os tempos nas células KG-1 tratadas com o PTC+ quando comparadas com o controle negativo (C-) ($p < 0,0001$).

5.3.1 Influência do PTC+ na modulação da expressão de genes relacionados ao ciclo celular das células de leucemia mieloide aguda (KG-1).

A progressão do ciclo celular da fase G₂ para a mitose propriamente dita, requer a ativação da transcrição de vários genes envolvidos nesse processo, que irão determinar o início dessa fase nas células eucarióticas. Diante dos resultados de perfil de parada do ciclo celular das células tratadas com o PTC+ buscamos investigar sua capacidade de modular a expressão de importantes genes envolvidos na fase G₂/M. Para tal, células KG-1 foram tratadas com o composto PTC+, na concentração de 1,5 μ M, após incubação por 12 e 24 horas (figura 17), respectivamente. Através da análise de expressão genica por qPCR, foi permitido a identificação do perfil de modulação das células incubadas com PTC+ frente aos genes *CEP55*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20* e *ATM*, quando comparados ao controle negativo (KG-1 sem tratamento). Os resultados indicam que não houve nenhuma alteração da expressão genica no tempo de 12 horas. No entanto, após 24 horas de incubação com o composto PTC+ foi observada uma diminuição significativa da expressão do gene *AURKB* ($p > 0,02$) quando comparado ao controle negativo. As auroras quinases desempenham papéis críticos na divisão celular e encontram-se alteradas em diversas doenças, incluindo leucemias. Os achados que mostram que o PTC+ causa parada em G₂/M somados a diminuição da expressão de *AURKB* podem sugerir a possível atuação do composto no ciclo celular frente a linhagem de leucemia mieloide aguda *in vitro*.

Figura 17: Padrão da expressão dos genes *CEP55*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20* e *ATM* em linhagem de leucemia mieloide aguda (KG-1) após incubação com o composto PTC+ nos tempos de 12 e 24 horas, respectivamente (A e B).



O controle negativo (C-) foi feito com células da linhagem leucemia (KG-1) sem tratamento com o composto. O composto PTC+ foi utilizada na concentração de 1,5 μM . Os dados estão apresentados como valores de média \pm SEM, obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicatas. *, $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido de teste de Bonferroni. (GraphPad Prism versão 8.0).

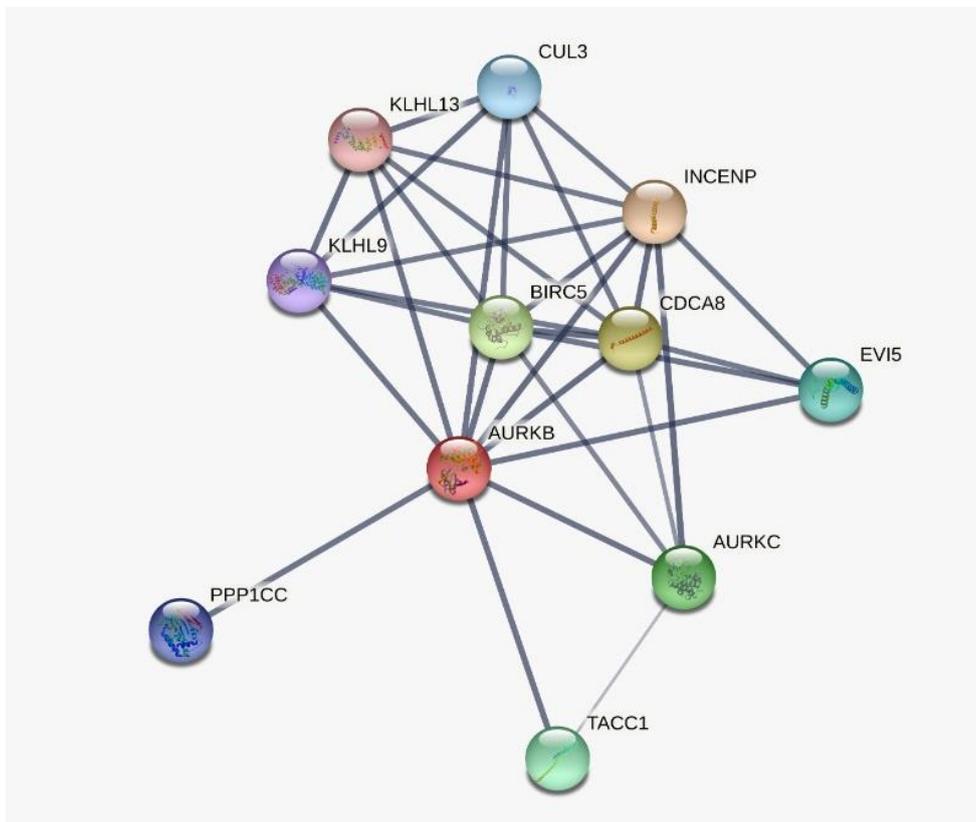
5.3.2 Predição *in silico* de interações proteicas associados a AURKB

Os resultados de expressão gênica mostraram que o PTC+ causou uma modulação no gene *AURKB* em modelo de leucemia mieloide aguda (KG-1). Dessa forma, sabendo que a expressão genica está relacionada com a modulação da expressão proteica, foi feita uma busca na plataforma STRING afim de estabelecer uma rede de interação associadas a proteína aurora quinase b (*AURKB*). A análise de interações proteica mostrou que o coeficiente médio de *clustering* local igual a 0.858 e um p-valor de enriquecimento PPI (*protein-protein interaction*) de $7.18\text{e-}08$, indicando que a rede de interações avaliada tem mais interações do que o esperado de um *set* de proteínas de tamanho similar do genoma, além de sugerir que as proteínas estão biologicamente conectadas como um grupo.

De acordo com as análises, a maioria das proteínas possuem interações já descritas ou preditas entre si segundo a literatura. Dentre elas encontram-se proteínas associadas ao complexo de proteínas centroméricas interna (INCENP), que atuam como um regulador chave da mitose. CDCA8, que atua como um regulador chave da mitose; TACC1 e EVI5 que atuam como regulador da progressão do ciclo celular; e as proteínas da família KLHL (*Kelch-like protein*) que atuam como mediadora da ubiquitinação de *AURKB* e controla o

comportamento dinâmico de AURKB em cromossomos mitóticos e, assim, coordena a progressão mitótica e a conclusão da citocinese.

Figura 18: Resultado da busca no database STRING de redes de interações proteína-proteína PPI associada à AURKB. A espessura da linha indica a força do suporte de dados.



Fonte: Feita pelo autor através da baseline STRING, 2022.

6. Discussão

O câncer é uma sequência complexa de doenças que progridem de acordo com a perda generalizada do controle do crescimento. Em 2020, houve uma estimativa de 19,3 milhões de novos casos e cerca de 10 milhões de mortes por câncer em todo mundo (Sung H, 2021). Nos últimos anos o esforço em conjunto de uma rede multidisciplinar de profissionais alavancou inúmeras alternativas de novas abordagens terapêuticas para o câncer, entretanto o número de agentes antineoplásicos e quimioterápicos identificados com sucesso na prática clínica ainda é bastante limitado (Debela DT, 2021). Em contraposição as grandes indústrias farmacêuticas e centros de pesquisas buscam incansavelmente novas opções terapêuticas através da identificação de moléculas promissoras com maior eficácia e redução dos efeitos colaterais tóxicos/adversos (SAVAGE, 2021).

A leucemia mieloide aguda é a leucemia mais comum na população adulta e representa cerca de 80% de todos os casos. O Instituto Nacional de Câncer (INCA) aponta que para cada ano, entre 2020 e 2022, sejam diagnosticados 10.810 novos casos de leucemias no Brasil, sendo 5.920 em homens e 4.890 em mulheres. Segundo um estudo feito pelo Observatório de Oncologia, em dez anos (2008 – 2017) o Brasil teve cerca de 63 mil mortes por leucemias, sendo que 36% foram causadas pela LMA (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2010). Apesar dos tratamentos terapêuticos padrões permitirem a sobrevida global em média de 5 anos, cerca de 70% em crianças e 30-40% em adultos, o câncer inevitavelmente reincide, com alta probabilidade de evolução clonal da LMA, caracterizando o pior prognóstico da LMA (Lonetti, A, *et al.*, 2019). O desenvolvimento de novas terapêuticas é prejudicado em parte devido à alta heterogeneidade clínica da LMA (MACPHERSON & DAWSON, 2017; LINDSLEY R, *et al.*, 2015).

Compreender a heterogeneidade refratária é fundamental para decifrar os mecanismos de resistência subjacentes à terapia de indução. A presença de marcadores citogenéticos (cariótipo complexo ou monossômico), moleculares (duplicação interna em tandem da tirosina quinase 3 relacionada à FMs) e mutação (*TP53*) prediz uma resposta ruim à quimioterapia de indução intensiva, com apenas uma minoria desses pacientes alcançando remissão após a quimioterapia de indução (SCHLENK & DÖHNER, 2013; MACPHERSON & DAWSON, 2017). Diante de toda essa heterogeneidade biológica das oncohematologias, as linhagens de leucemias tornam-se protagonistas no estudo desta dissertação, com enfoque na linhagem de leucemia mieloide aguda (KG-1). Vale destacar que para o desenvolvimento do presente estudo, foi utilizado uma linhagem celular imortalizada advinda de um paciente humano, portador de eritroleucemia evoluindo para leucemia mielóide aguda, onde é conferido a ela o estágio de maturação de mieloblastos ou promielócitos e comportamento similar ao que acontece em um indivíduo portador da doença (Koeffler, H. P, *et al.*, 1980).

Considerando a dificuldade no tratamento da leucemia mieloide aguda devido seu perfil heterogêneo, há uma necessidade de desenvolver novos agentes quimioterápicos que sejam eficazes e seguros na terapia da doença (MACPHERSON & DAWSON, 2017; LINDSLEY R, *et al.*, 2015). Ao longo da história, os produtos naturais desempenharam um papel dominante no tratamento de diversas doenças. Remédios tipicamente tradicionais, em grande parte baseados em plantas terrestres, ainda são práticas terapêuticas em todo o

mundo, e os produtos naturais compreendem uma grande parcela dos agentes farmacêuticos atuais, principalmente nas áreas de antibióticos e antitumorais (Cragg & John, 2016).

Nos dias atuais, as indústrias farmacêuticas juntamente com grandes centros de pesquisas investem de forma direcionada na busca da descoberta de novos fármacos derivados de produtos naturais biologicamente ativos. Os primeiros registros de produtos naturais com atividade biológica foram retratados a cerca de 2600 a.C. onde óleos das espécies *Cupressus sempervirens* (Cipreste) e *Commiphora* (mirra) eram utilizados como tratamento empírico para o tratamento de tosse, resfriados e inflamações (CRAGG & NEWMAN, 2005). Grande parte dos produtos naturais se originam de fontes oriundos de plantas, bactérias, fungos, vegetais e animais marinhos e são historicamente a fonte de origem de praticamente todos os medicamentos (Dias; Urban, 2012; Harvey; Gericke, 2011).

A obtenção do protótipo (PTC+) utilizando no âmbito dessa pesquisa foi inicialmente inspirado a partir de uma fonte natural, proveniente da espécie “*Platymiscium floribundum*”, planta característica da *Caatinga* brasileira. MILITÃO e colaboradores (2006) iniciou os estudos de caracterização do perfil antiproliferativo deste composto em um *screening* de diversas linhagens tumorais, incluindo tumores leucêmicos (MILITÃO *et al.*, 2006; MILITÃO *et al.*, 2007; MILITÃO *et al.*, 2014). Estudos posteriores permitiu a separação do composto racêmico em seus dois componentes, dextrógiro (+) e levógiro (-), no qual foi possível a comparação do perfil citotóxico das três respectivas moléculas com posterior análise do possível mecanismo de ação dos compostos isolados em relação a molécula natural (MEIRA, 2016). Os resultados advindos de MEIRA e colaboradores (2016) inspirou a continuidade para diversos trabalhos de caracterização do fenótipo (MORAES DE FARIAS, Kaio *et al.*, 2022) identificação de biomarcadores proteicos, predição *in silico*, caracterização *in vitro* da farmacocinética (Carvalho, 2021) e no presente estudo, foi possível investigar o perfil de modulação do composto dextrógiro (PTC+) em linhagem de leucemia mieloide aguda (KG-1) frente a um painel de principais alvos reguladores do ciclo celular.

Nas últimas décadas surgiram vários estudos associando o grupo químico dos pterocarpanos a atividade anticâncer. Chaudhuri e colaboradores (1995) mostraram a atividade citotóxica do pterocarpano (+)-3,4-dihydroxy-8,9-methylenedioxypterocarp em linhagens de adenocarcinoma (Chaudhuri, Swapan K., *et al.*, 1995). Outro estudo mostrou a atividade antitumoral de derivados dos pterocarpanos em linhagens leucêmicas e de tumores sólidos como a Leucemia linfoblástica aguda (CEM-13), leucemia de células T adultas (MT4) e células de linfoma histiocítico (U-937) (SHULTS, Elvira E. *et al.*, 2017). Zhoh e colaboradores (2009) relataram que o pterocarpano trifolirhizin exibiu atividade

antiproliferativa de maneira concentração-dependente contra linhagens de células de câncer de ovário humano (A-2780) e de pulmão (H-23) após 24 h de incubação (ZHOU, Huiping *et al.*, 2009). Um estudo realizado com o pterocarpano trifolirizina em uma linhagem de leucemia mieloide humana (HL-60) demonstrou alterações morfológicas e indução da apoptose após 3 dias de tratamento (ARATANECEMUGE, Yue *et al.*, 2004). Enquanto, LU Xingang e colaboradores (2016) por meio do estudo *in vitro/in vivo* identificou a indução de apoptose em células tumorais MKN45 mediado pelas vias EGFR-MAPK (LU Xingang, *et al.*, 2016). Nesse contexto, esforços vêm sendo realizados por diferentes pesquisadores com objetivo de elucidar o potencial antitumoral dessa classe química dos pterocarpanos.

Neste trabalho, o estudo realizado usando um derivado do pterocarpano (PTC+) frente a linhagens leucêmicas, o qual apresentou potencial efeito antiproliferativo e inibiu a proliferação celular em HL-60 (0,41 μM), K-562 (7,51 μM), KG-1 (1,0 μM) e KASUMI (4,14 μM). Por outro lado, foi observado baixa atividade contra linhagens não tumorais MS5 e PBMC (>160 μM), indicando maior seletividade do PTC+ em linhagens tumorais quando comparado com as células não tumorais.

Nos trabalhos publicados utilizando moléculas derivada do grupo dos pterocarpanos, tais como a Homocarpina (derivado de 9-metoxipterocarpanos) foi testado contra um grupo de linhagens tumorais, apresentando melhor atividade frente a linhagens de células leucêmicas (CEM) e (HL-60), com valores de IC_{50} (5,5, 3,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) respectivamente, sendo considerada uma molécula citotóxica promissora (FALCÃO, C. *et al.* 2005). Enquanto, no trabalho de TRIVEDI e colaboradores (2014) a substância 3-hidroxi,9-metoxipterocarpan (Medicarpin) foi estudado em células de leucemia mieloide apoptose causando indução da apoptose pela via TRAIL com possível envolvimento da ativação de JNK na dose de 20 μM (TRIVEDI *et al.*, 2014). Por outro lado, os derivados de 9-metoxipterocarpanos induziu apoptose em linhagem leucêmica (HL-60) como parte do seu possível mecanismo citotóxico. Os resultados mostraram que os derivados do pterocarpano causaram fragmentação do DNA e inibiram a síntese de DNA na concentração de 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, além de induzirem a ativação da caspase-3 em HL-60 (MILITÃO, *et al.*, 2006). Além desses resultados apresentados, Kuete e colaboradores (2014) avaliaram o perfil antiproliferativo de dois pterocarpanos sophorapterocarpan A e 6 α -hidroxifaseolidina isolados da casca de *Erythrina sigmoidea* (Leguminosae) frente a um painel de linhagens tumorais, incluindo tumores leucêmicos sensível a drogas (CCRF-CEM) e multirresistente (CEM/ADR-5000) apresentando valores de IC_{50} de 0.75 μM e 1.19 μM respectivamente, induzindo morte celular por apoptose (KUETE, Victor *et al.*, 2014).

A ação antiproliferativa dos pterocarpanos frente a linhagens de tumores leucêmicos pode ser reforçado por BUARQUE (2014) em que o composto aza-desoxipterocarpanos sintetizados através da aza-arilação do dihidronaftaleno, apresentou atividade antitumoral em linhagens de células leucêmicas MDR (K562, Lucena-1 e FEPS), com IC₅₀ de 2.90 µM, 2.49 µM e 2.12 µM respectivamente, levando a célula a processo de morte celular programa (apoptose) (BUARQUE, Camilla D. *et al.*, 2014). NETTO e colaboradores confirmou a ação antileucêmica dos pterocarpanos ao avaliar o derivado sintético pterocarpanquinone, frente a um pequeno painel de células leucêmicas (Lucena-1 (2,75 µM); Raji (3,32 µM); Jurkat (3,10 µM) e Daudi (3,10 µM)) (NETTO, Chaquip D. *et al.*, 2010). Esses achados reforçam o potencial antileucêmico do pterocarpano em estudo (PTC+).

Em relação ao potencial antitumoral dos pterocarpanos a outras linhagens tumorais NIU e colaboradores (2013) mostrou que o composto 3(S),4(S)-3'-methoxy-4'-hydroxy-7,8,-methylenedioxypterocarpan testada contra a linhagem de câncer de próstata (PC3) apresentou significativa atividade antitumoral com IC₅₀ de 3,5 µM (NIU *et al.*, 2013). Outro estudo com um derivado dos pterocarpanos (Maackiain), obtido a partir de *Lonchocarpus aff. Fluvialis*, demonstrou perfil antiproliferativo frente outra linhagem de tumor de próstata (LNCaP) com IC₅₀ foi de 37 µM (BLATT *et al.*, 2002). SAKURAI e colaboradores (2006) analisaram dois pterocarpanos (Rautandiol A e Rautandiol B) isolados da planta *Neorautanenia mitis*, no qual apresentaram atividade contra linhagens de células tumorais de mama e de pulmão (IC₅₀ > 5 µg/mL) (SAKURAI *et al.*, 2006). Os compostos Erybraedin C e bitucarpin A, purificados de *Bituminaria bituminosa*, apresentaram atividade antitumoral em linhagem de adenocarcinoma de cólon (LoVo e HT29) através da indução por apoptose, sugerindo um forte composto inibidor do crescimento tumoral (MAURICH *et al.*, 2006).

Levando-se em consideração a forte atividade citotóxica apresentada pelos compostos, apoiadas pelo referencial da literatura, foi avaliado se quando comparada as células sem tratamento (C-) havia a presença de alterações morfológicas nas células tratadas com o composto PTC+ após um período de 12, 24 e 48 horas de incubação. Foi possível avaliar que o composto PTC+ induziu alterações morfológicas, desde as primeiras 12 horas até as 48 horas de tratamento, sendo possível observar o aumento do número e do tamanho dos vacúolos em todos os tempos de tratamento. Após 24 horas as células começaram a apresentar característica nuclear de parada em mitose devido a redução do conteúdo nuclear. Além disso, a partir desse tempo também foi possível observar algumas alterações morfológicas de membrana, como a formação de prolongamentos da membrana plasmática

“*blebs*”, o que pode indicar o início de um processo de apoptose, embora essas características tenham sido pouco observadas.

Esses achados são reforçados com os encontrados em um trabalho de um derivado dos flavonóides, no qual observou a presença de estruturas clássicas de apoptose, como a condensação da cromatina, redução do volume celular e aumento do número de vacúolos celular em HL-60 (Ruela-de-Sousa, R. R., *et al.*, 2010). Além disso, os achados obtidos por Farias e colaboradores (2020) mostraram que o composto derivado do pterocarpano (+)-2,3,9-trimetoxipterocarpan causou alteração morfológica em células OVCAR-8, apresentando condensação da cromatina e aumento de corpos apoptóticos (FARIAS, Kaio *et al.*, 2020). Acrescentando aos resultados obtidos com compostos derivados dos pterocarpanos, foi identificado alterações na morfologia de células leucêmicas (HL-60), onde foi observado a presença de condensação da cromatina, núcleo picnótico, vacuolização citoplasmática, volume celular reduzido e vacúolos apoptóticos (MILITÃO, Gardênia 2005).

A literatura descreve que vacuolização citoplasmática de células pode ser transitória ou irreversível. A vacuolização transitória é observada apenas durante a exposição a um indutor e afeta de forma reversível o ciclo celular e a migração (Cohen KL *et al.*, 1979; Morissette G *et al.*, 2008). Já a vacuolização irreversível marca condições citopatológicas que levam à morte celular, desde que o estímulo citotóxico esteja presente (TRABBIC, Christopher J. *et al.* 2014). Além disso, a literatura descreve que alterações no tamanho e na forma do núcleo celular são características morfológicas dos processos iniciais de morte celular por apoptose (Saraste, A., & Pulkki, K. 2000). Corroborando com esses achados, a literatura descreve que a formação de prolongamentos citoplasmáticos chamados “*blebs*” são pequenos fragmentos que se desprendem da célula apoptótica sendo posteriormente fagocitados por das células vizinhas, macrófagos teciduais ou macrófagos das cavidades associadas aos epitélios (STILLWELL W 2016).

Desse modo, os nossos achados reforçam os relatos descritos anteriormente na literatura enfatizando que o composto PTC+ causa alterações morfológicas características de células em processo de apoptose. Conforme descrito por SARASTE (2000) as células em processo de apoptose têm por características principais uma condensação nuclear em massa bem definidas com uma diminuição do tamanho celular e surgimentos de corpos apoptóticos (SARASTE; PULKKI, 2000).

A proliferação descontrolada é uma característica comum presente em todos os tipos de tumores que os diferem das células normais, essa capacidade é devido a perda funcional de resposta a sinais inibitórios do crescimento celular ou autonomia na produção

de fatores de crescimento (HANAHAN & WEINBERG, 2011). O mecanismo de atuação de grande parte dos agentes antitumorais se dá através de danos ao DNA ou indução do bloqueio do ciclo celular com subsequente ativação do processo de morte. Além desses, muitos agentes antitumorais atuam através de mecanismo citostáticos, no qual não causam a morte da célula, mas evitam que ocorra a proliferação desenfreada (OTSU, 2008; RIXE; FOJO., 2007).

Sabendo que o bloqueio no ciclo celular é frequentemente utilizado pela maquinaria celular com objetivo de facilitar o reparo aos danos no DNA, e esses quando não reparados desencadeiam várias vias de sinalização levando a indução da senescência ou apoptose, o presente estudo avaliou o composto PTC+ frente a linhagem KG-1 durante 12, 24 e 48 horas de incubação, no qual causou parada em G2/M ($p > 0,0001$) em todos os tempos testados.

Diversas drogas que atuam no ciclo celular estão presentes na terapêutica do câncer. As drogas que atuam na apoptose ou senescência via bloqueio do ciclo celular tem ganhado destaque na comunidade científica devido sua capacidade de diminuir a possibilidade de resistência aos quimioterápicos e menores efeitos tóxicos (GUPTA *et al.*, 2001). Um exemplo desses agentes é o paclitaxel, que atua bloqueando o ciclo celular em G2/M e consequente morte celular programada (Gagadeep *et al.*, 1999). Resultados similares aos deste estudo foi encontrado por MILITÃO e colaboradores (2006) que ao utilizarem um isolado natural do pterocarpano em HL-60 induziu bloqueio significativo em G2/M no ciclo celular (MILITÃO *et al.*, 2006). Enquanto, BUARQUE e colaboradores (2014) avaliaram o perfil de parada do ciclo celular utilizando a substância sintética aza-deoxi-pterocarpan contra linhagens leucêmicas K562, Lucena-1 e FEPS durante 24 horas, onde as linhagens K562 e Lucena-1 foram bloqueadas em G2/M e a FEPS em G0/G1, porem após 48 horas de incubação com o composto as células FEPS apresentou bloqueio em G2/M (BUARQUE *et al.*, 2014). Em outros estudos MEIRA (2016) utilizando o pterocarpano sintético PTC+, na concentração de $5\mu\text{M}$ em células de carcinoma de ovário (OVCAR-8) resultou em parada significativa na fase G2/M ($75,24 \pm 5,57$). Estudos realizados anteriormente pelo nosso grupo mostrou que o PTC+ regulou a progressão do ciclo celular de células PC3 com bloqueio na mitose sendo interrompida na prófase e metáfase. O composto PTC+ causou formação de fuso monopolares, desorganização dos cromossomos, perturbação do citoesqueleto e bloqueio da replicação dos centríolos (MORAES DE FARIAS, Kaio *et al.*, 2022).

Portanto, os agentes antiproliferativos que atuam bloqueando o ciclo celular vêm ganhando destaque devido sua capacidade de controle da progressão de clones malignos. Dessa forma, sabendo que a modulação aberrante da expressão de genes envolvidos no ciclo

celular pode estimular a migração e progressão do câncer, o presente estudo determinou o perfil de modulação da expressão genica do composto PTC+ frente a um painel de genes reguladores do ciclo celular (*CEP55*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20* e *ATM*) na linhagem leucêmica KG-1 após 12 e 24 horas de tratamento, onde foi possível observar que apenas no tempo de 24 horas houve uma redução significativa a expressão do gene *AURKB* ($p < 0,02$), quando comparado ao controle negativo sem tratamento.

Vale destacar que a aurora quinase b, tem um papel crítico no monitoramento do *check-point* mitótico, criação do fuso bipolar, alinhamento dos centrossomos, regulação da mitose e citocinese, tendo seu pico de atividade na fase G2/M do ciclo celular. Diversos estudos mostraram que a hiperexpressão da aurora quinase b implica em instabilidade genômica e um prognóstico desfavorável em pacientes com leucemia mieloide aguda (LUCENA-ARAUJO *et al.*, 2011). O estudo das alterações citogenéticas é o principal marcador de prognóstico na SMD, sendo que altas frequências de alterações cromossômicas estão associadas a um agravamento da doença e ao maior risco de evolução para LMA (OLNEY E LE BEAU, 2002) O aumento da expressão de *AURKA* e *AURKB* em um grupo de pacientes com LMA foi associado como biomarcador ao desenvolvimento de cariótipo desfavorável para todos os avaliados (LUCENA-ARAUJO *et al.*, 2011).

O papel das auroras quinases durante a tumorigênese tornou-se foco de estudo nos últimos anos devido ao seu papel na promoção da carcinogênese, com isso diversas pesquisas buscam melhor compreender seus alvos para terapias gênicas (HILTON & SHAPIRO, 2014; D'ASSORO *et al.*, 2016). MOREIRA NUNES e colaboradores (2020), avaliou a expressão genica de um grupo de pacientes com leucemia linfoblástica aguda infantil, onde foi evidenciado que todos os pacientes apresentavam a superexpressão de *AURKA* e *AURKB*, no entanto a superexpressão de *AURKB* destacou-se devido a sua associação com um prognóstico mais pobre da doença ($p > 0,0001$). Nesse mesmo estudo, a linhagem leucêmica K-562 foi tratada com um inibidor de aurora quinase (GW806742X) e apresentou diminuição significativa da expressão de *AURKA* e *AURKB* ($p < 0,001$) (MOREIRA-NUNES *et al.*, 2020). Senna Sakai e colaboradores (2016) mostraram que a combinação de agentes antitumorais somados a um inibidor de *AURKB* (AZD1152-hQPA) atuaram de forma sinérgica frente a células de adenocarcinoma (HeLa) onde foi observado aumento dos efeitos citotóxicos e diminuição da expressão de *AURKB*, mostrando que o uso combinados de agentes que visem direcionamento molecular pode ser uma estratégia terapêutica ideal (SENNA *et al.*, 2016).

Estudos anteriores com os derivados do pterocarpano mostraram bloqueio no ciclo celular em G2/M e presença de dispersão cromossômica quando submetidas a análises de imunofluorescência. Além disso, também foi observado que os cromossomos estavam em formato de anel com áster de microtúbulos partindo do centro. Ao analisarem o fuso mitótico foi visto que grande parte das células MCF-7, HS58T e BRL3A apresentavam fuso monopolar, porém quando observado as células T47D estas apresentavam fusos multipolares (MILITÃO, 2007). Outro estudo, mostrou o PTC+ em linhagem de câncer de próstata PC3 causou desalinhamento dos cromossomos e sua distribuição desordenada na placa celular (MEIRA, 2016). Em outro estudo o mesmo pterocarpano utilizado por MEIRA e colaboradores também em PC3 mostrou a presença de formação de fusos monopolares, centrossomos desorganizados e distribuições de γ -tubulina extensivamente interrompidas, enquanto a replicação de centríolos permaneceu inalterada (M Farias et al, 2022).

Em correlação com esses achados, a literatura descreve que Aurora quinase B é necessária para corrigir defeitos de fixação microtúbulo-cinetócoro, e mesmo que não esteja tão claro como essas alterações acontece, o estudo sugere que seja pela via conservada do complexo KNL1/Mis12/complexo Ndc80 (KMN), no qual pode comprometer a dinâmica dos microtúbulos e subsequência morte celular (Hauf et al., 2003; Pinsky et al., 2006; WELBURN, Julie PI et al., 2010). Outro estudo com um agente fitoquímico (Corinolina) demonstrou potencial antiproliferativo em células de tumores sólidos e de inibição de AURKB causando alterações centrossômicos, formação de fuso multipolar, parada mitótica e falha citocinética levando a célula a indução de apoptose (YAN, Ziqi et al., 2022). Em um outro estudo utilizando um inibidor de ARUKA (MLN8054), as células tumorais desenvolveram anormalidades do fuso em alta frequência e se apresentam como monopolar ou multipolar (HOAR, Kara et al., 2007).

Novos inibidores contra as quinases mitóticas – PLKS e Auroras quinases, estão atualmente, em ensaios clínicos, devidos sua capacidade de redução de efeitos tóxicos quando comparados aos convencionais compostos que tem como alvo os microtúbulos (JACKSON et al., 2007; KEEN; TAYLOR; ULLRICH, 2006). Estudos mostram que os inibidores de Aurora quinase B tem se tornado base para a terapia antimitótica e anticâncer atual como uma nova classe diferenciada de agentes, dentre os principais compostos que atuam como inibidores de ARUKB estão o Barasertibe (AZD1152), Danusertibe (PHA-739358) e AT9283 no qual estão em fase de estudo clínico (BAVETSIAS; LINARDOPOULOS, 2015).

O composto PTC+ apresentou potencial antiproliferativo frente a linhagens de leucemia causando bloqueio do ciclo celular na fase G₂/M, o que parece ser resultante da interação do composto com uma proteína específica da mitose que leva a diminuição da expressão genica de *AURKB*. Entretanto, estudos que visem melhor detalhar as vias de inibição de *AURKB* se fazem necessários para melhor caracterizar o perfil modulador do PTC+. Diante dos resultados apresentados, tendo em vista que o presente estudo é uma pequena parcela de inúmeros resultados estudados pelo nosso grupo, o composto derivado dos isoflavonoides é um potencial candidato a protótipo terapêutico no tratamento de leucemias.

7. Perspectivas futuras

Diante dos resultados apresentados e discutidos, investigação em relação as proteínas envolvidas com fases do ciclo celular e marcadores das vias de apoptose seriam as nossas próximas diretrizes a serem exploradas futuramente, com o intuito de elucidar o mecanismo de ação do PTC+.

8. Conclusão

- O composto PTC+ tem potencial antiproliferativo na linhagem de leucemia mieloide aguda (KG-1), causando parada em G₂/M.
- O composto do PTC+ foi seletivo frente a linhagem de leucemia mieloide aguda (KG-1) quando comparado com células mononucleares do sangue periférico.
- O composto PTC+ inibiu a expressão gênica de *AURKB*, envolvida na fixação do fuso mitótico ao centrômero durante a mitose, não apresentando efeito sobre os demais genes de controle do ciclo celular testados no presente estudo.
- O composto derivado dos isoflavonoides parece modular o ciclo celular e representa um potencial candidato a protótipo terapêutico no tratamento de leucemias.

9. Referências Bibliográficas

ADAMS, R. R. et al. INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Current Biology*, v. 10, n. 17, p. 1075-1078, 2000.

Ahmed K., Zaidi S.F., Cui Z.G., Zhou D., Saeed S.A., Inadera H. Potential proapoptotic phytochemical agents for the treatment and prevention of colorectal cancer. *Oncol. Lett.* 2019;18:487–498. doi: 10.3892/ol.2019.10349.

ALEEM, Eiman; ARCECI, Robert J. Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. *Frontiers in cell and developmental biology*, v. 3, p. 16, 2015.

ARATANEHEMUGE, Yue et al. Induction of apoptosis by maackiain and trifolirhizin (maackiain glycoside) isolated from sanzukon (*Sophora Subprostrate* Chen et T. Chen) in human promyelotic leukemia HL-60 cells. *Oncology reports*, v. 12, n. 6, p. 1183-1188, 2004.

Baker DD, Chu M, Oza U, Rajgarhia V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Nat Prod Rep.* 2007 Dec;24(6):1225-44. doi: 10.1039/b602241n. Epub 2007 May 9. PMID: 18033577.

BARFORD, David. A MAD way to regulate mitosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 20, n. 3, p. 135-135, 2019.

BAVETSIAS, Vassilios; LINARDOPOULOS, Spiros. Aurora kinase inhibitors: current status and outlook. *Frontiers in oncology*, v. 5, p. 278, 2015.

BELL, Daphne W. Our changing view of the genomic landscape of cancer. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, v. 220, n. 2, p. 231-243, 2010.

Bertoli, Cosetta et al. “Control of cell cycle transcription during G1 and S phases.” *Nature reviews. Molecular cell biology* vol. 14,8 (2013): 518-28. doi:10.1038/nrm3629

BHULLAR, Khushwant S. et al. Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Molecular cancer*, v. 17, n. 1, p. 1-20, 2018.

Borah, Naheed Arfin, and Mamatha M Reddy. “Aurora Kinase B Inhibition: A Potential Therapeutic Strategy for Cancer.” *Molecules (Basel, Switzerland)* vol. 26,7 1981. 1 Apr. 2021, doi:10.3390/molecules26071981

Buarque, C. D., Salustiano, E. J., Fraga, K. C., Alves, B. R., & Costa, P. R. (2014). 11a-N-Tosyl-5-deoxy-pterocarpan (LQB-223), a promising prototype for targeting MDR leukemia cell lines. *European journal of medicinal chemistry*, 78, 190-197.

Carmena, Mar et al. “Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins.” *Current opinion in cell biology* vol. 21,6 (2009): 796-805. doi:10.1016/j.ceb.2009.09.008

CHAUDHURI, Swapan K. et al. Isolation and structure identification of an active DNA strand-scission agent, (+)-3, 4-di-hydroxy-8, 9-methylenedioxypterocarpan. *Journal of natural products*, v. 58, n. 12, p. 1966-1969, 1995.

CHAUDHURI, Swapan K. et al. Isolation and structure identification of an active DNA strand-scission agent, (+)-3, 4-di-hydroxy-8, 9-methylenedioxypterocarpan. *Journal of natural products*, v. 58, n. 12, p. 1966-1969, 1995.

Chen, Kent TJ, et al. "Recent treatment advances and the role of nanotechnology, combination products, and immunotherapy in changing the therapeutic landscape of acute myeloid leukemia." *Pharmaceutical Research* 36.9 (2019): 1-20.

CICCIA, Alberto; ELLEDGE, Stephen J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell*, v. 40, n. 2, p. 179-204, 2010.

Cooper, M. G. *The Cell: A Molecular Approach*. 2ª Edição. Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos (National Library of Medicine), 2000.

Cragg, Gordon M, and John M Pezzuto. "Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents." *Medical principles and practice: international journal of the Kuwait University, Health Science Centre* vol. 25 Suppl 2, Suppl 2 (2016): 41-59. doi:10.1159/000443404

CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure and applied chemistry*, v. 77, n. 1, p. 7-24, 2005.

Cohen KL, Van Horn DL, Edelhauser HF, Schultz RO. Effect of phenylephrine on normal and regenerated endothelial cells in cat cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1979 Mar;18(3):242-9. PMID: 422330.

Darwiche N. Epigenetic mechanisms and the hallmarks of cancer: an intimate affair. *Am J Cancer Res*. 2020 Jul 1;10(7):1954-1978. PMID: 32774995; PMCID: PMC7407342.

DAVER, Naval et al. New directions for emerging therapies in acute myeloid leukemia: The next chapter. *Blood cancer journal*, v. 10, n. 10, p. 1-12, 2020.

Debela DT, Muzazu SG, Heraro KD, Ndalama MT, Mesele BW, Haile DC, Kitui SK, Manyazewal T. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Med*. 2021 Aug 12;9:20503121211034366. doi: 10.1177/20503121211034366. PMID: 34408877; PMCID: PMC8366192.

Deguchi K, Gilliland DG. Cooperativity between mutations in tyrosine kinases and in hematopoietic transcription factors in AML. *Leukemia*. 2002 Apr;16(4):740-4. doi: 10.1038/sj.leu.2402500. PMID: 11960359.

Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2012 Apr 16;2(2):303-36. doi: 10.3390/metabo2020303. PMID: 24957513; PMCID: PMC3901206.

ETTINGER, Andreas W. et al. Proliferating versus differentiating stem and cancer cells exhibit distinct midbody-release behaviour. *Nature communications*, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2011.

Falah R.R., Talib W.H., Shbailat S.J. Combination of metformin and curcumin targets breast cancer in mice by angiogenesis inhibition, immune system modulation and induction of p53 independent apoptosis. *Ther. Adv. Med. Oncol*. 2017;9:235–252. doi: 10.1177/1758834016687482.

Falcão, M. J. C., Pouliquem, Y. B. M., Lima, M. A. S., Gramosa, N. V., Costa-Lotufo, L. V., Militão, G. C. G., ... & Silveira, E. R. (2005). Cytotoxic flavonoids from *Platymiscium floribundum*. *Journal of natural products*, 68(3), 423-426.

Falck J, Mailand N, Syljuåsen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*. 2001 Apr 12;410(6830):842-7. doi: 10.1038/35071124. PMID: 11298456.

GAO, Ying et al. DNA repair gene polymorphisms and tobacco smoking in the risk for colorectal adenomas. *Carcinogenesis*, v. 32, n. 6, p. 882-887, 2011.

GHELLI LUSERNA DI RORA, A.; IACOBUCCI, I.; MARTINELLI, G. The cell cycle checkpoint inhibitors in the treatment of leukemias. *Journal of hematology & oncology*, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2017.

Goldenson, B., & Crispino, J. D. (2015). The aurora kinases in cell cycle and leukemia. *Oncogene*, 34(5), 537–545. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.14>

HÉGARAT, Nadia et al. Aurora A and Aurora B jointly coordinate chromosome segregation and anaphase microtubule dynamics. *Journal of Cell Biology*, v. 195, n. 7, p. 1103-1113, 2011.

HOAR, Kara et al. MLN8054, a small-molecule inhibitor of Aurora A, causes spindle pole and chromosome congression defects leading to aneuploidy. *Molecular and cellular biology*, v. 27, n. 12, p. 4513-4525, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Tipos de câncer. [Brasília, DF]: Instituto Nacional do Câncer, 2010. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/estomago/definicao>.

Ismail N.I., Othman I., Abas F., Lajis N., Naidu R. Mechanism of apoptosis induced by curcumin in colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:2454. doi: 10.3390/ijms20102454.

JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, Leticia et al. Pterocarpanes: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry Reviews*, v. 7, n. 1, p. 125-154, 2008.

Koeffler, H. P., et al. "An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1)." (1980): 265-273.

KONTOMANOLIS, Emmanuel N. et al. Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: a review. *Anticancer research*, v. 40, n. 11, p. 6009-6015, 2020.

KUETE, Victor et al. Cytotoxic flavonoids and isoflavonoids from *Erythrina sigmoidea* towards multi-factorial drug resistant cancer cells. *Investigational New Drugs*, v. 32, n. 6, p. 1053-1062, 2014.

KUO, Tse-Chun et al. Midbody accumulation through evasion of autophagy contributes to cellular reprogramming and tumorigenicity. *Nature cell biology*, v. 13, n. 10, p. 1214-1223, 2011.

Lahlou, Mouhssen. "The success of natural products in drug discovery." (2013).

LAPHANUWAT, Phatthamon; JIRAWATNOTAI, Siwanon. Immunomodulatory roles of cell cycle regulators. *Frontiers in cell and developmental biology*, v. 7, p. 23, 2019.

LI, Jianquan et al. The kinetochore-dependent and-independent formation of the CDC20-MAD2 complex and its functions in HeLa cells. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017.

LINDSLEY, R. Coleman et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, v. 125, n. 9, p. 1367-1376, 2015.

Lonetti, A., Iacobucci, I., & Masetti, R. (2019). Sucessos e Desafios para o Diagnóstico e Terapia da Leucemia Aguda. *Revista de oncologia*, 2019, 3408318. <https://doi.org/10.1155/2019/3408318>

LU, Xingang et al. Anti-proliferation effects of trifolirhizin on MKN45 cells and possible mechanism. *Oncology Reports*, v. 36, n. 5, p. 2785-2792, 2016.

MACPHERSON, Laura; DAWSON, Mark A. Survival of the fittest: Darwinian selection underpins chemotherapy resistance in AML. *Cell Stem Cell*, v. 21, n. 3, p. 291-292, 2017.

Morissette G, Lodge R, Marceau F. Intense pseudotransport of a cationic drug mediated by vacuolar ATPase: procainamide-induced autophagic cell vacuolization. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008 May 1;228(3):364-77. doi: 10.1016/j.taap.2007.12.031. Epub 2008 Jan 26. PMID: 18295291.

Mailand N, Falck J, Lukas C, Syljuasen RG, Welcker M, Bartek J, Lukas J. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science*. 2000; 288:1425-9.

Marty M, Extra JM, Espie M, Leandri S, Besenval M, Krikorian A. Advances in vinca-alkaloids: Navelbine. *Nouv Rev Fr Hematol* (1978). 1989;31(2):77-84. PMID: 2671933.

McLean JR, Chaix D, Ohi MD, Gould KL. State of the APC/C: organization, function, and structure. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2011;46(2):118-136. doi:10.3109/10409238.2010.541420

MEIRA, Assuero Silva. Estudo do potencial efeito inibitório do composto sintético CP001 sobre a quinesina Eg5: análises in vitro com validação de cálculos em bioquímica quântica. 2016.

MILITÃO, Gardênia Carmen Gadelha. Potencial antitumoral de flavonóides isolados de plantas do Nordeste brasileiro: estudos preliminares da relação estrutura-atividade citotóxica. 2005.

MILITÃO, Gardenia CG et al. Induction of apoptosis by pterocarpan from *Platymiscium floribundum* in HL-60 human leukemia cells. *Life sciences*, v. 78, n. 20, p. 2409-2417, 2006.

Montinari MR, Minelli S, De Caterina R. The first 3500 years of aspirin history from its roots - A concise summary. *Vascul Pharmacol*. 2019 Feb;113:1-8. doi: 10.1016/j.vph.2018.10.008. Epub 2018 Nov 2. PMID: 30391545.

MOREIRA-NUNES, Caroline Aquino et al. Targeting aurora kinases as a potential prognostic and therapeutical biomarkers in pediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2020.

Müller, C. D. B. (2015). Síntese de 11a-N-arilsulfonil-tetrahydro-5H-benzo [a] carbazóis com ação antitumoral (Doctoral dissertation, PUC-Rio).

Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*. 2016 Mar 25;79(3):629-61. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055. Epub 2016 Feb 7. PMID: 26852623.

Newman, David J., and Gordon M. Cragg. "Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019." *Journal of natural products* 83.3 (2020): 770-803.

Nuzzo, Genoveffa, et al. "Antitumor Potential of Immunomodulatory Natural Products." *Marine Drugs* 20.6 (2022): 386.

OTTO, Tobias; SICINSKI, Piotr. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, v. 17, n. 2, p. 93-115, 2017.

OTTO, Tobias; SICINSKI, Piotr. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, v. 17, n. 2, p. 93-115, 2017.

PERLMAN, Susan; BECKER-CATANIA, Sara; GATTI, Richard A. Ataxia-telangiectasia: diagnosis and treatment. In: *Seminars in pediatric neurology*. WB Saunders, 2003. p. 173-182.

PERLMAN, Susan; BECKER-CATANIA, Sara; GATTI, Richard A. Ataxia-telangiectasia: diagnosis and treatment. In: *Seminars in pediatric neurology*. WB Saunders, 2003. p. 173-182.

PROKOPCOVA, Jana et al. The role of ATM in breast cancer development. *Breast cancer research and treatment*, v. 104, n. 2, p. 121-128, 2007.

Qiao, R., Weissmann, F., Yamaguchi, M., Brown, N. G., VanderLinden, R., Imre, R., ... & Peters, J. M. (2016). Mechanism of APC/CCDC20 activation by mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(19), E2570-E2578.

Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., and Jackson, R. B. (2011). *Amplifying DNA: The polymerase chain reaction (PCR) and its use in DNA cloning*. (10th ed., pp. 414-416). San Francisco, CA: Pearson.

RUCHAUD, Sandrine; CARMENA, Mar; EARNSHAW, William C. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nature reviews molecular cell biology*, v. 8, n. 10, p. 798-812, 2007.

Ruela-de-Sousa, R. R., Fuhler, G. M., Blom, N., Ferreira, C. V., Aoyama, H., & Peppelenbosch, M. P. (2010). Cytotoxicity of apigenin on leukemia cell lines: implications for prevention and therapy. *Cell death & disease*, 1(1), e19-e19.

SAKAI, Senna et al. In vitro evaluation of a combination treatment involving anticancer agents and an aurora kinase B inhibitor. **Oncology Letters**, v. 12, n. 5, p. 4263-4269, 2016.

SAVAGE, Neil. Tapping into the drug discovery potential of AI. Biopharma Deal, 2021.

SCHLENK, Richard F.; DÖHNER, Hartmut. Genomic applications in the clinic: use in treatment paradigm of acute myeloid leukemia. Hematology 2013, the American Society of Hematology Education Program Book, v. 2013, n. 1, p. 324-330, 2013.

Schnerch D, Yalcintepe J, Schmidts A, Becker H, Follo M, Engelhardt M, Wäsch R. Cell cycle control in acute myeloid leukemia. *Am J Cancer Res*. 2012;2(5):508-28. Epub 2012 Aug 20. PMID: 22957304; PMCID: PMC3433102

SHULTS, Elvira E. et al. Phenolic compounds from *Glycyrrhiza pallidiflora* Maxim. and their cytotoxic activity. *Natural product research*, v. 31, n. 4, p. 445-452, 2017.

Sotillo, R., Hernando, E., Díaz-Rodríguez, E., Teruya-Feldstein, J., Cordon-Cardo, C., Lowe, S. W., & Benezra, R. (2007). Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer cell*, 11(1), 9-23.

Su P., Yang Y., Wang G., Chen X., Ju Y. Curcumin attenuates resistance to irinotecan via induction of apoptosis of cancer stem cells in chemoresistant colon cancer cells. *Int. J. Oncol*. 2018;53:1343–1353. doi: 10.3892/ijo.2018.4461.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.

SARASTE, Antti; PULKKI, Kari. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular research*, v. 45, n. 3, p. 528-537, 2000.

TESAURO, Cinzia et al. Erybraedin C, a natural compound from the plant *Bituminaria bituminosa*, inhibits both the cleavage and religation activities of human topoisomerase I. *Biochemical Journal*, v. 425, n. 3, p. 531-539, 2010.

TRIVEDI, Rachana; MAURYA, Rakesh; MISHRA, Durga Prasad. Medicarpin, a legume phytoalexin sensitizes myeloid leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis through the induction of DR5 and activation of the ROS-JNK-CHOP pathway. *Cell Death & Disease*, v. 5, n. 10, p. e1465-e1465, 2014.

TRABBIC, Christopher J. et al. Differential induction of cytoplasmic vacuolization and methuosis by novel 2-indolyl-substituted pyridinylpropenones. *ACS medicinal chemistry letters*, v. 5, n. 1, p. 73-77, 2014.

VAN GILS, Noortje; DENKERS, Fedor; SMIT, Linda. Escape from treatment; the different faces of leukemic stem cells and therapy resistance in acute myeloid leukemia. *Frontiers in Oncology*, v. 11, p. 659253, 2021.

VanGenderen C, Harkness TAA, Arnason TG. The role of Anaphase Promoting Complex activation, inhibition and substrates in cancer development and progression. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(15):15818-15855. doi:10.18632/aging.103792

VANGENDEREN, Cordell; HARKNESS, Troy Anthony Alan; ARNASON, Terra Gayle. The role of Anaphase Promoting Complex activation, inhibition and substrates in cancer development and progression. *Aging (Albany NY)*, v. 12, n. 15, p. 15818, 2020.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003;36(3):131-149. doi:10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x

WALDMAN, Alex D.; FRITZ, Jill M.; LENARDO, Michael J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology*, v. 20, n. 11, p. 651-668, 2020.

WAQAR, Saiama N. et al. Phase I trial of ATM inhibitor M3541 in combination with palliative radiotherapy in patients with solid tumors. *Investigational new drugs*, v. 40, n. 3, p. 596-605, 2022.

WELBURN, Julie PI et al. Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface. *Molecular cell*, v. 38, n. 3, p. 383-392, 2010.
Xiao Z, Chen Z, Gunasekera AH, Sowin TJ, Rosenberg SH, Fesik S, Zhang H. Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem.* 2003; 278:21767–73.

XU, Yaohui G. et al. Nonmelanoma skin cancers: basal cell and squamous cell carcinomas. In: *Abeloff's Clinical Oncology*. Elsevier, 2020. p. 1052-1073. e8.

YAN, Ziqi et al. The phytochemical, corynoline, diminishes Aurora kinase B activity to induce mitotic defect and polyploidy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 147, p. 112645, 2022.

YANG, Jing et al. CD34+/CD38– acute myelogenous leukemia cells aberrantly express Aurora kinase A. *International journal of cancer*, v. 133, n. 11, p. 2706-2719, 2013.

YE, Dongjiu et al. Analysis of Aurora kinase A expression in CD34+ blast cells isolated from patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Journal of hematopathology*, v. 2, n. 1, p. 2-8, 2009.

ZHAO, Wei-meng; SEKI, Akiko; FANG, Guowei. Cep55, a microtubule-bundling protein, associates with centralspindlin to control the midbody integrity and cell abscission during cytokinesis. *Molecular biology of the cell*, v. 17, n. 9, p. 3881-3896, 2006.

ZHOU, Huiping et al. Anti-inflammatory and antiproliferative activities of trifolirhizin, a flavonoid from *Sophora flavescens* roots. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 57, n. 11, p. 4580-4585, 2009.